

**Untersuchungen zur nephrotoxischen
Wirkung des Mykotoxins
Ochratoxin A**

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
eingereichte Dissertation
(D 386)

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemiker
Hennicke Georg Kamp

Kaiserslautern 2004

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05. März 2004

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Niedner-Schatteburg

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Juni 2000 und Dezember 2003 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand und Frau Dr. C. Janzowski für die Überlassung des Themas sowie für Anregungen und die wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Problemstellung	3
3 Theorie.....	5
3.1 Ochratoxin A.....	5
3.1.1 Chemische und physikalische Eigenschaften	5
3.1.2 Bildung von OTA.....	6
3.1.3 Belastungsminimierung.....	7
3.1.3.1 Maßnahmen durch den Gesetzgeber	8
3.1.4 Vorkommen	9
3.1.4.1 Analytik.....	9
3.1.4.2 Kontamination von Lebensmitteln.....	11
3.1.4.3 Einfluss der Lebensmittelverarbeitung.....	13
3.1.5 Humane Belastung	15
3.1.5.1 Abschätzung der OTA-Aufnahme.....	16
3.1.6 Toxikokinetik.....	17
3.1.6.1 Resorption.....	17
3.1.6.2 Ausscheidung	18
3.1.6.3 Verteilung	18
3.1.6.4 Metabolismus.....	20
3.1.7 Toxikologie	24
3.1.7.1 Akute Toxizität.....	24
3.1.7.2 Kurzzeitstudien	24
3.1.7.3 Langzeitstudien und Kanzerogenität	27
3.1.7.4 Studien zur Reproduktionstoxizität	29
3.1.7.4.1 Teratogenität in Mäusen.....	29
3.1.7.4.2 Teratogenität in Ratten	30
3.1.7.4.3 Weitere Studien zur Teratogenität in vivo	31
3.1.7.4.4 In vitro Untersuchungen zur Teratogenität	31
3.1.7.5 Immuntoxizität.....	32
3.1.7.5.1 Untersuchungen an Mäusen.....	32

3.1.7.5.2	Untersuchungen an Ratten	33
3.1.7.5.3	Weitere Untersuchungen in vivo.....	34
3.1.7.5.4	Untersuchungen in vitro	35
3.1.7.6	Neurotoxizität	35
3.1.7.6.1	Untersuchungen in Ratten	35
3.1.7.6.2	Untersuchungen in vitro	36
3.1.7.7	Nephrotoxizität	37
3.1.7.7.1	Nephrotoxizität in vivo	37
3.1.7.7.2	Nephrotoxizität in vitro.....	39
3.1.7.8	Studien zur Genotoxizität	41
3.1.7.8.1	Gen-Mutationen	41
3.1.7.8.2	Zytogenetische Untersuchungen.....	42
3.1.7.8.3	DNA-Schädigung und DNA-Reparatur.....	43
3.1.7.9	Mechanismen der Tumorentstehung	44
3.1.7.9.1	Bedeutung der Biotransformation.....	44
3.1.7.9.2	DNA-Adduktbildung	46
3.1.7.10	OTA und oxidativer Stress	48
3.1.7.11	OTA-induzierte Zytotoxizität.....	51
3.1.7.11.1	Beeinflussung der Viabilität.....	51
3.1.7.11.2	Wachstumshemmung.....	52
3.1.7.12	Mechanismen der Zytotoxizität.....	53
3.1.7.13	Bindung an Proteine	55
3.1.8	Beobachtungen am Menschen	57
3.1.8.1	Endemische Balkan Nephropathie.....	57
3.1.8.2	Sonstige Beobachtungen	61
3.2	Oxidativer Stress.....	62
3.2.1	ROS, ihre Reaktionen und die Folgen	63
3.2.2	Antioxidative Abwehrmechanismen	65
3.2.2.1	Enzyme, die ROS und Radikale katalytisch beseitigen	65
3.2.2.2	Antioxidativ wirksame Substanzen	67
3.2.2.2.1	Proteine	67
3.2.2.2.2	niedermolekulare Substanzen.....	67
3.2.3	Lipidperoxidation und Proteinoxidation	71

3.2.4	DNA-Schädigung und Reparatur	74
3.2.4.1	DNA-Schädigung durch ROS.....	75
3.3	Apoptose und Nekrose.....	78
3.3.1	Morphologische und Biochemische Veränderungen	78
3.3.2	Auslösende Faktoren	80
3.3.3	Regulation der Apoptose.....	80
3.4	Verwendete Methoden.....	82
3.4.1	Zytotoxizität	82
3.4.1.1	Apoptose.....	83
3.4.1.1.1	Immunchemischer Test.....	83
3.4.1.1.2	Durchflusszytometrie	83
3.4.1.2	Proteinbestimmung BCA.....	86
3.4.2	(Oxidative) DNA-Schädigung	87
3.4.3	Glutathionbestimmung	89
3.4.4	OTA-Aufnahme.....	91
3.4.4.1	OTA-Analytik mittels Hochdruckflüssigchromatographie	91
4	Material und Methoden.....	93
4.1	Zellkultur und Inkubation	93
4.1.1	Geräte, Chemikalien, Nährlösungen, Verbrauchsmaterialien	93
4.1.2	Zelllinien.....	96
4.1.2.1	Kultivierung	96
4.1.2.2	Mediumwechsel.....	96
4.1.2.3	Subkultivierung von Zellen.....	97
4.1.2.4	Einfrieren von Zellen.....	97
4.1.2.5	Auftauen von Zellen.....	98
4.1.2.6	Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen.....	98
4.1.2.7	Inkubation.....	99
4.1.3	Primäre proximale Tubuluszellen der Ratte	99
4.1.3.1	Gewinnung.....	99
4.1.3.1.1	Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	99
4.1.3.1.2	Durchführung.....	100
4.1.3.2	Kultur	101

4.1.3.3	Inkubation.....	101
4.2	Zytotoxizität	102
4.2.1	Viabilitätsbestimmung	102
4.2.1.1	Zellzahlbestimmung.....	102
4.2.1.2	Bestimmung der Viabilität.....	102
4.2.2	Wachstumshemmung.....	102
4.2.2.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen	102
4.2.2.2	Durchführung	103
4.2.3	Proteinbestimmung (BCA).....	103
4.2.3.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen	103
4.2.3.2	Durchführung	104
4.2.3.3	Auswertung.....	104
4.2.4	Apoptose	104
4.2.4.1	Immunchemischer Test.....	104
4.2.4.1.1	Geräte, Lösungen und Verbrauchsmaterial	104
4.2.4.1.2	Durchführung.....	105
4.2.4.1.3	Auswertung.....	106
4.2.4.2	Durchflusszytometrie	106
4.2.4.2.1	Allgemeine Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	106
4.2.4.2.2	Zellernte und Aufarbeitung	107
4.2.4.2.3	Messung.....	107
4.3	DNA-Schädigung.....	108
4.3.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen.....	108
4.3.2	Durchführung.....	109
4.4	Glutathionbestimmung.....	110
4.4.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen.....	110
4.4.2	Durchführung.....	111
4.4.3	Messung	112
4.4.4	Auswertung.....	112
4.5	OTA-Aufnahme.....	114
4.5.1	Analytik.....	114
4.5.1.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen	114

4.5.1.2	Einstellungen	114
4.5.2	Aufnahme	115
4.6	Statistische Auswertung	116
5	Ergebnisse und erste Diskussion.....	117
5.1	Gewinnung primärer Nierenzellen.....	117
5.2	Zytotoxizität	120
5.2.1	Beeinflussung der Viabilität	121
5.2.1.1	Zelllinien nach Kurzzeitinkubation (1 h).....	121
5.2.1.2	Zelllinien nach Langzeitinkubation (24 h).....	122
5.2.1.3	Primäre Nierenzellen nach Kurzzeitinkubation (1 h)	123
5.2.1.4	Primäre Nierenzellen nach Langzeitinkubation (24 h).....	124
5.2.1.5	Diskussion der Viabilitätsdaten	125
5.2.2	Wachstumshemmung.....	126
5.2.2.1	Zelllinien	126
5.2.2.2	Primäre Nierenzellen.....	128
5.2.2.3	Diskussion der Wachstumshemmung.....	129
5.2.3	Induktion von Apoptose.....	130
5.2.3.1	Immunchemischer Test.....	130
5.2.3.1.1	CV-1-Zellen nach Kurzzeitinkubation (4 h)	130
5.2.3.1.2	CV-1-Zellen nach 24 h Inkubation.....	131
5.2.3.2	Durchflusszytometrie	132
5.2.3.3	Diskussion der Apoptoseinduktion	133
5.2.4	Modulation der Zytotoxizität durch Trolox	136
5.2.5	Diskussion der Zytotoxizität.....	137
5.3	Induktion (oxidativer) DNA-Schädigung	139
5.3.1	Darstellung der Ergebnisse.....	139
5.3.2	DNA-Schädigung in Zelllinien.....	140
5.3.2.1	Zelllinien nach 1 h Inkubation.....	140
5.3.2.2	Zelllinien nach 24 h Inkubation	142
5.3.2.3	Diskussion der DNA-Schäden in Zelllinien	144
5.3.3	DNA-Schädigung in primären Nierenzellen	145
5.3.3.1	Primäre Nierenzellen nach 1 h Inkubation	145

5.3.3.2	Primäre Nierenzellen nach 24 h Inkubation.....	147
5.3.3.3	Diskussion der DNA-Schädigung in primären Nierenzellen	149
5.3.4	DNA-Schädigung in vivo (Ratte).....	150
5.3.4.1	Leber in vivo (Ratte)	150
5.3.4.2	Niere in vivo (Ratte)	153
5.3.4.3	Diskussion des Tierversuchs	154
5.3.5	Diskussion der Induktion von DNA-Schädigung.....	156
5.4	Beeinflussung des Glutathionspiegels in CV-1-Zellen.....	158
5.4.1	1 h Inkubation.....	158
5.4.2	24 h Inkubation.....	158
5.4.3	Diskussion der Beeinflussung des Glutathionspiegels.....	159
5.5	Genmutationen in V79-Zellen (HPRT).....	161
5.6	Ochratoxin A-Aufnahme in CV-1-Zellen.....	162
5.6.1	Analytik von OTA	162
5.6.1.1	Einfluss von Nährmedium und Zellbestandteilen.....	163
5.6.1.2	Messungen aus Mediumproben	165
5.6.1.3	Reproduzierbarkeit.....	166
5.6.1.4	Diskussion der OTA-Analytik.....	167
5.6.2	Aufnahme von OTA.....	167
5.6.3	Diskussion der Aufnahmemessung	168
6	Diskussion und Ausblick	169
7	Zusammenfassung.....	174
8	Literatur	177
9	Anhang	212
9.1	Lebenslauf.....	212
9.2	Posterbeiträge, Vorträge und Publikationen.....	216
10	Dank	219

Abkürzungen

8-OH-dG	8-Hydroxy-desoxyguanin
A.	Aspergillus
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
ADI	„acceptable daily intake“, engl. für akzeptierbare tägliche Aufnahmemenge
AFE	Alkalische Filterelution
AIDS	„acquired immuno deficiency syndrom“
AOAC	Association of Analytical Communities
AP	Apurinisch/Apyrimidinisch
ATP	Adenosintriphosphat
a_w	Wasseraktivität
B.	Bacillus
BCA	Bichinolin-carbonsäure
BEN	„Balkan endemic nephropathy“, engl. für endemische Balkannephropathie
BER	„base excision repair“, engl. für Basenexzisionreparatur
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
BSA	„bovine serum albumin“, engl. für Rinderserumalbumin
BW	„body weight“, engl. für Körpergewicht
CAS	Chemical Abstracts Service
CAT	Katalase
CEN	Comitee Européen de Normalisation
CYP 450	Cytochrom-P450
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dGMP	Desoxyribosylguanidin-Monophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“, engl. für Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
E. Coli	Escherichia Coli
EC ₅₀	Effektive Konzentration 50
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EN ISO	Euronorm International Standard Organisation
Endo III	Endonuklease III
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid, reduziert
Fe-NTA	Eisen(III)nitrilotriacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FMN	Flavin-Mononukleotid
FMNH ₂	Flavin-Mononukleotid, reduziert
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FRAP	„ferric reducing ability of plasma“
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathion (oxidiert)
HBSS	„hanks buffered salt solution“
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“, engl. für Hochdruckflüssigchromatographie

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	Intravenous
IC ₅₀	Inhibierende Konzentration 50
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPCS	„International Programme on Chemical Safety“
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	„Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LC/MS	„liquid chromatography/massspectrometry“, engl. für Flüssigchromatographie/ Massenspektrometrie
LD ₅₀	Letale Dosis 50
LDH	Laktatdehydrogenase
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz
LPO	Lipidperoxidation
Lys	Lysin
MDA	Malondialdehyd
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MW	Mittelwert
n	Anzahl unabhängiger Wiederholungen
NAD	Nikotinadenindinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphathydrid
NCTR	„National Center for Toxicology Research“
NER	„nucleotid excision repair“, engl. für Nukleotidexzisionreparatur
NKS	Natales Kälberserum
NOAEL	„no observed adverse effect level“
NOEL	„no observed effect level“
NTP	„national toxicology programme“
ODS	Octadecasilica
OP-OTA	Ochratoxin A mit offenem Laktanring
ORAC	„oxygen radical absorbance capacity“
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
OTC	Ochratoxin C
OTOQ	Ochratoxin-Chinon
OTQH	Ochratoxin-Hydrochinon
OTa	Ochratoxin alpha
OTβ	Ochratoxin beta
P.	Penicillium
p.o.	per os (oral)
POD	Peroxidase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGF _{2a}	Prostaglandin F _{2a}
pH	Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pKs	Logarithmus der Säuredissoziationskonstante
PNZ	Primäre proximale Tubuluszellen (Ratte)
PP	Polypropylen
ppb	„parts per billion“, 1:1.000.000.000
ppm	„parts per million“, 1:1.000.000
PTDI	„provisional tolerable daily intake“, engl. für vorläufig tolerierbare tägliche Aufnahmemenge

PTWI	„provisional tolerable weekly intake“, engl. für vorläufige tolerierbare wöchentliche Aufnahmemenge
ROS	„reactive oxygen species“, engl. für reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	„Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography“, engl. für Hochdruckflüssigchromatographie an Umkehrphasen
S.	Salmonella
s.c.	subcutan
SA	Standardabweichung
SCE	Schwesterchromatid-Austausch
Ser	Serin
SKLM	DFG-Senatskommission zur Beurteilung der Unbedenklichkeit von Lebensmitteln
SOD	Superoxid-Dismutase
SOD	Superoxiddismutase
SRB	Sulforhodamin B
SSA	Sulfosalicylsäure
SSB	Einzelstrangbruch
Stdabw.	Standardabweichung
TBARS	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen
TCA	Trichloressigsäure
TDI	„tolerable daily intake“, engl. für tolerierbare tägliche Aufnahmemenge
TEAC	„trolox-equivalent antioxidant capacity“
tGSH	Gesamt-Glutathion
TI	„tail intensity“, engl. für Schweifintensität
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Pufferan [®])
Tyr	Tyrosin
UDS	Unplanmäßige DNA-Synthese
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Für die Lebensmitteltoxikologie spielen toxische Produkte von Bakterien und Pilzen eine wichtige Rolle. Neben Ergotalkaloiden aus dem Mutterkornpilz sind v.a. Pilzgifte aus Schimmelpilzen von Bedeutung. Es sind über 200 sog. Mykotoxine bekannt. Zu den best untersuchten Mykotoxinen gehören die Aflatoxine, die zu den potentesten bekannten Kanzerogenen im Tierversuch (Ratte) gehören. Schon eine tägliche Dosis von 10 µg pro Kilogramm Körpergewicht (µg/kg KG) war kanzerogen wirksam, von dem hochkanzerogene Dimethylnitrosamin führten erst Tagesdosen von 750 µg/kg KG zu Tumoren [Belitz et al., 2001]. Die starke Kanzerogenität der Aflatoxine ist auf die Fähigkeit zurückzuführen, nach metabolischer Aktivierung (Epoxidierung durch Cytochrom P450 Monooxygenasen) DNA-Addukte zu bilden und so zu Mutationen zu führen. Primär ist pflanzliches Material mit Aflatoxinen kontaminiert, es treten aber durch Übertrag aus Futtermitteln („carry over“) auch Kontaminationen in tierischen Produkten und Milch auf. [Belitz et al., 2001; Eisenbrand & Schreier, 1995]

Aus Proben pflanzlicher Herkunft wurden weitere Mykotoxine, wie Patulin, Sterigmatocystin, Fusariotoxine oder Ochratoxin A isoliert. Ochratoxin A (OTA) ist ein nierentoxisches und nierenkanzerogenes Schimmelpilzgift, das von verschiedenen Aspergillus- und Penicillium-Stämmen, vor allem *A. ochraceus* und *P. verrucosum*, gebildet wird (Abbildung 1). Chemisch handelt es sich bei OTA um ein Isocoumarinderivat, dass peptidisch mit L-Phenylalanin verknüpft ist. (s. Kap. 3.1.1)

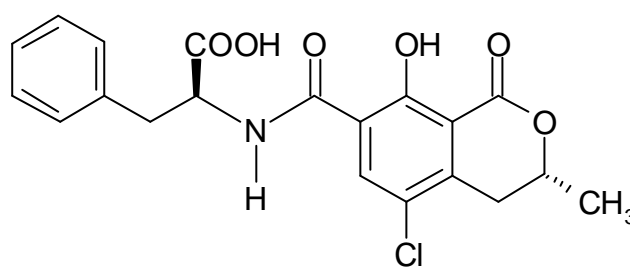


Abbildung 1: Strukturformel von Ochratoxin A

Kontaminationen mit OTA sind vor allem in pflanzlichen Produkten wie Getreide und Getreideprodukte, Kaffee, Traubensaft und Wein, Kakao, Nüsse und Gewürze nachweisbar. Bei der Getreideverarbeitung und dem Backprozess sowie beim Röstten von Kaffee werden Teile des vorhandenen Mykotoxins abgebaut. Da OTA aber unter Bedingungen, wie sie bei der Lebensmittelverarbeitung und beim Kochen herrschen, relativ stabil ist, findet man es auch in prozessierten Produkten. Durch

„carry over“ aus kontaminierten Futtermitteln kommt OTA auch im Fleisch von Schlachttieren, vor allem in Schweinefleisch, vor. (s. Kap. 3.1.4.2) Verbraucher nehmen in Deutschland wöchentlich ca. 5 ng/kg KG OTA auf. (s. Kap. 3.1.5.1) OTA wird in den oberen Dünndarmabschnitten gut resorbiert, über das Blut rasch im Körper verteilt und über die Niere oder über die Galle ausgeschieden. Der Gehalt im Plasma liegt in Deutschland bei 0,27 ng/mL. (s. Kap. 3.1.5, 3.1.6)

Die toxischen Wirkungen von OTA sind stark spezies- und geschlechtsabhängig, so wurden für die akute Toxizität LD₅₀-Werte von 0,2 bis 60 mg/kg KG gefunden. In Studien zur subakuten und subchronischen Toxizität von OTA wurde ausgeprägte Nierentoxizität gezeigt, die sich u.a. in verringerten Nierengewichten, eingeschränkter Nierenfunktion und Polyurie äußerte. In Teratogenitätsstudien an Mäusen, Ratten und Hühnern wurde gezeigt, dass eine Exposition im Mutterleib zu erhöhten Resorptionen und Missbildungen vor allem am Skelett der Jungtiere führt. In Mäusen, Ratten und Schweinen, die mit OTA behandelt wurden, waren die Gewichte immunologischer Organe (z.B. Milz, Thymus) verringert und die Immunfunktionen eingeschränkt. Bei Ratten wurden Nekrosen im Zentralnervensystem und veränderte Enzymaktivitäten im Gehirn beobachtet. In Langzeitstudien wurde an Ratten bei Gabe sehr niedriger OTA-Dosen die Induktion von Nieren- und Blasentumoren beobachtet, in weiblichen Mäusen insbesondere eine erhöhte Inzidenz an Lebertumoren. Es wird vermutet, dass OTA mit der beim Menschen auftretenden endemischen Balkanephropathie (BEN) in Zusammenhang steht. Dabei handelt es sich um ein Krankheitsbild, in dessen Verlauf es zu Tubulusdegeneration, Niereninsuffizienz und Tumoren in den ableitenden Harnwegen kommt. (s. Kap. 3.1.7)

Der Mechanismus der kanzerogenen Wirkung von OTA ist noch immer unklar. So erbrachte eine Reihe von Studien zur Genotoxizität widersprüchliche Resultate. Die beobachteten Effekte könnten möglicherweise auf sekundäre Mechanismen wie oxidativen Stress zurückzuführen sein. Hinweise auf die Induktion von oxidativem Stress und die damit verbundene Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, die mittelbar zu DNA-Modifikationen und so zu Mutationen führen können, ergaben sich in einer Reihe von Arbeiten. So wurde in zellfreien Systemen, in vitro und in vivo Lipidperoxidation induziert, die zum Teil durch die protektiven Enzyme Katalase und Superoxiddismutase inhibiert werden konnte. Zudem traten eine Reihe von toxischen Effekten in vitro und in vivo bei gleichzeitiger Gabe von Antioxidantien gemildert auf. (s. Kap. 3.1.7.10)

2 Problemstellung

Für die Risikobewertung von OTA spielt eine wesentliche Rolle, ob die durch OTA induzierte Kanzerogenität über direkt genotoxische Mechanismen zustande kommt. Die in der Literatur beschriebenen Studien zur Genotoxizität zeigen widersprüchlich Ergebnisse, insbesondere die Induktion kovalenter Addukte von OTA mit der DNA ist umstritten. Es wurden zwar mittels der ^{32}P -Postlabellingmethode OTA-abhängig auftretende DNA-Adduktstellen nach der dünnschichtchromatographischen Analyse beobachtet, diese Addukte aber nicht strukturell charakterisiert. Eine Bindung radioaktiv markierter OTAs an DNA hingegen wurde nicht gezeigt. Unspezifische DNA-Addukte, die sich im ^{32}P -Postlabelling nachweisen lassen, können auch durch sekundäre Mechanismen entstehen, wie z.B. oxidativen Stress und stark ausgeprägte Zytotoxizität (s. Kap. 3.1.7.9).

In verschiedenen Zelltestsystemen und in zahlreichen Tierspezies ist die ausgeprägte Zytotoxizität von OTA belegt. Untersucht wurden vor allem Endpunkte wie Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion, begleitend zur Untersuchung anderer toxikologischer Endpunkte wurde häufig auch die Beeinflussung der Viabilität gemessen (s. Kap. 3.1.7.11, 3.1.7.12). Eine vergleichende Betrachtung der Endpunkte für Zytotoxizität ist aus den Literaturdaten allerdings aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht möglich.

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass OTA in der Lage ist, über die Bildung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) in Zellen und Versuchstieren oxidativen Stress und damit oxidative Zellschädigung zu verursachen (s. Kap. 3.1.7.10). Die Bedeutung der oxidativen Schädigung für die Induktion von Tumoren ist allerdings noch unklar. Auch das Potenzial, DNA-Strangbrüche zu induzieren, wurde für OTA gezeigt, die Datenlage reicht aber bei weitem nicht, um klare Schlussfolgerungen zur Bedeutung von OTA-induzierten DNA-Schäden für in vivo Toxizität und Kanzerogenität zu ziehen.

Ziel dieser Arbeit war deshalb, mit verschiedenen Zellsystemen die Induktion von Zytotoxizität, (oxidativer) DNA-Schädigung und oxidativem Stress in Konzentrations-Wirkungskurven zu untersuchen. Dazu sollten die Zelllinien V79 (Lungen-Fibroblasten, Chinesischer Hamster) und CV-1 (Niere, Meerkatze) eingesetzt werden. Bei V79-Zellen handelt es sich aufgrund ihrer Empfindlichkeit um eine in der in vitro-Toxikologie häufig eingesetzte Zelllinie, die allerdings nicht über nennenswerte metabolische Aktivität verfügt. CV-1-Zellen wurden eingesetzt, weil es sich dabei um eine Nierenzelllinie handelt und die Niere das wichtigste Zielorgan der OTA-Toxizität in vivo ist. Es sollte dabei auch ermittelt werden, in welchen Kon-

zentrationen OTA in der Lage ist, (oxidative) DNA-Schädigung zu induzieren. Durch die vergleichende Untersuchung der verschiedenen Endpunkte im gleichen Zellsystem unter identischen Versuchsbedingungen sollte die Bedeutung der einzelnen toxischen Prozesse für die Toxizität beurteilt werden.

Da intensiv diskutiert wird, ob möglicherweise eine metabolische Aktivierung von OTA für dessen Kanzerogenität eine Rolle spielt, wurden in die Untersuchungen auch metabolisch aktive, primäre proximale Tubuluszellen aus der Rattenniere, die ein wesentliches Zielorgan für die Toxizität in vivo darstellt, einbezogen. Dabei sollte untersucht werden, ob diese Zellen besonders sensitiv auf das Potenzial von OTA zur Induktion (oxidativer) DNA-Schäden reagieren. Zur Gewinnung dieser Zellen war eine Perfusions-Methodik zu erarbeiten und zu etablieren.

Die Induktion (oxidativer) DNA-Schäden sollte weiterhin in Leber- und Nierenzellen aus OTA-behandelten Ratten untersucht werden (Kooperation mit Dr. Turesky, NCTR, Jefferson, AR).

Zytotoxizität sollte anhand der Induktion von Nekrose (Membranintegrität), Apoptose und Wachstumshemmung untersucht werden. Membranintegrität sollte mit dem Trypanblauausschluss-Test, und der Durchflusszytometrie untersucht werden, Apoptose über einen immunchemischen Test und mit Durchflusszytometrie. Wachstumshemmung sollte über die Bestimmung der Zellzahlen und des Lebendproteins gemessen (SRB) werden. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen sollte mittels der alkalischen Einzelzellelektrophorese (Comet-Assay) untersucht, spezifisch oxidative DNA-Schäden über die durch Reparaturenzyme in die DNA eingefügten zusätzlichen Strangbrüche detektiert werden. Mittels eines kinetischen, photometrischen Tests sollte der Glutathiongehalt untersucht werden.

3 Theorie

3.1 Ochratoxin A

3.1.1 Chemische und physikalische Eigenschaften

Bei OTA (IUPAC-Name: N-[[[(3R)-5-Chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl]carbonyl]-3-phenyl-L-alanin, CAS-Nummer: 303-47-9) handelt es sich um ein Isocumarinderivat, über eine Peptidbindung an der Säuregruppe verknüpft mit L-Phenylalanin (Abbildung 2).

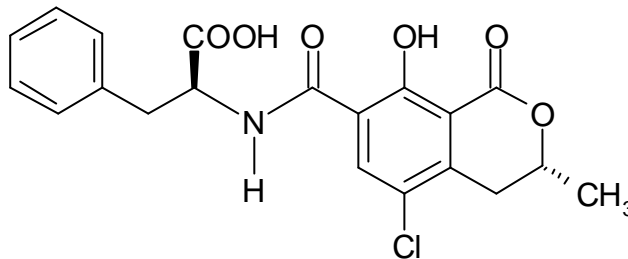
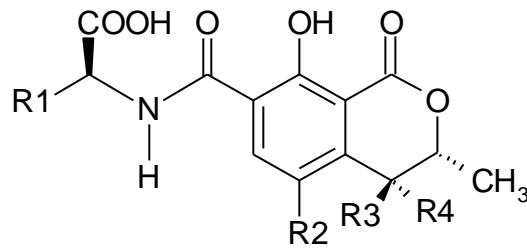


Abbildung 2: Strukturformel von Ochratoxin A (OTA)

Im Folgenden sind die wichtigsten Eigenschaften von OTA dargestellt:

- Summenformel: $C_{20}H_{18}ClNO_6$, Molekülgewicht: 403,8 g/mol
- weiße Kristalle, Schmelzpunkt: 169°C [van der Merwe et al., 1965a,b]
- pKs: 7,1 [Kuiper-Goodman & Scott, 1989]
- Optische Drehung $[\alpha]_D^{21}$: $-46,8^\circ$ [Pohland et al., 1982]
- Spektroskopische Daten: OTA absorbiert elektromagnetische Strahlung mit Absorptionsmaxima bei 214nm, 282nm und 332nm in Methanol. OTA zeigt bei Anregung blaue Fluoreszenz (332 nm_{ex}, 460 nm_{em}) [Pohland et al., 1982; Steyn, 1993b].
- gut löslich in organischen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform, Ethanol, Methanol, Xylol), mäßig in Ammoniumhydrogencarbonatlösung und schlechter löslich in Wasser [Steyn, 1984].

In der Natur treten eine Reihe weiterer OTA-Analoga, wie Ochratoxin B, Ochratoxin α , an der freien Säuregruppe veresterte Derivate, hydroxylierte Ochratoxine und Analoga mit anderen Aminosäuren auf (Abbildung 3) [Marquardt & Frohlich, 1992]



Name	R1	R2	R3	R4
Ochratoxin B (OTB)	L-Phenylalanyl	H	H	H
Ochratoxin C (OTC)	L-Phenylalanyl-Ethylester	Cl	H	H
Ochratoxin α (OT α)	OH	Cl	H	H
Ochratoxin β (OT β)	OH	H	H	H
4(R)-Hydroxy-OTA	L-Phenylalanyl	Cl	H	OH
4(S)-Hydroxy-OTA	L-Phenylalanyl	Cl	OH	H
OTA, Aminosäure-Analog	Aminosäure (Tyr, Ser, Lys, Hyp)	Cl	H	H

Abbildung 3: Strukturen von OTA-Analoga

Eine Totalsynthese von OTA wird in Steyn & Holzapfel [1967], Roberts [1970], sowie in Kraus et al. [1981] beschrieben.

3.1.2 Bildung von OTA

OTA wurde ursprünglich als Metabolit von *Aspergillus ochraceus* beschrieben [van der Merwe et al., 1965a]. Schon bald wurde *Penicillium viridicatum* ebenfalls als Produzent beschrieben [Krogh et al., 1973], spätere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei der OTA-produzierenden Spezies allerdings nicht um *P. viridicatum*, sondern um *P. verrucosum* handelt [Frisvad, 1989; Pitt, 1987]. Weitere OTA-produzierende *Penicillium*-Spezies wurden postuliert, heute scheint aber sicher zu sein, dass *P. verrucosum* die einzige OTA-produzierende *Penicillium*-Spezies ist [IPCS, 2001]. Hinweise zur Biosynthese geben Bacon et al. [1975] und Steyn [1993b].

Bei *P. verrucosum* handelt es sich um eine langsam wachsende Spezies, die allerdings bei relativ niedrigen Wasseraktivitäten (a_w bis 0,80, Optimum: 0,95-0,99) und niedrigen Temperaturen (0-31°C, Optimum: 20°C) Wachstum zeigt. Daher kommt diese Spezies v.a. in kühleren klimatischen Regionen in Nord- und Zentral-europa und Kanada auf gelagertem Getreide, aber auch auf Fleisch und Käse vor.

In wärmeren Regionen wurde diese Spezies bisher nicht nachgewiesen. [IPCS, 2001; Lillehoj & Elling, 1982]

Andererseits sind mehrere OTA-produzierende Aspergillus-Spezies beschrieben. Die meisten Spezies wurden klassifiziert als Aspergillus, Subgenus Circumdati Untergruppe Circumdati. Dazu gehören neben *A. ochraceus* auch *Neopetromyces muricatus* (asexuelle Form von *A. muricatus*), *Petromyces alliaceus* (asexuelle Form von *A. alliaceus*), *A. sclerotiorum* und *A. sulphureus*. Außer *A. ochraceus* sind alle genannten Spezies allerdings von untergeordneter Bedeutung, da sie nur geringe Mengen OTA produzieren oder in Lebens- und Futtermitteln nicht vorkommen [IPCS, 2001]. Ebenfalls als OTA-Produzenten sind *A. carbonarius* und *A. niger* (Klasse Aspergillus, Subgenus Circumdati Untergruppe Nigri) beschrieben, allerdings wurde die OTA-Bildung für *A. niger* nur in reinen Kulturen unter optimalen Kulturbedingungen nachgewiesen [Heenan et al., 1998; Ueno et al., 1991].

A. ochraceus wächst im Temperaturbereich von 8°C bis 37°C mit einem Optimum bei 24-31°C. Die optimale Wasseraktivität liegt bei 0,95-0,99, Wachstum wurde auf zuckerhaltigen Medien aber bis 0,79 nachgewiesen. Diese Spezies zeichnet sich dadurch aus, dass sie im pH-Bereich von 3-10 gut wächst. So wurde *A. ochraceus* in einer Vielzahl von Lebensmitteln, wie Mais, Getreide, Reis, Gewürze, getrocknete Bohnen, Nüsse, Soja, Kaffee, aber auch Fisch (geräuchert und getrocknet) und Fleisch nachgewiesen. [IPCS, 2001; Lillehoj & Elling, 1983; Studer-Rohr et al., 1995a].

3.1.3 Belastungsminimierung

Da OTA überwiegend durch Schimmelpilzbefall während der Lagerung von Lebensmitteln oder -rohstoffen als Kontamination in Lebensmittel auftaucht, ist eine Prävention vor allem durch geeignete Lagerungsbedingungen möglich. Die Lagerung insbesondere von Getreide sollte trocken und bei niedrigen Temperaturen erfolgen. Außerdem ist auf eine gute Durchlüftung zu achten. Lebensmittel, die getrocknet werden und dabei von Schimmelpilzen befallen werden können, sollten möglichst schnell und effektiv getrocknet werden. Unbeschädigte Früchte sind resistent gegen den Befall mit Schimmelpilzen. Insbesondere bei der Herstellung von getrockneten Weintrauben ist aber darauf zu achten, dass bei beschädigten Früchten Wachstum von Schimmelpilzen und so eine Kontamination möglich ist. Um einen Übergang auf tierische Produkte zu vermeiden („carry over“), sollte mög-

lichst kein OTA-haltiges Futter an Schlachttiere verfüttert werden. [Blanc et al., 1998; DFG, 1990; IPCS, 2001]

3.1.3.1 Maßnahmen durch den Gesetzgeber

Aufgrund der Toxizität und Kanzerogenität von OTA ist zum Schutze des Verbrauchers die Festlegung von Höchstmengen oder Grenzwerten für OTA in Lebensmitteln notwendig. Dazu ist es erforderlich, ein akzeptierbares Risiko zu definieren. Bei Substanzen, die ab einem definierten Schwellenwert toxische Effekte zeigen, geht man dabei von der höchsten Dosis aus, die im Tierversuch bei täglicher Gabe keinen Effekt zeigte, dividiert diese durch einen Sicherheitsfaktor und kommt so zu einer akzeptablen täglichen Aufnahmemenge („acceptable daily intake“, ADI) pro Kilogramm Körpergewicht. Der Sicherheitsfaktor dient dazu, Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen den verschiedenen Spezies bzw. zwischen den Individuen innerhalb einer Spezies auszugleichen und liegt i.d.R. bei 100. Über einen so erhaltenen ADI-Wert (der mit sieben multipliziert zu einer tolerierbaren wöchentlichen Aufnahmemenge („provisional tolerable weekly intake“, PTWI) führt), der Konzentration der betrachteten Substanz in Lebensmitteln und Daten über deren Verzehrsmengen lassen sich dann Grenzwerte für diese Substanzen für Lebensmittel festsetzen.

Das JECFA (WHO) setzte 1991 für OTA eine PTWI von 112 ng/kg KG fest. Dieser Wert beruht auf dem NOEL („no observed effect level“) von 8 µg/kg KG pro Tag für Nephropathie in Schweinen. Dieser Wert wurde aufgrund der kanzerogenen Wirkung mit einem Sicherheitsfaktor von 500 belegt [JECFA, 1991]. Dieser PTWI wurde später auf 0,1 µg/kg KG abgerundet [JECFA, 1995]. Es wurde aufgrund der Unkenntnis über den Wirkmechanismus der kanzerogene Wirkung von OTA empfohlen, die Belastung in Lebensmitteln so gering wie möglich zu halten.

In einer Risikoabschätzung kam Kuiper-Goodman auf eine tolerierbare tägliche Aufnahmemenge („provisional tolerable daily intake“, PTDI) von 3,7 ng/kg KG basierend auf der niedrigsten Konzentration, die im Tierversuch Tumoren induziert bei einem relativen Risiko von 1:100.000 [Kuiper-Goodman, 1996]. Die „Nordic Council of Ministers“ kam bei einer Risikoabschätzung basierend auf der Kanzerogenität von OTA zu einem TDI von 5 ng/kg KG [Olsen et al., 1993].

Die Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) der DFG kam am 2./3. Mai 1994 zu folgendem Beschluss:

„Ochratoxin A ist ein Kanzerogen, für das nach neueren Erkenntnissen ein Schwellenwert toxikologisch nicht begründbar erscheint. Aus diesem Grunde sollte nach dem Minimierungsgebot die Aufnahme so gering wie möglich gehalten werden. Nach den vorliegenden Daten empfiehlt die Senatskommission aus Präventionsgründen einen Grenzwert bei Getreide und Getreideprodukten von 3 µg/kg. [...]“ [DFG, 1998]

Seit dem 16. März 2002 gibt es europaweite Höchstgehalte für OTA in bestimmten Lebensmitteln (Tabelle 1) [Europäische Kommission, 2002]. Eine Festlegung von Höchstmengen für andere Lebensmittel, z.B. Kaffee, ist in der Diskussion.

Tabelle 1: Höchstgehalte für OTA in bestimmten Lebensmitteln (Verordnung (EG) Nr. 472/2002

Erzeugnis	Höchstgehalt [µg/kg oder ppb]
Getreide	
Rohe Getreidekörner (incl. Buchweizen, Reis)	5
Getreideerzeugnisse (incl. Getreidekörner zum direkten Verzehr)	3
Getrocknete Weintrauben	10

3.1.4 Vorkommen

OTA wurde in einer Reihe von Lebensmittelrohstoffen und aufgrund seiner Stabilität bei der Lebensmittelverarbeitung auch in prozessierten Lebensmitteln nachgewiesen. Dazu gehören Getreide und Getreideprodukte, Kaffee, getrocknete Weintrauben, Traubensaft und Wein, Kakao, Schokolade, Bier, Nüsse, Bohnen und Gewürze, aber auch Fleisch, Fisch und Milchprodukte.

3.1.4.1 Analytik

Der Nachweis von OTA erfolgt nach Festphasen-Extraktion durch Hochdruckflüssigchromatographie-(HPLC)-Trennung mit Fluoreszenzdetektion. Die erste HPLC-Methode wurde für Mais und Gerste (dotiert mit 10-50 µg/kg OTA) validiert. OTA wurde aus den Proben mit Chloroform/wässriger Phosphorsäure extrahiert, durch Flüssig-flüssig-Verteilung in eine wässrige Bicarbonatphase überführt und an einer C₁₈-Festphasensäule aufgereinigt. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte mittels RP-HPLC („reversed phase“ HPLC, Umkehrphasen-HPLC) und Fluoreszenz-

detektion. [Nesheim et al., 1992] Die Quantifizierungsmethode wurde offiziell für Mais und Gerste mit $>10 \mu\text{g}/\text{kg}$ OTA anerkannt (AOAC International Official Method 991.44). Diese Methode wurde weiter validiert für andere Getreide und niedrigere Konzentrationen an OTA ($<2 \mu\text{g}/\text{kg}$) und vom Europäischen Komitee für Standardisierung (CEN, technical committee 275/WG5 „Biotoxins“) als Messmethode für Mais, Gerste und Weizenkleie anerkannt (EN ISO 15141-2). [IPCS, 2001; LMBG, 1999b; Larsson & Moeller, 1996]

Eine weitere HPLC-Methode wurde als CEN-Standardmethode für Weizenvollkornmehl anerkannt (EN ISO 15141-1) [Majerus et al., 1993]. OTA wurde mit einem Gemisch aus Toluol, Salzsäure und Magnesiumchloridlösung aus den Proben extrahiert und an Mini-Silikagelsäulen aufgereinigt und nach RP-HPLC-Auftrennung mit Fluoreszenzdetektion quantifiziert. Diese Methode scheint ebenfalls gut anwendbar zu sein auf andere Getreide, getrocknete Früchte, Ölsamen, Hülsenfrüchte, Wein, Bier, Fruchtsäfte und Rohkaffee [Jiao et al., 1992, 1994; LMBG, 1999a].

Eine Weiterentwicklung der Analytik besteht in der Aufreinigung der Extrakte an Immunaффinitätssäulen auf Basis von Antikörpern gegen OTA. So wurde eine Methode für Gerste und gerösteten Kaffee entwickelt, bei der das Mykotoxin durch ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser aus den Proben extrahiert wird, die gefilterte Probe mit phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt und auf einer Immunaффinitätssäule gereinigt wird. Um bei der Analyse von geröstetem Kaffee Fehler durch Koffein auszuschließen, wurde als Zwischenschritt eine Phenylsilanextraktion eingeführt. Die Messung erfolgt wieder auf der Basis von RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Die Validierung wurde für Proben mit $1,2\text{-}3,7 \mu\text{g}/\text{kg}$ OTA durchgeführt. [Entwistle et al., 2000, 2001] Die Methode steht vor der Akzeptierung als CEN-Standardmethode [IPCS, 2001]. Für Wein, insbes. Rotwein entwickelten Zimmerli und Dick eine Methode, bei der OTA aus der Probe mit Chloroform extrahiert, dann an Immunaффinitätssäulen aufgereinigt und per RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion vermessen wird [Zimmerli & Dick, 1995]. Diese Methode wurde weiterentwickelt, so dass OTA aus flüssigen Proben, wie z. B. auch Bier, nach Verdünnung mit einer wässrigen Lösung von Polyethylenglykol und Natriumhydrogencarbonat direkt an Immunaффinitätssäulen extrahiert wird [Visconti et al., 2000]. Auch diese Methode soll als CEN Standardmethode anerkannt werden [IPCS, 2001].

Es sind weitere Analysemethoden auf Basis von Dünnschichtchromatographie, die allerdings den Nachteil haben, nur semiquantitativ zu arbeiten und ELISA-Methoden zur Quantifizierung in Fleisch, Blut und anderen Körperflüssigkeiten beschrieben, deren Zuverlässigkeit noch überprüft werden muss. Ein Problem hierbei

ist, dass die verwendeten Antikörper Kreuzreaktionen mit OTA-ähnlichen Strukturen zeigen. [IPCS, 2001; Kawamura et al., 1993]

3.1.4.2 Kontamination von Lebensmitteln

Zur Belastung von Lebensmitteln sollen hier exemplarisch zwei Studien umfassender vorgestellt werden: eine Zusammenfassung der weltweit verfügbaren Daten durch die WHO und eine in Deutschland von 1996-1999 durchgeführte Studie im Auftrag des ehemaligen BMG.

Das „Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“ (JECFA) hat für seine Sicherheitsbewertung von OTA eine Auswertung der weltweit vorhandenen Daten über die Kontamination von Lebensmitteln vorgenommen. OTA wurde in zahlreichen verschiedenen Lebensmitteln nachgewiesen: Getreide und Getreideprodukte, grüner und gerösteter Kaffee, getrocknete Früchte, Wein, Traubensaft, Kakao und Schokolade, Kräuter und Gewürze, Dosenfrüchte, Öle, Oliven, Hülsenfrüchte, Kichererbsen, Linsen, Sojaprodukte, Süßwaren, Milch und Milchprodukte, Fleisch, Leber, Bier, Tee, Essig, Senf, Säuglings- und Kleinkindnahrung.

Insgesamt wurden in die Auswertung über 23.000 Lebensmittelproben einbezogen, von denen 85% aus Europa stammen, 7% aus Südamerika, 6% aus Nordamerika, 1% aus Afrika und 1% aus Asien. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Anzahl der Proben, die pro Lebensmittel (-gruppe) untersucht wurden und über deren mittlere Belastung.

Der Anteil OTA-positiver Proben variiert in den Studien stark mit der Nachweisgrenze der verwendeten analytischen Methode, da OTA-Kontaminationen häufig im niedrigen $\mu\text{g}/\text{kg}$ Bereich auftreten. Auch die Konzentration an OTA schwankt stark, so wiesen insgesamt 1,4 % bzw. 0,6 % der Proben Gehalte $>5 \mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $>20 \mu\text{g}/\text{kg}$ auf. Bei den Getreideprodukten waren die relativen Anteile geringer (0,3 % bzw. 0,05 %). [IPCS, 2001]

Deutlich erhöhte Gehalte ($> 50 \mu\text{g}/\text{kg}$) wurden in Proben unterschiedlicher Herkunft gefunden, so z.B. in Weizenproben (Finnland, Dänemark, Kroatien), Hafer (Finnland, Dänemark), Gewürzen (Großbritannien), getrockneten Weintrauben (Großbritannien) und Humanmilch (Sierra Leone) [Jonsyn et al., 1995; Jorgensen et al., 1996; MacDonald et al., 1999; Patel et al., 1996; Solfrizzo et al., 1998]. In einem Extremfall, in Tunesien fand man Gehalte von $33.000 \mu\text{g}/\text{kg}$ in Weizenproben [Maaroufi et al., 1995]. In Hausstaub aus Haushalten, in denen die endemische Balkannephropathie

(BEN) auftrat, wurden ebenfalls extrem hohe OTA-Gehalte gemessen ($\leq 1600 \mu\text{g}/\text{kg}$) [Richard et al., 1999].

Tabelle 2: Mittlere OTA-Konzentration in Lebensmittelproben (Zusammenfassung der weltweiten Datenlage bis 2000) nach [IPCS, 2001]

Erzeugnis	Probenanzahl	Mittlere Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Bier	660	0,025
Getreide (gesamt)	2700	0,94
Gerste	350	0,53
Mais	95	7,5
Hafer	280	0,44
Reis	45	0,06
Roggen	790	1,2
Weizen	1200	0,38
Getreideprodukte	1500	0,19
Kakao und Schokolade	270	0,18
Kaffee (grün und geröstet)	1900	0,86
Grüner Kaffee	130	1,0
Gerösteter Kaffee	1700	0,76
Instantkaffee	290	1,4
Getrocknete Weintrauben	860	2,3
Traubensaft	68	0,44
Wein (gesamt)	1800	0,32
Rotwein	1300	0,4
Weißwein	260	0,1
Fleischprodukte	810	0,052
Schweinenieren	380	0,12

Eine Aussage über eine geographische Verteilung der Kontamination von Lebensmitteln mit OTA weltweit ist aufgrund der Herkunft der Proben nicht möglich. So scheint z.B. Kaffee weltweit in vergleichbarem Maße belastet zu sein, Getreide und Getreideprodukte sind vermutlich auch außerhalb Europas deutlich belastet, obwohl über die Belastung in anderen Erdteilen nur sehr lückenhaft Daten vorhanden sind [Jonsyn et al., 1995; Trucksess et al., 1999; Wolff et al., 2000a, b]. Generell ist anzumerken, dass immer dann, wenn die klimatischen oder geographischen Bedingungen (Schattenstandorte, feuchtes Klima, unzureichende Belüftung oder Trocknung, erhöhter Niederschlag, etc.) ein erhöhtes Schimmelpilzwachstum erwarten lassen, mit einer erhöhten Kontamination von Lebensmitteln durch Mykotoxine zu rechnen ist [DFG, 1990; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002b].

Von 1996 bis 1999 wurden in einer Studie im Auftrag des Bundesgesundheitsministeriums in Deutschland 6.476 Lebensmittelproben auf OTA untersucht.

Das Mykotoxin wurde in 57,2 % der Proben nachgewiesen, mit mehr als 5 µg/kg waren 0,5 % der Proben belastet. Von 2.347 Getreide- und Getreideproduktproben waren 68,6 % mit OTA belastet, 1,4 % wiesen Gehalte über 3 µg/kg, 0,8 % Gehalte über 5 µg/kg auf. In 50 % der 357 untersuchten Kaffeeproben wurde OTA mit Gehalten bis zu 9,5 µg/kg gefunden, ebenso wurde im Mittel 0,05 µg/kg OTA in 50 % der untersuchten Bierproben detektiert (n = 318). In 40 % der untersuchten Weinproben wurde OTA gefunden, der Maximalgehalt lag bei 7 µg/kg, auch Weinessige waren deutlich belastet. OTA wurde auch in Proben tierischer Herkunft nachgewiesen, vor allem in Produkten vom Schwein, die Leber und Niere enthielten. Rindfleisch und Milch, sowie Geflügelfleisch war weitgehend OTA-frei. Zu einer Kontamination von Milchprodukten kommt es in erster Linie durch den Zusatz von Getreideprodukten, Gewürzen und Trockenfrüchten. [Bresch et al., 2000; Engel, 2000; Gareis & Scheuer, 2000a; Majerus et al., 2000; Wolff, 2000a]

3.1.4.3 Einfluss der Lebensmittelverarbeitung

Der Einfluss der Verarbeitung von Lebensmitteln auf den OTA-Gehalt wurde vor allem an Getreideprodukten und Kaffee untersucht. Aus Modellversuchen ist allerdings bekannt, dass OTA nicht nennenswert durch Bedingungen, wie sie beim Kochen herrschen, zerstört wird [Kostecki et al., 1991].

Eine Studie mit Weizenmehl zeigte, dass OTA in Abhängigkeit von der Temperatur erst nach sehr langen Zeiträumen zu 50 % abgebaut wurde (z.B. bei 100 °C nach 700 min) [Boudra et al., 1995]. Beim Mahlprozess werden durch das Entfernen der Kleie bis zu 50 % des vorhandenen OTAs entfernt, beim Backprozess erneut bis zu 10 %. Bei der Herstellung von Vollkornbrot hingegen werden durch das Mahlen nur ca. 10 % und durch das Backen nur ca. 4 % des Mykotoxins entfernt [Osborn et al., 1996].

Es ist beschrieben, dass durch den Röstprozess und die weitere Aufreinigung der Kaffeerohware die OTA-Gehalte in Kaffee um bis zu 80 % gesenkt werden können [Blanc et al., 1998; Micco et al., 1989]. Die Untersuchung von grünen Kaffeekirschen, die unter Laborbedingungen mit Schimmelpilzen inkubiert wurden und dadurch sehr hohe Gehalte an OTA aufwiesen, wurde hingegen nur eine geringe Dekontamination durch den Röstprozess beobachtet [Studer-Rohr et al., 1995]. Die Dekoffeinierung stellt einen sehr effektiven Mechanismus der OTA-Reduktion dar, so wurden 92 % des OTA bei dem Prozess entfernt [Heilmann et al., 1999].

Eine Dekontamination von Lebensmitteln ist weiterhin durch Bestrahlung mit ionisierender Strahlung möglich, die allerdings nur für Gewürze zugelassen ist [Kostecki et al., 1991]. Des Weiteren ist eine Dekontamination durch Behandlung mit Ammoniak oder durch Ozon beschrieben. Diese Methoden könnten zur Dekontamination von Futtermitteln eingesetzt werden, die Behandlung von z.B. Futtermitteln mit Ammoniak verringert allerdings die Palatabilität und die Behandlung mit Ozon erfordert die technisch schwierige Generation großer Mengen Ozons. [Kuiper-Goodman & Scott, 1989; McKenzie et al., 1997]

3.1.5 Humane Belastung

OTA lässt sich in einer Vielzahl von humanen Proben nachweisen (Tabelle 3). Zum größten Teil ist die Ursache für die Belastung des Menschen die Aufnahme über Lebensmittel. Daneben kann OTA aber auch über die Luft aufgenommen werden, was in der lebensmittelverarbeitenden Industrie (z.B. Getreidemühlen, Kaffeeröstereien) und bei belasteten Hausstäuben eine Rolle spielt. [Breitholtz-Emanuelsson et al., 1995; Iavicoli et al., 2002; Richard et al., 1999]. Einen Überblick über die Datenlage bis 1994 gibt außerdem Studer-Rohr et al. [1995b].

Tabelle 3: OTA-Gehalte in humanen Serumproben und Muttermilch

OTA [ng/ml]		Referenz	Bemerkungen
Serum	Milch		
0,1-0,94	<0,04	Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993b	Italien, 23/40 positiv (Milch), 40/40 positiv (Serum)
0,53		Breitholtz-Emanuelsson et al., 1994	Italien, Probanden (65), Patienten mit Nierenkrankheiten (68)
5-100		Fuchs et al., 1991	Kroatien, 0,4-2,5 % positiv, Endemiegebiete
5-50		Fuchs et al., 1991	Kroatien, 0,4-3,7 % positiv, Nicht-Endemiegebiete
0,29		Filali et al., 2002	Marokko, 185/309 positive Proben
	<0,03	Gareis et al., 1988	Deutschland, 4/36 positive Proben
0,5/1,0		Grosso et al., 2003	Tunesien, Probanden/Nephropathiepatienten
0,1-14,4		Hadlock, 1993	Deutschland, 68 % positive Proben
1-40		Hult et al., 1982	Jugoslawien, 7 % positive Proben
1-3,3		Iavicoli et al., 2002	Italien, OTA-exponierte Arbeiter
0,03-1		Iavicoli et al., 2002	Italien
	7,9	Jonsyn et al., 1995	Sierra Leone
0,1		Kawamura et al., 1993	Japan, 19/20 positive Proben
0,1-2,3		Maaroufi et al., 1995	Tunesien, Probanden
<1136		Maaroufi et al., 1995	Tunesien, Nephropathiepatienten
0,27	<0,06	Rosner et al., 2000	Deutschland (1996-1998), 909/927 positive Proben
	1,2-6,6	Micco et al., 1991	Italien, 9/50 positive Proben
	0,1-12	Miraglia et al., 1993	Italien, 22/111 positive Proben
0,39		Peraica et al., 1999	Kroatien, 148/249 positive Proben
8-27,2		Petkova-Bocharova et al., 1991	Bulgarien, Probanden und Nephropathiepatienten
2-50		Radic et al., 1997	Kroatien, 4,5 % > 2 ng/ml, Endemiegebiete
2-10		Radic et al., 1997	Kroatien, 2,4 % > 2 ng/ml, Nicht-Endemiegebiete
0,2		Thuvander et al., 2001	Schweden

3.1.5.1 Abschätzung der OTA-Aufnahme

Die durchschnittliche Aufnahme lässt sich über Verzehrdaten und OTA-Konzentrationen in Lebensmitteln abschätzen. Auf einem FAO/WHO-Workshop wurde eine solche Abschätzung für Europa vorgenommen [IPCS, 2001]. Die wöchentliche Aufnahme an OTA liegt demnach bei ca. 45 ng/kg KG. Davon stammen ca. 56 % aus Getreide/-produkten, 22 % aus Wein und je 5 % aus Traubensaft und Kaffee. Fleisch trägt mit 3 % zur Aufnahme bei (hierbei handelt es sich möglicherweise um eine Überschätzung, da die Kontamination von Niere und Leber und die Verzehrsmengen von Schweinefleisch zugrunde gelegt wurden), alle übrigen Lebensmittelgruppen (getrocknete Früchte, Bier, Tee, Milch, Kakao, Geflügel und Hülsenfrüchte) haben nur einen kleinen Anteil an der Aufnahmemenge. [IPCS, 2001]

In einer im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit in Deutschland durchgeführten Studie wurden 2.579 humane Serumproben auf OTA untersucht. Über die gleichzeitig erhobenen Daten der Kontamination von Lebensmitteln wurde eine Abschätzung der OTA-Aufnahme für Deutschland vorgenommen. Aus den Verzehrdaten und den OTA-Konzentrationen in den Lebensmitteln ergab sich eine wöchentliche Aufnahme von ca. 4 ng/kg KG (Erwachsene), für Kinder eine wöchentliche Aufnahme von 5-9 ng/kg KG. Eine herausragende Belastung von Bevölkerungsgruppen mit besonderen Ernährungsgewohnheiten (z.B. Vegetarismus) wurde nicht festgestellt. Für die Aufnahme sind v.a. Getreide/-produkte verantwortlich (50 %), für Erwachsene aber auch Kaffee (15 %) und Bier (10 %), bei Kindern rote Traubensäfte (15 %) und Süßwaren/Knabbereien (10 %). Die OTA-Aufnahme wurde zusätzlich aus den Serumgehalten abgeschätzt. Der erhaltene Wert von 3 ng/kg KG pro Woche stimmt gut mit der Abschätzung über die Verzehrsmengen überein, so dass davon auszugehen ist, dass die humane Belastung in Deutschland tatsächlich sehr gering ist. [Gareis et al., 2000b; Cholmakov-Bodechtel et al., 2000; Wolff et al., 2000b]

3.1.6 Toxikokinetik

3.1.6.1 Resorption

Aufgrund der aziden Eigenschaften von OTA wurde zunächst eine Resorption schon im Magen angenommen [Galtier et al., 1991; Roth et al., 1988]. Untersuchungen an Tieren mit ligierten, gastrointestinalen Schleifen zeigten jedoch, dass das proximale Jejunum Hauptort der Resorption ist. Die Resorption des ungeladenen und so lipophilen Moleküls erfolgte dabei auch gegen einen Konzentrationsgradienten und hing vom pH-Wert im Jejunum und der Mukosa ab. [Kumagai & Aibara, 1982; Kumagai, 1988]

Versuche mit niedrigen Dosen radioaktiv markierten [³H]-OTAs an Mäusen wurden von den Autoren als Aufnahme aus dem Magen interpretiert, können aber auch nach schnellem Transfer aus dem Magen in den Darm als Aufnahme aus dem proximalen Jejunum interpretiert werden. Die gleichzeitige Gabe von Phenylalanin im molaren Verhältnis zu OTA von 10:1 führte zu einer deutlich erhöhten Resorption von OTA, was auf eine mögliche Verdrängung von gebundenem OTA aus Lebensmitteln zurückgeführt wurde. [Roth et al., 1988]

Nach oraler Gabe von OTA über fünf Wochen in Dosen von 20 und 40 µg/Tag an Schweine (250 kg) wurde das Mykotoxin bei beiden Dosisgruppen im Plasma und in der Samenflüssigkeit nachgewiesen [Solti et al., 1999]. Von einer oral gegebenen OTA-Menge wurde in Schweinen 66 %, in Ratten und Kaninchen 56 % und in Hühnern 40 % resorbiert [Suzuki et al., 1977; Galtier et al., 1981].

Nach Gabe von OTA an verschiedene Spezies (Ratte, Maus, Wachtel) i.p., i.v. oder i.m., wurde eine schnelle biliäre Ausscheidung beobachtet. Das Mykotoxin kann bei der nachfolgenden Passage des Dünndarms erneut resorbiert werden und unterliegt so einem enterohepatischen Kreislauf [Fuchs et al., 1988; IPCS, 2001; Moroi et al., 1985; Roth et al., 1988]. Die Gabe von Cholestyramin (1-5 %, p.o.) parallel zur Gabe von 1 oder 3 ppm OTA im Futter verringerte die Serumkonzentration von OTA, sowie dessen renale und biliäre Ausscheidung. Der OTA-Gehalt im Fäzes hingegen war erhöht. Die Autoren vermuteten, dass Cholestyramin die OTA-Aufnahme inhibiere [Kerkadi et al., 1998]. In nachfolgenden in vitro-Experimenten zeigten die Autoren, dass Cholestyramin OTA und Gallensalze binden kann. Sie schlussfolgerten, dass durch das Ionenaustauscherharz der enterohepatische

Kreislauf unterbrochen wird und es so zur Depletion von OTA aus dem Plasma kommt [Kerkadi et al., 1999].

Nach intratrachealer Gabe von 50 µg/kg KG OTA an Ratten wurde eine nahezu vollständige Aufnahme von OTA gezeigt. Die weitere Toxikokinetik war unverändert. [Breitholtz-Emanuelsson et al., 1995]

3.1.6.2 Ausscheidung

Für die Ratte, wie auch andere Spezies, spielen sowohl die biliäre als auch die renale Ausscheidung von OTA eine Rolle, da es mit seinem Molekulargewicht von 403,8 g/mol in dem Bereich liegt, für den beide Ausscheidungswege relevant sind (350-450 g/mol). Zudem hängt der Ausscheidungsweg von der Route und gegebenen Dosis ab, aber auch von Speziesunterschieden in Proteinbindung und enterohepatischem Kreislauf [Hagelberg et al., 1989; Kuiper-Goodman & Scott, 1989].

Im Urin von Ratten wurden OT α (25-27 % der oral gegebenen Dosis), OTA (6 %) und 4(R)-Hydroxy-OTA (1-1,5 %) gefunden, im Fäzes 9 % OT α , 12 % OTA und Spuren von 4(R)-Hydroxy-OTA [Storen et al., 1982]. Das Auftreten von OT α im Urin könnte auf eine Reabsorption von OT α aus den Darm zurückzuführen sein [Sreemannarayana et al., 1988]. In einer anderen Studie an Ratten wurden 33 % einer oral gegebenen Menge OTA mit der Galle ausgeschieden, OT α wurde hingegen nur in Spuren gefunden [Suzuki et al., 1977]. Eine Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital erhöhte die biliäre Ausscheidung von OTA und verringerte die Ausscheidung von OT α [Moroi et al., 1985]. Nach i.p. Gabe von OTA an Ratten wurden nur Spuren von OTA und OT α im Fäzes detektiert [Storen et al., 1982].

Kälber schieden 80-95 % einer oral gegebenen OTA-Dosis in Form von OT α v.a. über den Urin aus [Sreemannarayana et al., 1988]. Dies könnte auf die bakterielle Spaltung von OTA im Pansen und Resorption von OT α zurückzuführen sein.

3.1.6.3 Verteilung

Im Blut wird OTA schnell an Serumalbumin und andere Proteine gebunden, Erythrozyten hingegen enthalten nur Spuren von OTA [Galtier et al., 1991, 1980; Hult & Fuchs, 1986]. Das Mykotoxin liegt nur in sehr geringen Mengen ungebunden im Plasma vor (Mensch: 0,02 %, Affe: 0,08 %, Schwein und Maus: 0,1 %, Fisch: 22 %) [Hagelberg et al., 1989].

Die Dissoziationskonstante für die Bindung an Serumalbumin beträgt $7,1 \times 10^4$ für Schweine, $5,1 \times 10^4$ für Hühner und $4,0 \times 10^4$ für Ratten [Galtier et al., 1981]. Die Bindung an Makromoleküle und Albumin hat eine Speicherwirkung zur Folge, die Eliminierung über Leber und Niere wird verlangsamt und OTA einen längeren Zeitraum akkumuliert [Galtier et al., 1991; Hult et al., 1982; Kumagai, 1985]. OTA zeigte außerdem eine sehr hohe Affinität zu einem 20 kDa Serumprotein (Assoziationskonstante: $2,3 \times 10^{10}$ (Mensch), $0,59 \times 10^{10}$ (Schwein)), das bei einer OTA-Konzentration von 10-20 ng/mL Serum sättigbar war. [Hult & Fuchs, 1986; Stojkovic et al., 1984]

Nach einmaliger oraler Gabe wurde die maximale Serumkonzentration in Schweinen und Ratten nach 10-48 h gemessen [Suzuki et al., 1977; Galtier, 1991; Galtier et al., 1981; Mortensen et al., 1983a, b], in Kälbern nach 2-4 h [Sreemannarayana et al., 1988], nach 1 h in Kaninchen und nach 0,33 h in Hühnern [Galtier et al., 1981]. Die biologischen Halbwertszeiten unterscheiden sich zwischen den Spezies sehr stark (Tabelle 4). Dies könnte auf Unterschiede in der Absorptionsgeschwindigkeit, der maximalen Serumkonzentration und der unterschiedlichen Bindung an Makromoleküle zurückzuführen sein.

Tabelle 4: Biologische Halbwertszeit von OTA in verschiedenen Spezies

Spezies	Halbwertszeit [h]	Referenz
Schwein	72-120	Galtier et al., 1991; Mortensen et al., 1983a, b
Kalb	77	Sreemannarayana et al., 1988
Ratte	55-127	Breitholtz-Emanuelsson et al., 1995; Galtier et al., 1979; Hagelberg et al., 1989
Maus	38	Galtier et al., 1991
Wachtel	6,7	Hagelberg et al., 1989
Huhn	4,1	Galtier et al., 1981
Affe (Macaca mulata)	510	Hagelberg et al., 1989
Mensch	840	Schlatter et al., 1996

In Ratten wurde OTA 24 h nach intravenöser Gabe (in absteigenden Konzentrationen) in Lunge, Nebenniere, Haut, Leber, Myokard, Niere, Speicheldrüse, Muskelgewebe, Darmschleimhaut und Knochenmark gefunden [Breitholtz-Emanuelsson et al., 1982, 1992]. In anderen Studien ergab sich die Gewebeverteilung in Schwein, Ratte und Huhn wie folgt: Niere > Leber/Muskel > Fettgewebe [Madsen et al., 1982; Mortensen et al., 1983a]. Untersuchungen an Hühnern und Wachteln zeigten, dass OTA nach Gabe hoher Dosen in die Eier eingelagert werden kann [Fuchs et al., 1988; Krogh et al., 1976a; Piskorska-Pliszczynska & Juskiewicz, 1990].

Laktierende Ratten, denen einmalig oral 250 µg/kg KG OTA gegeben wurden, schieden OTA über die Milch aus. Die gesäugten Jungen nahmen das OTA aus der Milch linear in Abhängigkeit von der OTA-Konzentration in der Milch auf. Auffallend dabei war, dass in Serum und Niere der Jungen höhere OTA-Konzentrationen gemessen wurden als in den Muttertieren. Die Ausscheidung über die Muttermilch ist also ein effektiver Eliminationsweg für OTA [Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993a]. Ein Übergang von OTA in die Muttermilch wurde auch für Kaninchen [Ferrufino-Guardia et al., 2000] und Menschen gezeigt (s. Kap. 3.1.5).

Studien zeigten außerdem, dass OTA in Mäusen und Ratten nach oraler Gabe die Plazentarschranke überwindet und in den Föten angereichert wird [Appelgren & Aro-ra, 1983; Fukui et al., 1987; Hallen et al., 1998]. Die Datenlage für den transplazentaren Übergang von OTA auf Föten im Schwein sind widersprüchlich, eine Exposition der Föten im Mutterleib ist aber wahrscheinlich [Barnikol & Thalmann, 1988; Mortensen et al., 1983].

3.1.6.4 Metabolismus

Über den Metabolismus im Menschen liegen keine Daten vor, es wurden aber zahlreiche Studien an Tieren durchgeführt. Ein wichtiger Schritt im Metabolismus ist die Spaltung der peptidischen Bindung durch die bakterielle Mikroflora [Galtier et al., 1991]. Entscheidend sind dabei die Enzyme Carboxypeptidase A und Chymotrypsin [Pitout, 1969]. Eine Inhibierung der interstitiellen Mikroflora z.B. durch Antibiotika führte zu einer Abnahme von OT α im Fäzes und einer erhöhten OTA-Serumkonzentration [Madhyastha et al., 1992]. In Ratten ist diese Reaktion v.a. im Blinddarm beobachtet worden, in Wiederkäuern findet sie v.a. im Pansen statt [Galtier et al., 1991]. Die Umsetzung im Pansen erfolgt sehr effektiv, so dass Kühe als resistent gegenüber OTA-Toxizität angesehen werden [Hult et al., 1976]. Schafe zeigen ebenfalls eine hohe Kapazität für diese Reaktion [Kiesling et al., 1984]. Untersuchungen an Gewebehomogenaten von Ratten zeigten, dass die Spaltung zu OT α auch im Duodenum, Ileum und Pankreas, nicht aber in Leber und Niere stattfindet [Galtier et al., 1979; Hansen et al., 1982; Suzuki et al., 1977]. In der Leber von Kaninchen wurde diese Reaktion ebenfalls nicht beobachtet [Stormer et al., 1983].

In deutlich kleineren Mengen treten im Urin auch die CYP 450-abhängig hydroxylierten, weniger toxischen Metabolite, 4(R)-Hydroxy-OTA und 4(S)-Hydroxy-OTA, auf, die in Leber von Ratte und Kaninchen und in der Niere in der Ratte gebildet werden [Stein et al., 1985; Stormer et al., 1981, 1983]. Die Bildung von 4(R)-Hydroxy-

OTA wurde v.a. durch Lebermikrosomen aus Ratte und Mensch gezeigt, das 4(S)-Epimer v.a. in Lebermikrosomen aus Schweinen [Moroi et al., 1985; Stormer et al., 1981]. In jüngeren Untersuchungen wurde gezeigt, dass beide Epimere in sehr niedrigen Mengen durch Lebermikrosomen aus Ratte und Maus gebildet wurden, durch Nierenmikrosomen aber keine Oxidation von OTA stattfand [Gautier et al., 2001a; Zepnik et al., 2001]. In diesen Studien wurde auch die Bildung von 4(R)-OH-OTA durch rekombinante CYP 450 untersucht. Beide Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass hCYP 450 3A4 an der Umsetzung beteiligt ist. In jeweils einer der Studien wurde auch die Beteiligung der hCYP 450 1A1 und 2C9 gezeigt, widersprüchlich waren die Ergebnisse bzgl. einer Beteiligung von hCYP 450 1A2. Eine Oxidation von OTA durch hCYP 450 2E1, rCYP 450 1A2 und 2C11 (spezifisch für männliche Ratten) wurde nicht gezeigt [Gautier et al., 2001].

Das 10-Hydroxy-OTA wurde durch Kaninchenlebermikrosomen gebildet, wurde aber bisher in keiner anderen Spezies nachgewiesen [Stormer et al., 1983]. OTC, das als Metabolit im Pansen gebildet werden kann, zeigt mit OTA vergleichbare Toxizität [Galtier et al., 1981], OTB wird in Ratten zu OT β gespalten [Stormer et al., 1985]. Bei analytischen Untersuchungen von Ausscheidungen von Versuchstieren wurden weitere Metabolite gefunden, darunter möglicherweise einer mit offenem Laktoring, die aber bisher nicht eindeutig identifiziert wurden [Fink-Gremmels et al., 1993a,b; Galtier et al., 1979; Grosse et al., 1995a, b; Li et al., 2000; Oster et al., 1991]. Auch die Bildung einer chinoiden Spezies wurde postuliert, bisher aber nicht nachgewiesen [Calcutt et al., 2001; Gillman et al., 1999]. Abbildung 4 gibt einen Überblick über den Metabolismus von OTA, einschließlich postulierter Metabolismuswege.

Konjugationsreaktionen mit OTA oder seinen Metaboliten sind ebenfalls beschrieben. So wurden nach Inkubation von Kulturen primärer Rattenhepatozyten ein Hexose- und ein Pentosekonjugat von OTA, nicht aber Konjugate mit Sulfat oder Glutathion identifiziert. Die Konjugation erfolgt an der freien Säuregruppe des L-Phenylalanylrestes. Auch in primären humanen Hepatozyten wurde in sehr kleinen Ausbeuten möglicherweise ein Hexosekonjugat gebildet [Gross-Steinmeyer et al., 2002]. Ausgehend von der Hydrochinonspezies wurde in zellfreien Systemen ein OTA-Glutathion-Addukt gebildet (Meerettichperoxidase/ H₂O₂; Rattenlebermikrosomen/ NADPH; freies Eisen(II) mit 100 μ mol/L OTA und 5 mmol/L GSH) [Dai et al., 2002]. Die Konjugation von Hydrochinonen mit GSH kann möglicherweise zu einer verstärkten Toxizität führen [Lau et al., 2001]. Versuche mit Nierenmikrosomen von Kaninchen, einer humanen Lungenepithelzelllinie und Hefemikrosomen deuteten an, dass die DNA-Adduktbildung durch Glutathion-S-transferase-abhängigen Metabolismus verstärkt wird [El Adlouni et al., 2000]. Auch nach Studien an E. coli wurde

die Bildung eines thiolhaltigen, zytotoxischen Derivates postuliert [Malaveille et al., 1991]. Die Bildung eines GSH-Konjugates mit OTA in vivo oder in Zellsystemen wurde allerdings bisher nicht gezeigt [Gautier et al., 2001a; Zepnik et al., 2001]

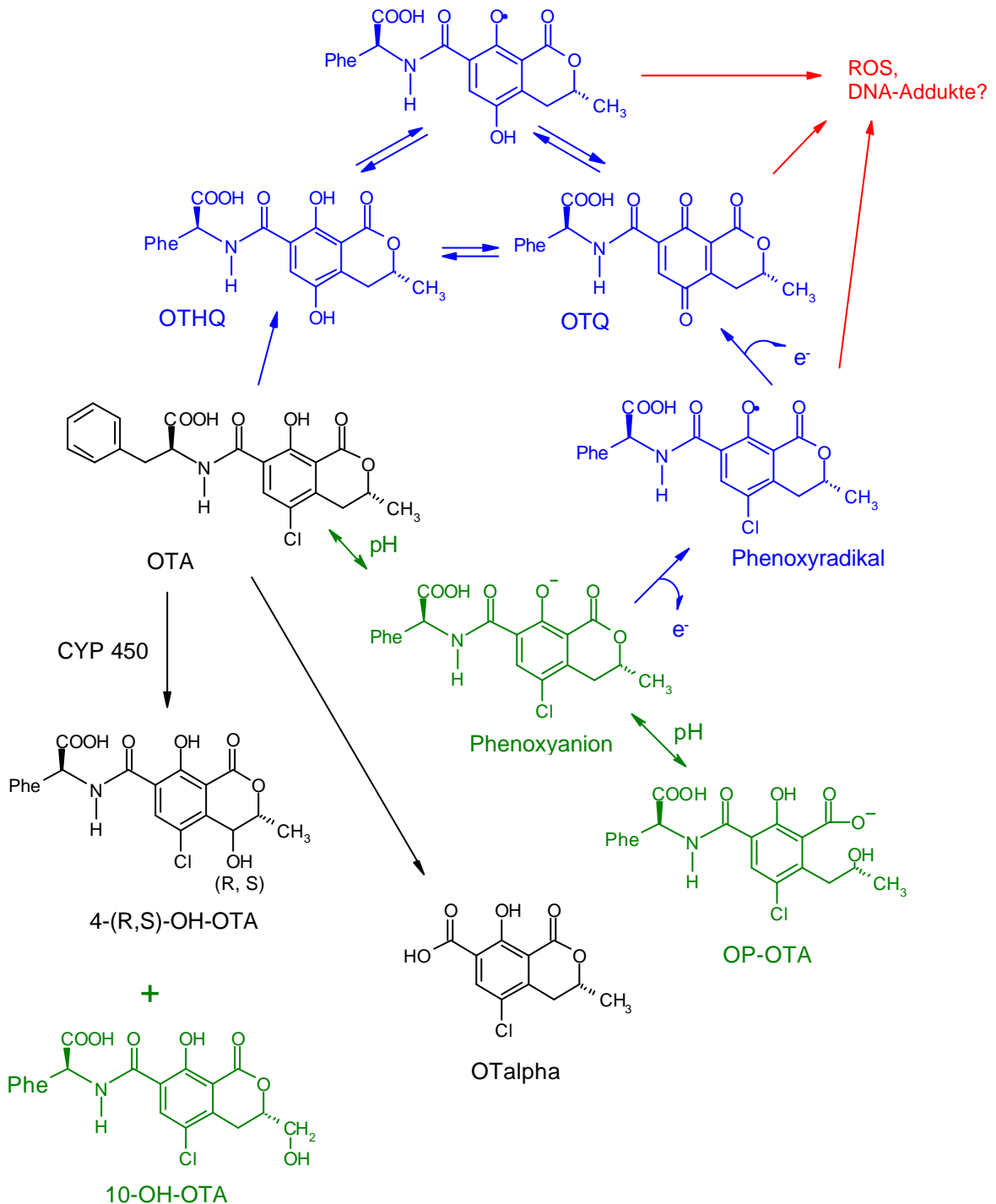


Abbildung 4: Metabolismus von OTA. Blaue Reaktionswege sind postuliert, grüne Reaktionswege sind durch Hinweise untermauert, jedoch noch nicht endgültig nachgewiesen, rote Reaktionswege zeigen mögliche toxische Konsequenzen an. Modifiziert nach [Pfohl-Leszkowicz et al., 2002a]

Durch die bisher durchgeführten Studien, kann die Vermutung, dass die Toxizität, insbesondere die Kanzerogenität auf einen reaktiven Metaboliten zurückzuführen sei, nicht bestätigt werden. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass nach Vorbehandlung von Mäusen mit Phenobarbital, einem Induktor für CYP 450-abhängigen Metabolismus, die LD₅₀ ansteigt [Chakor et al., 1988; Moroi et al., 1985]. In einer weiteren Studie wurde im Gegensatz dazu allerdings gezeigt, dass unter diesen Bedingungen die Inzidenz für Hepatome deutlich erhöht war [Suzuki et al., 1986].

3.1.7 Toxikologie

3.1.7.1 Akute Toxizität

Die beobachteten LD₅₀-Werte für verschiedene Spezies und deren Applikationswege, sowie die zugehörige Literatur sind in Tabelle 5 angegeben. Ratten und Mäuse zeigten die geringste Empfindlichkeit (13-58 mg/kg KG), Hunde und Schweine hingegen reagierten deutlich sensibler (= 1 mg/kg KG). OTA ist somit als giftig bis sehr giftig einzuordnen. Die gleichzeitige Gabe von 100 mg/kg KG Phenylalanin erhöhte die LD₅₀ in Mäusen von 46 auf 71 mg/kg KG [Moroi et al., 1985].

Tabelle 5: LD₅₀-Werte für OTA in verschiedenen Spezies

Spezies	LD ₅₀ (mg/kg KG)			Referenz
	oral	i.p.	i.v.	
Ratte m	20-30	13	13	IPCS (2001)
Ratte w	22	14,3		IPCS (1990)
Ratte neonatal	4			IPCS (2001)
Maus m	46-58	22-40	26-34	IPCS (2001)
Meerschwein	8-9			IPCS (1990)
Wachtel	17			IPCS (1990)
Huhn	3,3			IPCS (2001)
Hund m	0,2			IPCS (2001)
Schwein w	1			IPCS (2001)

In Sprague-Dawley- und Long-Evans-Ratten wurden 46 h nach einmaliger Gabe von 17 bzw. 22 mg/kg KG OTA per gavage in histopathologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen als erste Veränderung multifokale Hämmorrhagien und Fibrinthromben in verschiedenen Organen (Milz, Leber, Niere, Gehirn, etc.) gefunden. Des Weiteren wurden Nekrosen in Leber, Niere und lymphoidem Gewebe beobachtet. [Albassam et al., 1987]

3.1.7.2 Kurzzeitstudien

OTA zeigte in allen bisher untersuchten monogastrischen Säugerspezies Nephrotoxizität [Kuiper-Goodman & Scott, 1989]. Die Mehrzahl der publizierten Studien wurde an Ratten durchgeführt, deren Jüngste im Rahmen einer Studie des „National To-

xicology Programm“ an Fischer344/N-Ratten durchgeführt wurde. Die Tiere wurden über 16 Tage i.p. 12mal mit 0; 1; 4; 16 mg/kg KG OTA (5 d/w) behandelt. Alle Tiere der höchsten Dosisgruppe litten an Diarrhöe und nasaler Schleimabsonderung und starben vor Ende der Studie. In den beiden höchsten Dosisgruppen war eine Reihe von Organgewichten erhöht (Niere, Herz, Gehirn, etc.). Knochenmarkshyperplasien und Nephropathie waren bei allen Dosisgruppen zu sehen. In einer 91tägigen Studie an Fischer344/N-Ratten (0; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5 und 1 mg/kg KG, 5 d/w) wurde in den beiden höchsten Dosisgruppen bei männlichen Tieren Wachstumsreduzierungen und erhöhte Nierengewichte beobachtet. Für Tubulusnekrosen wurde ein NOEL von 0,062 mg/kg KG/d ermittelt, in allen Dosisgruppen traten aber dosisabhängig Karyomegalien in Zellen des proximalen Tubulus auf. [Boorman, 1989]

Tabelle 6 gibt einen Überblick über einen Teil der durchgeführten Kurzzeitstudien in unterschiedlichen Spezies. Die dargestellten Effekte in Hühnern wurden durch weitere Studien bestätigt. Dabei wurde die verringerte Futterzunahme auf schlechtere organoleptische Eigenschaften zurückgeführt [Gibson et al., 1990; Prior & Sisioda, 1978; Prior et al., 1981b].

Fußnoten zu Tabelle 6:

¹⁾ (Stamm, Geschlecht: w (weiblich), m (männlich), Alter)

²⁾ [mg/kg KG/d], bei Fütterung mit OTA-haltigem Futter: ppm

³⁾ Elling, 1979a, b; Elling et al., 1985; Krogh & Elling, 1977; Krogh et al., 1988

Tabelle 6: Zusammenfassung relevanter in vivo Kurzzeitstudien mit OTA

Spezies ¹⁾	Anzahl	Route	Dosis ²⁾ [mg/kg KG/d (ppm)]	Dauer [Tage]	Effekte	NOEL [mg/kg KG/d]	Referenz
Ratte (Wistar, m, entwöhnt)	10	Futter	0,24-2,4 (2,4-24)	14	Wachstumsretardierung Erhöhter Harnsäuregehalt (Blut) Erhöhtes Nierengewicht Verminderte Urinvolumina Tubulusdegeneration	0,48 0,48 0,96 < 0,24 < 0,24	Munro et al., 1974
Ratte (Wistar, m, entwöhnt)	15	Futter	0,015-0,37 (0,2-5)	90	Reduzierte Gewichtszunahme Reduziertes Nierengewicht Tubulusdegeneration	0,075 0,016 0,37	Munro et al., 1974
Ratte (Wistar, m, adult)	5	p.o.	5	3	Beeinflussung der Glucostase	< 5	Suzuki et al., 1975
Ratte (Sprague-Dawley, Wistar, m, w, adult)	4-6	p.o.	0,75; 2	5-7	Gewichtsreduzierung, erhöhte Harnausscheidung, Proteinurie, Glucosurie, verm. Transport organischer Verbindungen	< 0,75	Berndt & Hayes, 1979
Ratte (Wistar, m, adult)	14	p.o.	4	4-10	Verringerte Blutgerinnung	< 4	Galtier et al., 1979
Hund (Beagle, m, jung)	3-6	Kapsel	0,1-0,2	14	Tubulusnekrosen Nekrosen in lymphoiden Geweben (Nierenfunktion unverändert)	< 0,1 < 0,1	Kitchen et al., (1977a-c)
Schwein (w, 8-12 Wochen)	3-6	Futter	0,008; 0,04; 0,2 (0,2; 1; 5)	5-90	Nephropathie Eingeschränkte Nierenfunktion Verringerte Enzymaktivitäten (Niere)	< 0,008	3)
Schwein (jung)	18	Futter	90; 180 ppm	90	Tubulusdegeneration		Stoew et al., 2001
Hähnchen (m, 1-3 Wochen)		Futter	2,5 ppm	60	Reduzierte Gewichtszunahme Erhöhte Harnsäure, Triglyceride (Blut)	< 2,5 ppm	Gentles et al., 1999
Huhn (m, w)		Futter	0,5; 1; 2 ppm	56	Reduzierte Gewichtszunahme	< 0,5 ppm	Prior et al., 1980
Huhn (w)	6	Futter	1,7; 3,1 ppm	14	Reduzierte Gewichtszunahme Erhöhte Schalenelastizität	1,7 ppm < 1,7 ppm	Haazele et al., 1993

3.1.7.3 Langzeitstudien und Kanzerogenität

Kanisawa und Suzuki berichteten 1978, dass die Fütterung von ddY-**Mäusen** mit OTA-haltigem Futter (40 mg/kg \equiv 5,6 mg/kg KG) über 44 Wochen zu Leberzelltumoren (5/9, Malignität nicht berichtet), Adenomen in den Nierenpapillen (9/9) und soliden Nierenzelltumoren (2/9) führte. Keine Tumoren wurden in der Kontrollgruppe beobachtet (historische Kontrolldaten sind nicht bekannt) [Kanisawa & Suzuki, 1978]. In einer weiteren Studie wurden nach Fütterung mit 25 ppm OTA im Futter, in DDD-Mäusen Adenome in den Nierenpapillen (20/20), solide Nierenzelltumoren (6/20) und Leberzelltumoren (8/20) gefunden [Kanisawa, 1984a]. In einer weiteren Fütterungsstudie an ddY-Mäusen (50 ppm \equiv 7 mg/kg KG, 5-30 Wochen) wurde die Bildung von Nierenzelltumoren schon nach Fütterung über 15 Wochen (\equiv 29 mg/Maus) bestätigt, Leber- und Nierenzelltumoren traten nach 30 Wochen (\equiv 50 mg/Maus) in 6/16 bzw. 4/16 Tieren auf [Kanisawa, 1984a]. Die in diesen Studien gefundenen Adenome der Nierenpapille wurden vom JECFA als gutartig, die soliden Nierenzelltumore als bösartig interpretiert [IPCS, 2001].

Die Fütterung von OTA-haltigem Futter an B6C3F₁-**Mäuse** (0; 1; 40 ppm für 24 Monate) führte in der höchsten Dosisgruppe zu Gewichtsabnahme (25 % w; 33 % m), Nephropathie (Tubulusdilatation, Hyperplasien; w > m) und Nierentumoren (nur männliche Tiere) mit Inzidenzen von 26/50 für benigne und 14/50 für maligne Tumore [Bendele et al., 1985a]. Es wurde ebenfalls eine innerhalb des Versuchs im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte Inzidenz an Lebertumoren (insgesamt 18/97) gefunden. Im Vergleich zu historischen Kontrollen für diesen Mäusestamm war für die männlichen Tiere diese erhöhte Inzidenz allerdings nicht signifikant [IPCS, 2001]. Da das zur Fütterung verwendete OTA 9% Benzol, ein bekanntes Kanzerogen, enthielt, konnte von den Autoren ein möglicher kokanzerogener oder synergistischer Mechanismus der Krebsentstehung nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer beobachteter Effekt war eine verringerte Mortalität in der höchsten Dosisgruppe nach 18 Monaten (98 % Überlebensrate im Vergleich zu 75 % (Kontrolle) bzw. 65 % (Niedrigdosisgruppe)). Dies wurde auf eine wachstumshemmende Wirkung auf grampositive Bakterien und die mit der Nierenschädigung eintretende Polyurie zurückgeführt [Bendele et al., 1986; Rao, 1987], könnte aber auch direkt mit der verringerten Futteraufnahme begründet sein.

In einer Langzeitstudie, im Rahmen des „National Toxicology Program (NTP)“ durchgeführt, wurden je 80 F344/N-**Ratten** pro Geschlecht und Dosisgruppe mit 0; 21; 70 und 210 µg/kg KG OTA (gavage, 5 Tage pro Woche) behandelt [Boorman, 1989]. Nach 9 und 15 Monaten wurden aus jeder Gruppe 15 Tiere getötet, die verbleibenden Ratten nach 2 Jahren. In den vorzeitig untersuchten Tieren wurde eine erhöhte Inzidenz an Hyperplasien, Degeneration und Karyomegalien in renalen Tubuluszellen gefunden. Bei den männlichen Tieren traten ebenfalls in erhöhtem Maße Neoplasien in den Nieren auf.

Nach zweijähriger Gabe war das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere in der höchsten Dosisgruppe nur leicht erniedrigt (4-7 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede in der Mortalität zwischen Dosisgruppen wurden für die weiblichen Tiere nicht gefunden, die männlichen Tiere der hohen und mittleren Dosisgruppe reagierten mit einer signifikant erhöhten Sterblichkeit (7, 19, 23 und 26 Tiere). Tiere beider Geschlechter zeigten nach OTA-Behandlung leicht erhöhte Urinvolumina bei abnehmender Dichte, was auf eine verringerte Fähigkeit, Urin zu konzentrieren und somit eine eingeschränkte Nierenfunktion hinweist. Biologisch signifikante hämatologische Veränderungen wurden nicht beobachtet.

In den männlichen Tieren lagen in den entsprechenden Dosisgruppen die Inzidenzen für renale Adenome bei 1/50, 1/51, 6/51 und 10/50, für renale Karzinome bei 0/50, 0/51, 16/51, 30/50. In der höchsten Dosisgruppe zeigten sich viele der Adenome und Karzinome als multipel oder bilateral, in den Tieren, die vor Versuchsende starben, zeigte sich eine erhöhte Anzahl mit metastasierenden Nierenkarzinomen. In weiblichen Tieren wurden bei 0/50, 0/51, 2/50 bzw. 8/50 Ratten renale Adenome und Karzinome gefunden. Außerdem zeigten diese Tiere eine erhöhte Rate an Fibroadenomen (14/50 in der höchsten Dosisgruppe) in der Brustdrüse. Chronische Nephropathie, gekennzeichnet durch Degeneration des Tubulusepithels, das Auftreten von Zysten, erhöhter Proliferation und Karyomegalien im Tubulusepithel, trat dosisabhängig bei Tieren beiderlei Geschlechts auf. [Boorman, 1989]

Die während der Studie im Rahmen des NTP angefertigten, histologischen Proben wurden Ende der neunziger Jahre reevaluiert. Das relativ frühe Auftreten von Karzinomen, die Malignität und die hohe Inzidenz an Metastasierungen unterschieden sich von der Genese von Nierenkrebs durch nicht-genotoxische Noxen (wie z.B. d-Limonen und Chloroform). Zudem wurde der Ursprungsort der Karzinome mit dem Auftreten der frühen, nicht-neoplastischen toxischen Effekte von OTA (sog. S3-Segment der äußeren Schicht der Äußeren Medulla) korreliert. Es wurde ge-

schlussfolgert, dass die Entwicklung der renalen Tumoren auf die DNA-Reaktivität von OTA zurückzuführen sei. [Hard, 2000]

Das JECFA kam zu dem Schluss, dass histopathologische Untersuchung nicht ausreichen, einen derartigen Wirkmechanismus zu postulieren [IPCS, 2001].

Weibliche **Schweine**, die 2 Jahre mit Futter, das 1 ppm OTA enthielt gefüttert wurden, zeigten progressive Nephropathien, aber kein Nierenversagen [Elling 1979a, b; Elling et al., 1985; Krogh & Elling, 1977; Krogh et al., 1988].

3.1.7.4 Studien zur Reproduktionstoxizität

Bisher sind keine Studien zur Reproduktionstoxizität von OTA angefertigt worden. In isolierten testikulären, interstitiellen Zellen aus dem Gerbil wurde allerdings eine OTA-abhängige Inhibierung der Testosteronsekretion beobachtet [Fenske & Fink-Gremmels, 1990]. In männlichen Ratten, die über acht Wochen alle zwei Tage mit 290 µg/kg KG OTA behandelt wurden, fanden Gharbi et al. [1993] im Testis einen zweifachen Anstieg von Testosteron und eine Akkumulation von promeiotischen Zellen. Dies wurde als indikativ für eine gestörte Spermatogenese interpretiert. In Zuchtebern (250 kg), die 20 bzw. 40 µg/Tier OTA erhielten, zeigten Spermien eine erniedrigte Beweglichkeit und Lebensdauer [Solti et al., 1999].

3.1.7.4.1 Teratogenität in Mäusen

Trächtige CBA-Mäuse wurden mit OTA-Einzeldosen von 0; 1; 2 und 4 mg/kg KG an Tag 8 bzw. 9 der Trächtigkeit, oder mit 4 mg/kg KG an Tag 2, 4, 6, 7, 10, und 14 der Trächtigkeit, sowie 2 Tage vor der Paarung behandelt. An Tag 19 der Trächtigkeit wurden die Anzahl lebender und toter Föten, sowie Resorptionsstellen und das Gewicht der Föten bestimmt und die Föten anschließend auf Abnormalitäten untersucht. Das pränatale Überleben der Föten war in den Gruppen reduziert, die 4 mg/kg KG OTA an Tag 7 (24 % letal), 8 (17 % letal) oder 9 (22 %) der Trächtigkeit erhalten hatten. Offene kraniofaziale Anomalien wurden nur bei Behandlung an Tag 8 oder 9 beobachtet. Inzidenzen, Multiplizitäten und Schwere stiegen mit der Dosis, mit dem stärksten Effekt bei Gabe von 4 mg/kg KG an Tag 9 (91 % malformierte Föten). Die hauptsächlich betroffenen Systeme waren ZNS, Auge und Skelett. Die wichtigsten Anomalien waren Aplasie und Dysplasie der oberen Gesichtsstrukturen (Exenzephalie, Mikrozephalie, Kieferanomalien, A-

nophthalmie, Mikrophthalmie, offene Gesichtsspalten, geöffnete Augenlider). [Arora & Frölen, 1981]

An trächtigen CD-1-Mäusen wurde der Einfluss eines reduzierten Proteingehaltes im Futter auf die Teratogenität von OTA untersucht. Dazu wurden die Tiere vor der Paarung und während der Trächtigkeit mit Futter unterschiedlichen Caseingehaltes (26 % als Kontrolle, 16 %, 8 %, 4 %) ad libitum versorgt und bekamen an Tag 8 der Trächtigkeit 0, 2 bzw. 3 mg/kg KG OTA per gavage. Der Versuch wurde an Tag 18 der Trächtigkeit terminiert und die Tiere untersucht. Erhöhte Sterblichkeiten bei den Muttertieren traten in der höchsten (26 % und 4 % Casein) und mittleren (4 % Casein) OTA-Dosisgruppe auf. Sowohl mit steigender OTA-Dosis als auch mit abnehmendem Proteingehalt nahmen die Malformationen bei den Föten zu (81 % bei Gabe von 3 mg/kg KG, 78% bei Gabe von 2 mg/kg KG). In der OTA-Kontrollgruppe traten Malformationen bei der proteinärmsten Diät mit einer Inzidenz von 9,8 % auf, die beobachtete Reduzierung der Fötengewichte wurde auf die proteinarme Ernährung der Muttertiere zurückgeführt. Hauptsächlich wurden kraniofaziale Anomalien beobachtet, bei den Gruppen mit stark proteinreduzierter Diät wurden auch Störungen in der Ausbildung der Extremitäten und des Schwanzes beobachtet. [Singh & Hood, 1985]

3.1.7.4.2 Teratogenität in Ratten

In einer von Moré und Galtier durchgeführten Studie wurden trächtige Wistar-Ratten ab Tag 8 der Gestation per gavage mit einer Gesamtdosis von 5 mg/kg KG OTA in der Weise behandelt, dass die Gesamtdosis auf 2, 3, 4, 6 oder 8 Tage verteilt gegeben wurde. Am Tag 20 der Trächtigkeit wurden die Tiere getötet und untersucht. Die Tiere, bei denen die Dosis auf einen langen Zeitraum verteilt gegeben wurde, waren von den teratogenen Effekten am stärksten betroffen. Beobachtet wurde eine erhöhte Anzahl von Resorptionen, verringerte Anzahl an Föten pro Muttertier, sowie verringertes mittleres Föten- und Plazentagewicht. Fötale Hämorrhagien und Zölome wurden als teratogene Effekte beurteilt. [Moré & Galtier, 1974]

In einer Studie aus dem gleichen Labor mit einem identischen Behandlungsprotokoll wurden die Jungtiere bis Tag 82 nach der Geburt beobachtet. Bei verlängerter Behandlungsdauer mit OTA wurde eine Abnahme der Lebendgeburten, der lebenden Jungtiere 4 Tage nach der Geburt und des Viabilitätsindices beobachtet. Bei den Nachkommen der Gruppe, die an zwei Tagen mit je 2,5 mg/kg KG OTA behandelt wurden, war das durchschnittliche Körpergewicht an Tag 82 um 12 % (m)

bzw. um 8 % (w) verringert. Bei den gleichen Tieren wurde eine erhöhte Inzidenz an Hydrozephalien (26 % der männlichen Tiere) beobachtet. 40 % der Tiere starben bis zum Tag 20 postnatal. Die Anzucht einer zweiten Generation zur Untersuchung bleibender Effekte auf die Reproduktionsfähigkeit der Tiere förderte keine Unterschiede zur Kontrollgruppe zu Tage. [Moré & Galtier, 1975]

3.1.7.4.3 Weitere Studien zur Teratogenität in vivo

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse weiterer Untersuchungen zur Teratogenität von OTA in vivo. Kuiper-Goodman und Scott fassten in einer Risikoabschätzung weitere Studien zur Teratogenität an Mäusen und Ratten zusammen und kamen zu dem Schluss, dass OTA ein Teratogen und Entwicklungsneurotoxin ist [Kuiper-Goodman & Scott, 1989].

Tabelle 7: Studien zur Teratogenität in vivo

Spezies	Dosis	Applikationszeitpunkt/Dauer	Effekte	Referenz
Maus	3 mg/kg KG	Tag 10 d. G. ¹⁾ , einmalig	Verringerte Zahl Synapsen pro Neuron (Jungtiere mit Mikrozephalie)	Fukui et al., 1992
Ratte	1 mg/kg KG	Tag 6-15 d. G. ¹⁾ , täglich	Verringerte Fötusgewichte, erhöhte Resorptionen, Anomalien (Skelett, Lunge); teilweise hemmbar durch L-Methionin	Abdel-Wahhab et al., 1999
Ratte	1,75 mg/kg KG	Tag 7 d. G.	Malformationen; teilweise hemmbar durch Phenylalanin)	Mayura et al., 1984
Ratte	0,5 mg/kg KG	Tag 11-14 d. G.	Verringerte Lernfähigkeit der Nachkommen	Kihara et al., 1984
Huhn	1-2 µg pro Ei	Tag 3	Zunahme der Mortalität und Anomalitäten ²⁾	Edrington et al., 1995

¹⁾ d. G.: der Gestation, ²⁾ Das JECFA beurteilte die Studie als nicht für die Risikobeurteilung geeignet, da nicht validierte Methoden verwendet wurden [IPCS, 2001].

3.1.7.4.4 In vitro Untersuchungen zur Teratogenität

Prächondrogene Mesenchymzellen aus Extremitätenknospen vier Tage alter Hühnerembryonen wurden sechs Tage mit OTA behandelt. Die Akkumulation von Knorpel-Proteoglykanen und die Proteinbiosynthese war dabei dosisabhängig mit einem IC₅₀-Wert von 1,9 µmol/L verringert. [Wiger & Stormer, 1990]

Rattenembryonen, die an Tag 10 der Trächtigkeit explantiert und in Gegenwart von bis 300 µg/ml OTA kultiviert wurden zeigten eine dosisabhängige Reduktion

des Protein- und DNA-Gehaltes. Des Weiteren wurden Malformationen am Endhirn, den Extremitätenknospen und dem Skelett, sowie Nekrosen in mesodermalen und neuroektodermalen Strukturen beobachtet. [Mayura et al., 1989]

3.1.7.5 Immuntoxizität

3.1.7.5.1 Untersuchungen an Mäusen

In einer weiteren Studie wurden BALB/c-Mäuse mit OTA-haltigem Futter 28 bzw. 90 Tage so gefüttert, dass sie eine Tagesdosis von 0, 1, 40 bzw. 400 µg/kg KG erhielten. Dabei waren Körpergewicht und Gewicht von lymphoiden Organen unverändert, die relativen Nierengewichte waren in den beiden höchsten Dosisgruppen nach 28 Tagen und in der höchsten Dosisgruppe nach 90 Tagen erniedrigt. Die Anzahl der Milzzellen war nach 90 Tagen bei den Tieren der höchsten Dosisgruppe deutlich erniedrigt (um ca. 20 %). Ebenso war die Anzahl reifer CD4⁺ und CD8⁺ Zellen erniedrigt und die Population unreifer doppelpositiver Zellen erhöht. Nach 28 Tagen war dosisabhängig in den beiden höchsten Dosisgruppen die primäre humorale Antikörperantwort auf rote Blutkörperchen vom Schaf verringert, nicht jedoch die Antwort auf das virale Antigen PR8. Es wurde vermutet, dass OTA nur bestimmte Funktionen des Immunsystems beeinflusst, z. B. die späte Reifung von T-Zellen. Die Milz scheint dabei das sensitivste lymphoide Gewebe zu sein. [Thuvander et al., 1995]

Im gleichen Labor wurden weibliche BALB/c-Mäuse 2 Wochen vor der Paarung und während der Trächtigkeit mit 5-30 µg/kg KG/d OTA behandelt, die Nachkommen dann zu unbehandelten Muttertieren gegeben und nach 14 bzw. 28 Tagen untersucht. Die Anzahl der Nachkommen, deren Gewicht und Thymus- sowie Milzgewicht und -zellzahlen waren nach 14 Tagen nicht beeinflusst. Nach 28 Tagen wurde ein deutlicher Anstieg des Thymusgewichtes (um 20 %) und der Thymuszellzahl (um 67 %) im Vergleich zur Kontrolle registriert. Die absolute Zahl von reifen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen war unverändert, der prozentuale Anteil allerdings verringert. Alle weiteren untersuchten Parameter für Immuntoxizität waren nicht beeinflusst, so dass die Autoren schlussfolgerten, dass in den Nachkommen OTA-behandelter Tiere die Immunfunktionen nicht verändert werden, wohl aber die Anteile lymphozytärer Subpopulationen in den lymphoiden Organen. [Thuvander et al., 1996a]

Bleibende Schäden in Mäusen drei Wochen nach der OTA-Exposition (gemessen als erhöhte Sensitivität gegenüber Bestrahlung) wurden beobachtet, obwohl sowohl Knochenmarkszellularität als auch Blutzellzahlen auf normales Niveau zurückgekehrt waren [Hong et al., 1988].

3.1.7.5.2 Untersuchungen an Ratten

Um perinatale Immuntoxizität von OTA zu untersuchen, wurden Sprague-Dawley-Ratten an Tag 11 der Laktation mit OTA-Einzeldosen von 10, 50 oder 250 µg/kg KG behandelt und die Nachkommenschaft an Tag 14 untersucht. Die Gewichte lymphoider Organe in den Jungtieren wurden nicht beeinflusst, bei Gabe von 50 µg/kg KG wurde allerdings eine leichte (signifikante) Erhöhung der Thymuszellen beobachtet. Milzzellen von Tieren, deren Mütter mit 250 µg/kg KG behandelt worden waren, zeigten eine verstärkte proliferative Antwort auf T-Zell mitogenes Lipopolysaccharid. Sowohl Thymus-, als auch Milzzellen der Jungtiere aus der 10 und 50 µg/kg KG-Dosisgruppe reagierten im Vergleich zur Kontrolle stärker auf den proliferativen Stimulus von Concanavalin A. Dieser Effekt wurde in der Hochdosisgruppe nicht beobachtet. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass eine Kurzzeitexposition mit OTA via Muttermilch das Immunsystem von jungen Ratten stimuliert. [Thuvander et al., 1996b]

In einem weiteren Ansatz wurden weibliche Tiere vor der Verpaarung und während der Trächtigkeit (5 Tage die Woche), sowie bis zur Entwöhnung der Jungtiere (7 Tage die Woche) mit 50 µg/kg KG/d behandelt und die Jungtiere so auf behandelte und Kontrolltiere verteilt, dass Gruppen pränatal, perinatal, sowie prä- und perinatal exponiert waren. Die pränatale Langzeitexposition führte zu verringerten lymphozytären Antwort auf B- und T-Zell-Mitogene im Alter von 14 Tagen. Die Proliferation unstimulierter Zellen in Kultur war ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle verringert. Dieser Effekt wurde nicht bei perinataler Exposition beobachtet, obwohl die Plasmakonzentrationen von OTA hier höher waren. Pränatal exponierte Tiere zeigten eine geringere Antikörperantwort gegenüber dem viralen PR8 Antigen. Die Autoren schlossen, dass die pränatale Exposition zur Immunsuppression führt, eine perinatale Exposition hingegen zu einer Immunstimulierung. [Thuvander et al., 1996b]

3.1.7.5.3 Weitere Untersuchungen in vivo

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse weiterer Studien zur Immuntoxikologie in vivo zusammengefasst:

Tabelle 8: Untersuchungen zur Immuntoxikologie in vivo

Spezies	Dosis Applikationsdauer	Effekte	Referenz
B6C3F ₁ -Maus	0, 20, 40, 80 mg/kg KG (gesamt), mehrere Tage	Verringertes Thymusgewicht, Myelotoxizität	Boorman et al., 1984
Swiss-Maus	5 mg/kg KG, 50 d	Verringerte Immunantwort auf Brucella abortis (verringerte IgM-Synthese)	Prior & Sissodia, 1982
Han-NMRI-Maus	1, 3, 6 mg/kg KG, 8-17 d	Rückgang antikörperproduzierender Zellen, verminderte IgM-Titer ¹⁾	Müller et al., 1995
Fischer-Ratte	1, 4 mg/kg KG, 16 d (5 d/w)	Verringerte Thymusdrüse, Hypozellularität des Knochenmarks	Boorman, 1989
Wistar-Ratten	5-50 mg/kg KG, einmalig	Nekrosen in Milz und Lymphknoten	Kanisawa et al., 1977
Huhn	2-4 ppm, 20 d	Abnahme der Immunzellen in lymphoiden Geweben	Dwiwedi & Burns, 1984a
Huhn	2-4 ppm, 20 d	Verringerte Plasmalevel an IgG, IgA und IgM	Dwiwedi & Burns, 1984b
Huhn	5 ppm, 56 d	Verringerte Plasmalevel an α 1-, α 2-, β - und γ -Globulinen	Rupic et al., 1978
Huhn	2 ppm, 5-6 Wochen	Leicht erniedrigte Komplementaktivierung	Campbell et al., 1983
Huhn (Embryo)	2,5 μ g, einmalig injiziert	Erhöhte IgM-Konzentration in Bursa fabricii (transient)	Harvey et al., 1987
Huhn	0,5-2 ppm	Verringerte Lymphozytenzahl und Gewichte der Bursa fabricii, Milz und Thymus	Singh et al., 1990
Hund	0,1-0,2 mg/kg KG, 14 d per Kapsel	Nekrosen in Thymus, Milz Tonsillen	Kitchen et al., 1977a,b
Schwein	7-50 μ g/kg KG, täglich 19-39 d	Immunsuppression ²⁾	Müller et al., 1999

¹⁾ Die Schlussfolgerung wurde nach Ansicht des JECFA nicht ausreichend begründet [IPCS, 2001],

²⁾ Das JECFA beurteilte viele der Ergebnisse als widersprüchlich und bemängelte die inadäquate Darstellung der Studie

3.1.7.5.4 Untersuchungen in vitro

Der Einfluss von OTA auf die T-Zellaktivierung wurde in Kulturen von humanen Lymphozyten untersucht. Als früher Marker der Aktivierung wurde das intrazelluläre freie Ca^{2+} und die Aktivierung der Proteinkinase C untersucht, als später Hinweis auf Aktivierung der Effekt auf die phytohaemagglutinin-stimulierte Proliferation über die Expression von funktionellen Interleukin-2-Rezeptoren. Die frühen Marker blieben durch 12 $\mu\text{mol/L}$ OTA im Inkubationsmedium unbeeinflusst. In den phytohaemagglutinin-stimulierten Lymphozyten hingegen führte die Inkubation mit 6,4 $\mu\text{mol/L}$ OTA zu einer reduzierten DNA-Synthese. Die Proteinsynthese in Lymphozyten wurde durch 12 $\mu\text{mol/L}$ OTA ebenfalls gehemmt. Die Blockierung der DNA-Synthese wurde von den Autoren zum Teil mit der Hemmung der Proteinbiosynthese erklärt. [Stormer & Lea, 1995].

In der humanen Monozyten/Makrophagen-Zelllinie THP-1 wurden OTA-induzierte Zytotoxizität und eingeschränkte Phagozytose-Aktivität gezeigt [Müller et al., 2003]. OTA inhibierte außerdem die proliferative Antwort von bovinen peripheren mononukleären Blutzellen. Dies wurde als Hinweis auf immunsuppressive Wirkung interpretiert [Charoenpornsook et al., 1998].

3.1.7.6 Neurotoxizität

3.1.7.6.1 Untersuchungen in Ratten

Männliche Wistar-Ratten wurden intracerebral mit 1 nmol (403 ng) OTA oder über acht Tage oral mit 289 $\mu\text{g/kg}$ KG OTA behandelt. 24 h nach der Applikation wurden die Tiere getötet und untersucht. Nach intracerebraler Injektion wurde OTA im Zentralnervensystem, nicht aber im peripheren Nervensystem, in Blut, Niere oder Urin nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass OTA kaum aus der Spinalflüssigkeit in das Blut übergeht. Hauptzielort der Zytotoxizität sowohl nach intracerebraler Injektion als auch nach oraler Gabe waren der Hippocampus, das ventrale Mesenzephalon, Striatum und Cerebellum. [Belmadani et al., 1998a]

Männliche Wistar-Ratten, die per gavage 1-6 Wochen alle 48 h mit 290 $\mu\text{g/kg}$ KG OTA behandelt wurden, zeigten bei unverändertem Fressverhalten nach vier Wochen eine leichte Gewichtsreduzierung im Vergleich zur Kontrolle. OTA akkumulierte linear zeitabhängig im Hirn und erreichte nach sechs Wochen Konzentrationen

von ca. 100 ng/g Gewebe. Das Toxin veränderte den Aminosäurestatus (Tyrosin erniedrigt, Phenylalanin erhöht) und schädigte Zellen im Hippocampus. Bei paralleler Gabe von Aspartam (25 mg/kg KG alle 48h) waren die OTA-Konzentrationen im Gehirn geringer und der Aminosäurestatus unverändert. [Belmadani et al., 1998b]

Weibliche, adulte Fischerratten erhielten per Gavage 120 µg/kg KG OTA für 10, 20, oder 35 Tage. Die Behandlung beeinflusste alle untersuchten Enzymaktivitäten, die an Tag 35 der Behandlung wieder Normalniveau erreichten. Eine Ausnahme war ein Anstieg der γ -Glutamyl Transferase im Gehirn. [Zanic-Grubisic et al., 1996]

3.1.7.6.2 Untersuchungen in vitro

Kultivierte embryonale Retina- und Hirnzellen aus Hühnern und meningeale Fibroblasten wurden acht Tage serumfrei mit OTA inkubiert. Die IC_{50} -Werte für verschiedene Zytotoxizitätspunkte (Proteingehalt, MTT-Reduktion, Neutralrotaufnahme) lagen in allen drei Zellsystemen bei 170 nmol/L, was auf eine unspezifische Wirkung hinweist [Bruinink et al., 1997a]. In einer weiteren Studie mit identischem Versuchsprotokoll zeigte sich, dass Marker auf neuritisches Wachstum und Differenzierung schon bei niedrigeren Konzentrationen beeinflusst wurden (IC_{50} -Werte bei 20-50 nmol/L). Bei Verwendung FKS-haltigen Mediums stiegen die IC_{50} -Werte auf das 15-30fache, die Koinkubation mit Phenylalanin hatte hingegen keinen positiven Einfluss. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass OTA spezifisch die Bildung von Neuriten beeinflusst [Bruinink & Sidler, 1997b]. Durch Untersuchung von OTA-Analoga ($OT\alpha$ und Ochracin) in den gleichen Testsystemen wurde ausgeschlossen, dass die Isocumarinringstruktur Ursache für die beobachtete Toxizität ist [Bruinink & Sidler, 1997a; Bruinink et al., 1998].

Die regionale Selektivität von OTA wurde in Primärkulturen von Neuronen und Astrozyten aus embryonalen oder neugeborenen Rattengehirnen (ventrales Mesenzephalon und Cerebellum) nach 46stündiger Inkubation in Gegenwart von 10 % FKS untersucht. Die Synthese von Protein und DNA war in allen Zelltypen inhibiert (IC_{50} -Werte: 14-69 µmol/L), neuronale Zellen reagierten dabei empfindlicher als Astrozyten und Zellen aus dem Mesenzephalon empfindlicher als Zellen aus dem Cerebellum. Erhöhte LDH-Ausscheidung und Lipidperoxidation wurden ebenfalls beobachtet. [Belmadani et al., 1999]

3.1.7.7 Nephrotoxizität

3.1.7.7.1 Nephrotoxizität in vivo

Die subkutane Gabe von 10 mg/kg KG/d OTA an **Ratten** für 5 Tage führte zu reduzierten Aktivitäten der Muramidase, Lactatdehydrogenase, alkalischen und sauren Phosphatase und Glutamatdehydrogenase in der Niere [Ngaha, 1985].

Hohe Dosen von OTA beeinflussen deutlich die Nierenfunktion und -morphologie (erhöhte Nierengewichte, Urinvolumina, Blutharnstofflevel, sowie Glucosurie und Proteinurie). Aus dem Bild der Nephrotoxizität wurde auf eine Schädigung des proximalen Tubulus als Ort der Rückresorption geschlossen. Die NOEL der Nierentoxizität hängen von der Spezies und dem Geschlecht der untersuchten Tiere ab [IPCS, 2001]. Die Gabe von niedrigen OTA-Dosen an **Ratten** über 6-12 Monate führte zu einer verminderten Fähigkeit der Urinkonzentrierung mit einem NOEL von 70 µg/kg KG für männliche und 21 µg/kg KG für weibliche Tiere [Boorman, 1989].

In Nierengewebe männlicher **Ratten**, die 2-5 Tage oral mit 0,1-2 mg/kg KG OTA behandelt wurden, war die Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verringert [Meisner et al., 1983; Meisner & Krogh, 1986c]. Der NOEL betrug 0,1 mg/kg KG/d [Meisner & Polsinelli, 1986a], selbst bei Gabe von 2 mg/kg KG waren Enzyme wie Pyruvatcarboxylase, Malatdehydrogenase, Hexokinase und γ -Glutamyltranspeptidase nicht beeinflusst [Meisner & Selanik, 1979].

Ratten, denen über 8-12 Wochen alle 48 h 0,14 mg/kg KG OTA per gavage verabreicht wurden, zeigten eingeschränkte Aktivitäten verschiedener Enzyme in der Niere (Lactatdehydrogenase, alkalische Phosphatase, Leucinaminopeptidase, γ -Glutamyltransferase). Die Lokalisation der drei letztgenannten Enzyme in der Bürstensaummembran der proximalen konvoluten Tubuli deuten auf den primären Schädigungsort hin. Einhergehend mit der verringerten Enzymaktivität wurden die genannten Enzyme auch im Urin gefunden. Als spätes Ereignis wurde im Urin ebenfalls N-Acetyl- β -D-glucosidase, ein lysosomales Enzym, nachgewiesen, deren Aktivität im Nierengewebe jedoch nicht beeinflusst war [Kane et al., 1986b]. Das Auftreten dieses Enzyms wurde von Stonard et al. auf regenerative Prozesse zurückgeführt. So wurde gezeigt, dass die p-Aminohippurat-Clearance zwei Wochen nach Versuchsbeginn um 56 %, nach 12 Wochen aber nur um 8 % reduziert war [Stonard et al., 1987].

An isolierten Tubuli der **Ratte** wurden durch 0,1 mmol/L OTA die Aktivitäten der Alaninpeptidase, Leucin-Amino-Peptidase und Alkalischen Phosphatase gehemmt (60 %, 50 % bzw. 35 %) [Endou et al., 1986].

Die oben beschriebenen Veränderungen in Enzymaktivitäten bzw. -gehalten und Proteingehalten eignen sich als Indikatoren für Nierenschäden [Stonard et al., 1987].

Mit höherer Empfindlichkeit zeigte sich auch an **Schweinen** eine dosisabhängige Verringerung der Aktivität von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, γ -Glutamyltranspeptidase und zytosolischer Phosphoenolpyruvat-carboxykinase bei Fütterung mit OTA-haltigem Futter (0,2-1 mg/kg, entsprechend 8-41 μ g/kg KG). Gleichzeitig wurde eine dosisabhängige Verringerung der Nierenfunktion beobachtet. [Meisner & Krogh, 1986c; Krogh et al., 1988]

Um den Einfluss auf den pH-Wert in der Niere zu untersuchen, wurden männliche Wistar-**Ratten** i.v. (3 μ mol/kg KG) oder i.p. (sechsmal 1,2 μ mol/kg KG pro Tag) mit OTA behandelt. Beide Behandlungen führten zu einer Zunahme des pH in der absteigenden und aufsteigenden Vasa recta. Im Sammelleiter wurde ein signifikanter pH-Anstieg durch die i.v.-Behandlung festgestellt, dieser Effekt war aber nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Blut-pH-Werte, Osmolalitäten von Blut und Urin, sowie Harnflussrate waren nicht verändert [IPCS, 2001; Kuramochi et al., 1997a].

In einer anschließenden Studie wurden männliche Wistar-**Ratten** i.v. mit OTA 3 μ mol/kg KG behandelt. Dabei wurde eine pH-Erhöhung im proximalen und distalen Tubulus, im Sammelleiter, sowie in der absteigenden und aufsteigenden Vasa recta beobachtet. Desweiteren wurde eine erhöhte Bicarbonatkonzentration im proximalen Tubulus und Sammelleiter detektiert, wohingegen die Parameter im Blut unbeeinflusst waren. Veränderungen im CO₂-Partialdruck, in der Serum- und Urinosmolalität und Harnflussrate traten nicht auf. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Störung in der pH-Homöostase zu Veränderungen im Säure-Base-Haushalt führen und so zur Nephrotoxizität von OTA führen könnte. [Kuramochi et al., 1997b]

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Pathogenese der Nephropathie und den kanzerogenen Effekten wurden männliche Wistar-**Ratten** für 90 Tage alle 72 h i.p. mit 0; 0,4; oder 0,8 mg/kg KG OTA behandelt. Es wurde eine dosisabhängige Abnahme der Nierengewichte, Nierengröße und Kreatin-Clearance beobachtet. Des Weiteren traten (allerdings nicht dosisabhängig) schwere renale Atrophien auf. Im Blut wurden 900 bzw. 1900 ng/ml OTA für die beiden Dosisgruppen gefunden, in der Niere 30 bzw. 170 ng/g Gewebe. Die Urinkonzentration

war in beiden Gruppen auf identischem, niedrigen Niveau, was auf eine langsame renale Ausscheidung hinweist. In der Hochdosisgruppe wurden nach 30 Tagen Karyomegalien in Tubuluszellen, Degeneration des interstitiellen Gewebes und weniger apoptische Körperchen als in Kontrolltieren gefunden, sowie abnormale Mitosen, die von den Autoren als beginnende Regeneration interpretiert wurden. [Maaroufi et al., 1999]

Die subkutane Gabe von Superoxiddismutase und Katalase an **Ratten** führte zu einer Aufhebung der nierentoxischen Effekte, was zu der Schlussfolgerung führte, dass Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid bei der nephrotoxischen Wirkung von OTA eine Rolle spielen. [Baudrimont et al., 1994]

In einigen Studien an **Mäusen** führte die subakute Gabe von OTA zu verringerten relativen Nierengewichten [Boorman et al., 1984; Thuvander et al., 1999].

3.1.7.7.2 Nephrotoxizität in vitro

Die Inkubation von isolierten proximalen Tubuluszellen von Ratten mit OTA führte zu verminderter Respiration in den Mitochondrien. Dieser frühe Effekt der Nephrotoxizität wurde auf eine Beeinträchtigung am Beginn der Atmungskette zurückgeführt. Des Weiteren wurde erhöhte LPO beobachtet, die allerdings nicht für die Zytotoxizität verantwortlich zu sein schien. [Aleo et al., 1991]

Zur Untersuchung des Einflusses von OTA auf Zellwachstum, -viabilität und transepithelialen Transport wurden Primärkulturen von proximalen Tubuluszellen α -serumfrei mit OTA (0,1-10 $\mu\text{mol/L}$) für 24 oder 72 h inkubiert. Die 24stündige Behandlung mit $\mu\text{molaren}$ Konzentrationen führte zu einem hypotrophen und hypoplastischen Effekt, die 72stündige Inkubation hingegen zu hypertrophen und hypoplastischen Effekten. Dies führten die Autoren auf beschleunigtes Zellwachstum, gefolgt von erniedrigter DNA-Synthese infolge erniedrigter Zelldichte, zurück. Gleichzeitige Inkubation mit Albumin oder Ansäuerung des Kulturmediums reduzierten diese Effekte, Alkalisierung hatte keinen Einfluss. Die Inkubation mit niedrigen, nanomolaren Konzentrationen führte weder zu hypotrophen, noch hypertrophen Effekten, sondern über stimulierte DNA-Synthese und Zellteilung zu Hyperplasie. Der transepitheliale Elektrolyttransport wurde durch 10 $\mu\text{mol/L}$ OTA unterbrochen. Die Autoren schlussfolgerten, dass OTA in physiologischen (nanomolaren) Konzentrationen ohne toxische Effekte und ohne Beeinflussung der Zellviabilität zu gesteigerter Proliferation der proximalen Tubuluszellen führt, möglicherwei-

se hervorgerufen durch Modulation der intrazellulären pH-Homöostase. [Gekle et al., 1995]

Das mittlere und terminale Segment des proximalen Tubulus wurde an isolierten Nephronen als die empfindlichsten Bereiche für OTA-Toxizität gefunden (50 µmol/L, Abnahme des zellulären und mitochondrialen ATP) [Jung & Endou, 1989].

OTA konnte in Hemmexperimenten die Aufnahme von [³H]-markiertem p-Aminohippurat in Membranvesikel aus dem renalen Bürstensaum und der basolateralen Membran ebenso effektiv hemmen wie Probenecid. Die Autoren schlossen, dass OTA mit dem nierenspezifischen organischen Anionentransporter 1 (OAT1) interagiert und zeigten den Transport von OTA über dieses System [Sokol et al., 1988]. Die OTA-vermittelte Abnahme von ATP in Nierenzellen wurde durch Inhibitoren des OAT1 gehemmt, was als Hinweis auf den OTA-Transport über dieses Transportsystem gewertet wurde [Endou, 1998]. Zum gleichen Ergebnis kamen Untersuchungen von Friis et al. an Nierenschnitten vom Schwein [Friis et al., 1988].

Des Weiteren wurde die Aufnahme von OTA durch den OAT1 in transient transfizierten *Xenopus*-Oozyten und kultivierten S3-Zellen (Tubulus-Segment 3), die stabil OAT1 exprimieren, untersucht. Transfizierte Oozyten mit dem OAT1 nahmen im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich mehr OTA auf (4 µmol/L). Die Aufnahme wurde durch p-Aminohippurat, Probenecid, Piroxicam, Octanoat, und Citronin, die alle als Inhibitoren der OTA-Toxizität beschrieben wurden, gehemmt. Die Aufnahme von OTA in S3-Zellen war ebenfalls erhöht im Vergleich zu den Vorläuferzellen, die keinen OAT1 exprimieren. Die Zellproliferation wurde in S3-Zellen durch 2 und 10 µmol/L OTA und die Viabilität von 10 µmol/L OTA, nicht aber in den Vorläuferzellen beeinträchtigt. Die Koinkubation mit p-Aminohippurat verringerte die toxischen Effekte von OTA. Die Autoren schlossen, dass der OAT1 eine wichtige Rolle für die Toxizität von Mykotoxinen spielt. [Tsuda et al., 1999]

Der Transport über die peritubuläre Membran wurde an frisch isolierten proximalen Nierentubuli aus Kaninchen untersucht. Die Inkubation mit 10 µmol/L OTA führte zu einer linearen Akkumulation und nach ca. fünf Minuten zu einer stabilen Konzentration in den Tubuli. Die Aufnahme wurde nahezu vollständig durch 2 mmol/L Probenecid und zu ca. 40-50 % durch 2,5 mmol/L p-Aminohippurat gehemmt, was als Hinweis auf einen Transport über den organischen Anionentransporter gewertet wurde. Die Verwendung anderer Inhibitoren deutete darauf hin, dass Phenylalanin nicht in den Transport involviert ist, wohl aber möglicherweise ein Fettsäuretransporter. Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass die peri-

tubuläre Membran entscheidend zur Aufnahme und Akkumulation von OTA beiträgt. [Groves et al., 1998]

OTA inhibierte die Proteinbiosynthese in Vero-Zellen (Meerkatze, Niere) mit einem IC_{50} -Wert von 14 $\mu\text{mol/L}$ in Gegenwart von 5 % NKS (24 h). Eine parallele Inkubation mit hohen Dosen an Aspartam (250 $\mu\text{mol/L}$) erhöhte den IC_{50} -Wert auf 22 $\mu\text{mol/L}$, eine Aspartaminkubation 24 h vor der OTA-Inkubation auf 34 $\mu\text{mol/L}$. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Aspartam die Bindung von OTA an Plasmaproteine verringerte und protein-gebundenes OTA freisetzte. [Baudrimont et al., 1997b]

In weiteren Studien wurden in Nierenzellsystemen die Mechanismen der Zytotoxizität und Apoptoseinduktion von OTA untersucht (s. Kap. 3.1.7.12).

3.1.7.8 Studien zur Genotoxizität

3.1.7.8.1 Gen-Mutationen

Eine Reihe von Untersuchungen zur Mutagenität von OTA an Prokaryonten (*S. typhimurium*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis*) lieferten mit und ohne metabolischer Aktivierung negative Resultate [Bartsch et al., 1980; Bendele et al., 1985b; Föllmann & Lucas, 2003; Kuczuk et al., 1978; NTP, 1989; Ueno & Kubota, 1976; Wehner et al., 1978; Zepnik et al., 2001]. Bei Verwendung eines Gemisches aus OTA und OTB zeigte sich in *S. typhimurium* TA1538 eine erhöhte Mutantenrate [Kuczuk et al., 1978]. Dies wurde von den Autoren nicht ausreichend erklärt. Möglicherweise könnten synergistische Effekte eine Rolle spielen. Wahrscheinlicher erschien den Autoren eine Verunreinigung, da bei Verwendung des reinen OTA kein Effekt mehr zu beobachten war. Unter Berücksichtigung der anderen in dieser Studie durchgeführten Tests beurteilten die Autoren OTA als nicht mutagen. Obrecht-Pflumio et al. [1999] berichteten, dass der Ames-Test an *S. typhimurium* TA98, TA1535 und TA1538 nach Aktivierung mit murinen Nierenmikrosomen positiv ausfiel. In einer weiteren Studie wurde zur Inkubation das Medium aus Hepatozytenkulturen, die mit OTA behandelt worden waren, eingesetzt. Auch hier wurde eine Erhöhung der Mutationsrate beobachtet [Hennig et al., 1991]. Die positiven Ergebnisse wurden allerdings nicht bestätigt [IPCS, 2001].

Auch in Mutagenitätsstudien an Säugerzellen wurden überwiegend negative Ergebnisse erhalten. Weder Umeda et al. [1977] in C3H-Zellen (5-10 $\mu\text{g/mL}$), noch Bendele et al. [1985b] zeigten im Maus-Lymphomatest (0,1-13 $\mu\text{g/mL}$) ein muta-

genes Potenzial von OTA. Auch ein an V79-Zellen durchgeführter HPRT-Test zeigte keine Mutagenität [Föllmann & Lucas, 2003]. Die Inkubation von NIH 3T3 Zellen, transfiziert mit humanen CYP450 (1A1, 1A2, 2C10, 3A4) und einem lacZ-Vektor als Reporter gen für Mutationen, mit 25 µg/mL OTA führte zu einer erhöhten Mutationsrate am lacZ Gen [De Groene et al., 1996a]. Inwieweit eine beobachtete Zytotoxizität einen Einfluss auf diese Resultate hatte, ist unklar. Bisher wurden keine Studien zur Mutagenität in vivo durchgeführt.

3.1.7.8.2 Zytogenetische Untersuchungen

Tabelle 9 gibt einen Überblick über in vitro-Untersuchungen zur Induktion von **Schwesterchromatidaustauschen**. An chinesischen Hamstern wurde nach OTA-Behandlung (25-400 mg/kg KG; gavage) bis zur Zytotoxizitätsgrenze keine erhöhte Rate an Schwesterchromatidaustauschen beobachtet [Bendele et al., 1985b].

Tabelle 9: Induktion von Schwesterchromatidaustauschen in vitro

Testsystem	Konzentration	Ergebnis	Referenz
Zelllinien (CHO)	0,5-5 µg/ml; 26 h	negativ	Boorman, 1989
Zelllinien (CHO)	5-160 µg/ml; 2 h	positiv	Boorman, 1989
Humane periphere Lymphozyten	5-10 µg/mL	negativ	Cooray, 1984
Humane Lymphozyten	-	positiv	Hennig et al., 1991

Chromosomale Abberationen wurden in CHO-Zellen nach Behandlung mit 30-160 µg/mL (8-10 h) bzw. 100-300 µg/mL (2 h) nicht induziert [NTP, 1989]. In einer Studie an humanen Lymphozyten wurde nach 48stündiger Inkubation mit OTA (4,5 µg/mL) ein 5facher Anstieg der Chromosomenabberationen beobachtet [Manolova et al., 1990]. In **Mäusen**, die mit 1 µg/kg KG/d OTA behandelt wurden, wurde nach 14 Tagen [Kumari & Sinha, 1994] und nach 45 Tagen [Bose & Sinha, 1994] eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Rate an Chromosomenabberationen gefunden, die durch zusätzliche Gabe von Ascorbinsäure (Gavage) oder Vitamin A (Diät) reduziert wurden.

Micronuclei wurde in Kulturen von Schafsamenblasenzellen gefunden, die 6 h mit 12-30 µmol/L OTA behandelt wurden [Degen et al., 1997] und ebenso in SHE-Zellen, die 18-72 h mit 5-20 µmol/L OTA behandelt wurden [Dopp et al., 1999]. In vivo Daten liegen nicht vor.

3.1.7.8.3 DNA-Schädigung und DNA-Reparatur

Die Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde über alkalische Filterelution (AFE), oder Comet-Assay untersucht. Auch Schwesterchromatidaustauschprozesse (SCE) können durch DNA-Strangbrüche bedingt sein. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Daten aus in vitro Tests.

Tabelle 10: Induktion von DNA-Strangbrüchen und Schwesterchromatidaustausche in vitro

Testsystem	Konzentration	Ergebnis	Referenz
Zelllinien (CHO), SCE	0,5-5 µg/ml; 26 h	Negativ	Boorman, 1989
Zelllinien (CHO), SCE	5-160 µg/ml; 2 h	positiv	Boorman, 1989
Humane periphere Lymphozyten, SCE	5-10 µg/mL	Negativ	Cooray, 1984
Milzzellen (Maus, phytohaemagglutinin-stimuliert), AFE	1-10 µg/mL	positiv (dosisabhängig)	Creppy et al., 1985a
Humane Lymphozyten, SCE	-	positiv	Hennig et al., 1991
Zelllinien (MDCK), Comet	10-1000 µmol/L	Positiv	Lebrun et al., 2002
Zelllinien (CHO, AWRP), AFE	200 µg/mL	Positiv (1,2 Strangbrüche/10 ⁹ Da)	Stetina & Votava, 1986

Des Weiteren wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen auch nach intraperitonealer Injektion (2,5 mg/kg KG) an BALB/c-**Mäusen** in Milz (nach 4, 16 und 24 h), Niere (nach 24 und 48 h) und Leber (nach 24, 38 und 72 h) beobachtet, die Schäden waren allerdings reversibel [Creppy et al., 1985a]. In einer Studie an Wistar **Ratten** wurden die Tiere alle 48 h mit 290 µg/kg KG OTA behandelt (gavage, sechs bzw. zwölf Wochen). DNA-Strangbrüchen wurden sowohl in der Niere als auch in der Leber beobachtet und waren nicht reversibel [Kane et al., 1986a].

In bakteriellen Tests mit E. Coli-Zellen (SOS-Reparatur [Auffray & Boutibonnes, 1986, WP 2-Test [Bendele et al., 1985b]) zeigte sich keine Induktion von DNA-Reparatur. In zahlreichen Experimenten mit Säugerzellen wurde außerplanmäßige DNA-Synthese (UDS) als Folge von DNA-Reparaturprozessen beobachtet (Tabelle 11).

Tabelle 11: DNA-Reparatur (UDS) in Säugerzellen

Testsystem	Konzentration	Ergebnis	Referenz
Primäre Rattenhepatozyten (Fischer 344)	0,025 ng/mL – 500 µg/mL	negativ (> 50 ng/mL zytotoxisch)	Bendele et al., 1985b
Primäre Rattenhepatozyten	0,75 – 1 µmol/L	positiv	Dörrenhaus & Föllmann, 1997
Blasenepithelzellen (PUBEC)	0,25 – 1 µmol/L	positiv	Dörrenhaus & Föllmann, 1997
Primäre Urothelialzellen (human)	0,01 – 2 µmol/L	Positiv	Dörrenhaus et al., 2000
Urothelialzellen (human)	0,005 – 0,05 µmol/L	positiv	Flieger et al., 1998
Primäre Rattenhepatozyten (ACI)	0,4; 4 µg/mL	0,4 schwach positiv 4 zytotoxisch	Mori et al., 1984
Primäre Maushepatozyten (C3H)	4; 40 µg/mL	4 schwach positiv 40 zytotoxisch	Mori et al., 1984

3.1.7.9 Mechanismen der Tumorentstehung

Eine Große Zahl Studien wurde durchgeführt, um Kenntnisse über den Mechanismus der Tumorentstehung in der Niere zu gewinnen. Schwerpunkte lagen dabei auf der Biotransformation und Bioaktivierung, sowie der Bildung OTA-abhängiger Nukleotidaddukte. Wie bei den Studien zur Mutagenität existiert auch hier kein einheitliches Bild. Obwohl deshalb kein definierter Mechanismus der Tumorentstehung postuliert werden kann, scheinen nicht-genotoxische Ereignisse eine sehr wichtige Rolle für die Kanzerogenität von OTA zu spielen.

3.1.7.9.1 Bedeutung der Biotransformation

In einer Reihe von Studien wurde die Rolle der Biotransformation für die Toxizität von OTA untersucht (Tabelle 12). Es wurde postuliert, dass die Biotransformation wichtig sei für die Bindung von OTA an die DNA, sowie für die renale Toxizität. Untersucht wurden eine Reihe von Enzymen (CYP 450, Peroxidasen, Glutathion-S-Transferasen), die zur Bildung aktiver OTA-Metabolite führen könnten. Allerdings wurde in keiner dieser Studien die Kapazität zur Transformation von OTA zu reaktiven Derivaten eindeutig nachgewiesen, noch die Struktur reaktiver Metabolite oder deren Reaktionsprodukte aufgeklärt.

Tabelle 12: Studien zur Rolle der Biotransformation für die Kanzerogenität von OTA

Endpunkt	Referenz
Mikrosomen (induziert), DNA-Addukte	El Adlouni et al., 2000
Zytotoxizität, Makromolekül-Biosynthese, Proliferation an Zelllinien, Hepatozyten	Fink-Gremmels et al., 1995
Bronchiale Epithelzellen, die humane CYP 450 exprimieren, DNA-Addukte	Grosse et al., 1997a
Ames-Test +/- metabolischer Aktivierung (S9-Mix); Schwesterchromatidaustausche in Lymphozyten, die mit OTA-haltigem Medium aus Hepatozytenkulturen inkubiert wurden	Hennig et al., 1991
Umsetzung von OTA durch Lebermikrosomen (z.T. induziert)	Hietanen et al., 1991
E. Coli, Mutationsfrequenz nach Inkubation mit verschiedenen OTA-Analoga	Malaveille et al., 1994
Maus, Gabe von OTA +/- Indomethacin, Aspirin (PGHS-Hemmer), DNA-Addukte	Obrecht-Pflumio et al., 1996
Ames-Test +/- metabolischer Aktivierung (murine Nierenmikrosomen)	Obrecht-Pflumio et al., 1999
Maus, Gabe von OTA +/- Katalase, SOD, Antioxidantien; DNA-Addukte	Pfohl-Leszkowicz et al., 1993b, 1994b
CYP 450-Expression in Leber und Niere OTA-behandelter Ratten	Pfohl-Leszkowicz et al., 1998
Ames-Test +/- metabolischer Aktivierung (S9-Mix)	Würgler et al., 1991

Im Großteil dieser Studien wurden OTA-relevante Endpunkte der Toxizität und dann deren Modulierung nach Veränderung der Aktivitäten fremdstoffmetabolisierender Enzymaktivitäten beobachtet. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Veränderung der Endpunkte hierbei durch indirekte Mechanismen erfolgt. Deshalb kann aus diesen Studien keine endgültige Schlussfolgerung zur Rolle der Biotransformation gezogen werden.

Weitere Studien untersuchten die Biotransformation von OTA auf der Basis von chemischen Modellsystemen und chemischer Strukturanalytik. So wurde die Bildung eines OTA-Chinon-Metaboliten in zellfreien Systemen, an einem Eisenporphyrin-Modellsystem, das eine CYP 450-Aktivität imitieren sollte, oder durch Inkubation mit Meerrettichperoxidase gebildet [Dai et al., 2003; Gillman et al., 1999]. Nach Inkubation von OTA mit weiteren isolierten Enzymen und Mikrosomen mit hoher Aktivität spezifischer CYP 450 wurde dieser Metabolit nicht detektiert, sondern nur eine geringe Umsetzung zu 4-(R)- und 4-(S)-OH-OTA [Gautier et al., 2001a; Zepnik et al., 2001]. Durch Prostaglandin H-Synthase-reiche Zellfraktionen wurden ebenfalls keine reaktiven OTA-Metabolite gebildet [Gautier et al., 2001a].

Die bekannte CYP 450-abhängige Biotransformation von OTA zu hydroxylierten Derivaten lieferte keine strukturellen Anhaltspunkte für eine Aktivierung des Myko-

toxins. Das JECFA sah diese These durch die Beobachtung, dass ein gesteigerter Metabolismus durch Induktion von CYP 450 die renale Toxizität von OTA senkt [Omar et al., 1996] und dass gleichzeitig in Zellsystemen mit sehr geringer bis gar keiner CYP 450-Aktivität typische toxische Effekte von OTA beobachtet wurden [Seegers et al., 1994; Höhler et al., 1996a; Xiao et al., 1996a, b; Dopp et al., 1999], bestätigt [IPCS, 2001]. Die Bildung von OTA-Radikalen wurde ebenfalls bisher nicht sicher gezeigt, Ergebnisse aus Elektronenspinresonanzspektroskopie-(ESR)-Experimenten hingegen deuten auf eine Bildung von Hydroxylradikalen hin (3.1.7.10) [Höhler et al., 1996a; 1997].

3.1.7.9.2 DNA-Adduktbildung

Ein weiterer Schwerpunkt der durchgeführten Studien lag auf der Identifizierung von OTA-DNA-Addukten als wichtiger Schritt der Initiation (Tabelle 13). Mit der sehr sensitiven ³²P-Postlabeling-Methode wurden mit DNA aus in vivo und in vitro Experimenten auf der Dünnschichtchromatographie-Platte Flecken gefunden, die als OTA-vermittelte DNA-Addukte interpretiert wurden. Das gehäufte Auftreten korrelierte in Ratten mit der erhöhten Inzidenz für Tumoren in Niere und Blase [Castegnaro et al., 1998]. Ein großer Teil der Studien zur DNA-Adduktbildung wurde in demselben Labor angefertigt. Detektiert wurden Addukte in Geweben von Ratten und Mäusen nach Gabe von bis zu 2,5 mg/kg KG Ochratoxin A für 1-16 Tage oder in Langzeitstudien (Ratte: 0,4 mg/kg KG/d). Dabei wurden Adduktraten von bis zu 200 Addukten pro 10⁹ Nukleotide gefunden.

Tabelle 13: Untersuchungen zur DNA-Addukt-Bildung von OTA

Endpunkt	Ergebnis	Referenz
³² P-Postlabeling, Ratte	positiv	Castegnaro et al., 1998
³² P-Postlabeling, in vitro	positiv	El Adlouni et al., 2000
³² P-Postlabeling, in vitro	positiv	Grosse et al., 1995a, b; 1997a, b
³² P-Postlabeling, Maus, in vitro, zellfrei	positiv	Obrecht-Pflumio et al., 1996, 1997, 2000, 2001
³² P-Postlabeling, Maus	positiv	Petkova-Bocharova et al., 1998
³² P-Postlabeling, Maus, Ratte, Mensch	positiv	Pfohl-Leszkowicz et al., 1991, 1993a-d, 1994a, b, 2002a

Bei der ³²P-Postlabelingmethode handelt es sich um eine unspezifische Methode, bei der DNA-Addukte über ihr chromatographisches Verhalten durch den Vergleich mit synthetisch hergestellten, definierten Adduktstandards identifiziert werden. Die

eindeutige Identifizierung eines kovalenten Adduktes mit OTA ist aber bisher nicht gelungen. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die Addukte teilweise durch die OTA vermittelte Toxizität oder über die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) entstanden. So zeigten Grosse et al. [1997b], dass eine Behandlung von Ratten mit den antioxidativ wirksamen Enzymen Superoxiddismutase oder Katalase bzw. mit den Antioxidantien α -Tocopherol oder Ascorbinsäure vor der Gabe von OTA die DNA-Adduktlevel signifikant erniedrigte.

In in vitro-Experimenten wurden DNA oder Mononukleotide mit Nieren- und Lebermikrosomen von Maus und Kaninchen, OTA sowie entweder NADPH oder Arachidonsäure als Kofaktoren inkubiert. In allen Kombinationen mit DNA wurden Addukte erhalten, die höchsten Bildungsraten zeigten sich mit Nierenmikrosomen und Arachidonsäure als Kofaktor. Die Inkubation von dGMP führte unter Verwendung von Nierenmikrosomen der Maus und beiden Kofaktoren zu drei Addukten, allerdings war nur eines dieser Addukte identisch bei beiden Kofaktoren. Eine Inhibierung der Lipidperoxidation und eine erhöhte Bildung von Hydroxylradikalen mit Desferrioxamin-B-methansulfonat hatte keinen Einfluss auf das Adduktprofil. Das Hauptaddukt mit dGMP wies die gleichen chromatographischen Eigenschaften auf, wie das Hauptaddukt aus der aufgereinigten DNA [Obrecht-Pflumio & Dirheimer, 2000]. In zellfreien Systemen gelang die Bildung und Identifizierung eines OTA-dG-Adduktes ausgehend vom OTA-Hydrochinon. Die Bildung dieses Hydrochinons in vitro oder in vivo wurde aber bisher nicht gezeigt [Dai et al., 2003a].

Im Gegensatz zu den Befunden aus dem ^{32}P -Postlabeling wurde eine Bindung von [^3H]-OTA an die DNA in Leber und Niere nach einfacher oraler Gabe von 210 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG [^3H]-OTA an weibliche F344-Ratten bisher nicht gezeigt [Schlatter et al., 1996]. In einer weiteren Studie wurde den Tieren per gavage 2 mg/kg KG [^3H]-OTA gegeben, nach 24 h die DNA aus Leber und Niere isoliert und per Szintillationsmessung die Bindung von [^3H]-OTA untersucht [Gautier et al., 2001b]. Gleichzeitig untersuchten die Autoren die DNA mit der ^{32}P -Postlabelingmethode und fanden dabei erhöhte Adduktraten. Da in der DNA keine Radioaktivität gefunden wurde, war die Schlussfolgerung aus diesem Experiment, dass die über das ^{32}P -Postlabeling gefundenen Addukte kein OTA enthalten.

Mit einer Detektionsgrenze von 20 Addukten/ 10^9 DNA-Basen wurde ebenfalls keine Bindung von [^3H]-OTA an DNA gefunden in Gegenwart von Nierenmikrosomen männlicher Ratten mit NADPH, Nierenmikrosomen der Maus mit NADPH, Samenblasenmikrosomen der Ratte mit Arachidonsäure oder Meerrettichperoxidase mit Wasserstoffperoxid [IPCS, 2001]. Experimente in Gegenwart von Kalbsthymus-

DNA führten ebenso wenig zu einer DNA-Bindung reaktiver Metabolite wie die Behandlung von F344-Ratten mit radioaktiv markiertem OTA an der DNA von Leber und Niere. Die Sensitivität der Analytik lag dabei im Bereich der ³²P-Postlabeling-Methode [Gautier et al., 2001a].

Die Daten zeigen, dass ein direkt genotoxischer Mechanismus bisher nicht eindeutig nachgewiesen wurde. Eine alternative Hypothese zum Mechanismus der Kanzerogenität stützt sich auf Befunde, nach der die Verteilung der Adduktflecken, die mit der ³²P-Postlabeling-Methode detektiert wurden, eine große Ähnlichkeit aufweist mit der Verteilung, die in DNA nach Behandlung mit H₂O₂ oder Eisen(III)-nitrilotriacetat erhalten wurde. Dabei handelt es sich um eine nicht-genotoxische Substanz, die über oxidativen Stress Nierentumoren in der Ratte verursacht. Versuche an Ratten führten nach Gabe von Eisen(III)nitrilotriacetat zum gleichen Ergebnis [Randerath et al., 1995]. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Nierenkanzerogen, das starken oxidativen Stress auslöst. Eine Vielzahl weiterer Studien weist ebenfalls darauf hin, dass OTA oxidativen Stress auslösen kann (s. Kap. 3.1.7.10), so wurde z.B. die in vivo Toxizität durch Gabe von Antioxidantien verringert [z.B. Grosse et al., 1997c].

3.1.7.10 OTA und oxidativer Stress

Eine Reihe von Untersuchungen erbrachten Hinweise auf die Induktion von oxidativem Stress durch OTA. So wurde die Bildung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie erhöhte Lipidperoxidation (LPO) beobachtet. Auch die Bildung von oxidativen DNA-Schäden wurde gezeigt. Zudem wurden in Tierversuchen und Zellsystemen toxische Effekte von OTA durch Gabe von Antioxidantien oder antioxidativ wirksamen Enzymen verringert [Gautier et al., 2001b; Schaaf et al., 2002].

Die Induktion von Nierentoxizität, oxidativem Stress und Zellproliferation bilden eine alternative Hypothese für den Mechanismus der Nierenkanzerogenität von OTA. Für die Tumorinduktion in der Rattenniere spielen Nierentoxizität über lange Zeit und oxidativer Stress eine bedeutende Rolle [Dietrich & Swenberg, 1993; Hard, 1998]. Verschiedene nicht-genotoxische Substanzen, die keiner Biotransformation unterliegen, induzieren renale Tumoren unter Beteiligung von oxidativem Stress. So scheint der oxidative Stress verantwortlich für die DNA-Schädigung und die Zytotoxizität von Eisen(III)nitrilotriacetat und Kaliumbromat zu sein, die nach Kurzzeitexposition Nierentumoren erzeugen [Li et al., 1987; Wolf et al., 1998]. Wie bei

der Tumorinduktion durch OTA auch, reagieren männliche Ratten gegenüber Kaliumbromat empfindlicher als weibliche Tiere [Kurokawa et al., 1983; Umemura et al., 1998].

Kommt es OTA-abhängig zur Proteinurie, kann Eisen im Nierentubulus freigesetzt werden, welches dann in der Lage ist, die Bildung von Hydroxylradikalen zu katalysieren [Stormer & Hoiby, 1996]. OTA selber kann Chelatkomplexe mit Schwermetallionen bilden [Gillman et al., 1998b] und so (v.a. mit Eisen(III)ionen) die Bildung von Hydroxylradikalen katalysieren [Gillman et al., 1999; Hasinoff et al., 1990]. Durch diese Prozesse wurden an isolierter DNA („Supercoiled DNA“) Strangbrüche induziert, die durch den Einsatz von Katalase wiederum reduziert auftraten [Gillman et al., 1999].

In Bakterien (*Bacillus brevis*) wurde die Bildung freier Radikale in Abhängigkeit von OTA durch EPR-Spektroskopie („Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy“) gezeigt. Die Bildung war durch Vitamin E teilweise inhibierbar [Hoehler et al., 1996a]. Dieser Befund wurde in Rattenlebermikrosomen bestätigt, die EPR-Signale durch OTA waren allerdings sehr schwach. O-Methyl-OTA (mit einer Methoxygruppe statt einer Hydroxylgruppe am Isocumarinring), induzierte hingegen ein deutliches EPR-Signal in Lebermikrosomen, nicht aber in Lebermitochondrien oder Hepatozyten von Ratten [Hoehler et al., 1997].

OTA wurde elektrochemisch bzw. photochemisch und durch zellfreie Inkubation mit Meerrettichperoxidase in eine Hydrochinonspezies umgewandelt, die statt des Chloratoms am phenolischen Ring eine weitere Hydroxylgruppe trägt [Calcutt et al., 2001; Dai et al., 2003; Gillman et al., 1998a; Il'ichev et al., 2001]. Die Bildung dieses Hydrochinonderivates von OTA wurde auch durch ein Eisenporphyrinsystem in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Ascorbat gezeigt [Gillman et al., 1999]. Eine solches Hydrochinon wäre in der Lage, über Redoxcycling ROS zu produzieren (s. Kap. 3.1.7.10) [Eisenbrand & Metzler, 2002].

In Rattenhepatozyten führte die Inkubation mit OTA (> 10 µmol/L) NADPH-abhängig zu einer Induktion von Lipidperoxidation, die über die Entstehung von Malondialdehyd (MDA) gemessen wurde. Nach einmaliger Gabe von 6 mg/kg KG an Ratten wurde eine erhöhte Ethanexhalation (Parameter für LPO in vivo) beobachtet [Rahimtula et al., 1988]. Die Induktion von LPO wurde in zellfreien Modellsystemen (bestehend aus Phospholipidvesikeln, CYP 450-Reduktase, Fe³⁺, EDTA und NADPH) bestätigt. Spektrometrische Untersuchungen zeigten dabei, dass es zu der Bildung eines OTA-Eisen-Komplexes kommt, der die Reduktion von Eisen erleichtert [Omar et al., 1990]. Aus Ergebnissen von weiteren Untersuchungen an Modell-

systemen, Rattenlebermikrosomen und Ratten wurde gefolgert, dass CYP 450-Systeme eine entscheidende Rolle für die OTA-abhängige LPO spielen [Omar et al., 1991b]. In isolierten Tubuli aus Rattennieren löste OTA (1 mmol/L) LPO aus. Eine Prävention mit Deferoxamin verhinderte dabei zwar die LPO, nicht aber die Zytotoxizität [Aleo et al., 1991]. In Vero-Zellen (Nierenzelllinie, Meerkatze) wurde die von OTA ausgelöste LPO durch Aspartam, Piroxicam, Superoxiddismutase und Katalase verringert [Baudrimont et al., 1997a]. In Ratten, die 60 Tage mit 120 µg/kg KG behandelt wurden, wurde ebenfalls eine um 36 % im Vergleich zur Kontrolle erhöhte LPO beobachtet [Petrik et al., 2003].

In einer umfangreichen Studie wurde die Rolle des oxidativen Stresses durch OTA in primären Tubuluszellen der Ratte und LLC-PK₁-Zellen untersucht. Dabei wurde in Abhängigkeit von OTA eine verringerte Viabilität der Zellen und eine erhöhte ROS-Produktion, die durch α-Tocopherol und N-Acetylcystein hemmbar war, beobachtet. Dies führte zu einer Verringerung des Gesamt-Glutathionlevels in den Zellen sowie zur Bildung von oxidierten Guanin-Resten (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin, 8-OH-dG) in der DNA [Schaaf et al., 2002]. Nach zweimaliger oraler Gabe von 1,8 mg/kg KG pro Woche war der GSH-Gehalt in der Leber von Han:NMRI-Mäusen nach vierzehn Tagen um 52% depletiert [Atroshi et al., 2000]. In der Leber und Niere von Ratten, die vier Wochen mit 250 µg/kg KG/d behandelt wurden, waren die Aktivitäten einer Reihe antioxidativ wirksamer Enzyme sowie GSH im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt [Meki & Hussein, 2001]. In kultivierten primären Hepatozyten (Mensch, Ratte) war nach Behandlung mit 0,1 – 10 µmol/L OTA über acht Stunden der Glutathionstatus (GSH/GSSG) signifikant erniedrigt [Gross-Steinmeyer et al., 2002].

In Ratten, die mit 2 mg/kg KG (24 h) behandelt wurden, fanden Gautier und Mitarbeiter hingegen weder erhöhte LPO in Plasma, Niere und Leber noch eine Induktion von 8-OH-dG in der DNA aus den Nieren der Tiere. Erniedrigte Plasmalevel an α-Tocopherol und eine erhöhte Expression der durch oxidativen Stress induzierten Hämoxygenase 1 wurden allerdings als Hinweise auf oxidativen Stress interpretiert [Gautier et al., 2001b].

In Läuferschweinen wurde nach Gabe von 18-50 µg/kg KG eine erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies im Blut beobachtet [Müller et al., 1999].

In einer Reihe von Studien wurde die toxische Wirkung von OTA in vivo durch Gabe von antioxidativ wirksamen Substanzen erniedrigt. So wurden in Mäusen, die mit OTA behandelt wurden, die beobachteten Veränderungen an Chromosomen während der Reifeteilung im Hoden und Anomalien in den Spermien durch zusätz-

liche Gabe von Vitamin C oder Retinol verringert [Bose et al., 1994; Kumari et al., 1994]. Des Weiteren wurde die Bildung von Adduktflecken im ^{32}P -Postlabelling durch OTA in Mäusen nach Vorbehandlung mit Vitamin A zu 70 %, mit Vitamin C zu 90 % und mit Vitamin E zu 80 % verhindert [Grosse et al., 1997b].

Durch die antioxidativen Enzyme Katalase und Superoxiddismutase (je 20 mg/kg KG) wurde die nephrotoxische Wirkung von OTA in Ratten bei s.c.-Injektion eine Stunde vor der OTA-Gabe (289 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG per Gavage) über 3 Wochen deutlich gehemmt [Baudrimont et al., 1993, 1994].

Bei gleichzeitiger Fütterung von OTA (1,7 bzw. 3 ppm) und Vitamin C (300 ppm) an Legehennen wurden die durch OTA verursachten Effekte (verringerte Futteraufnahme, Gewichtszunahme und Eierproduktion bei erhöhter Schalenelastizität) z.T. vollständig inhibiert [Haazele et al., 1993]. In einer anderen Studie an Legehennen wurden bei paralleler Fütterung von OTA und Vitamin E (24 IU) die OTA-abhängige Zunahme der Harnsäure im Blut und die LPO teilweise verringert. Vitamin C (200 bzw. 1000 mg/kg Futter) hatte hier keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter [Hoehler et al., 1996b].

3.1.7.11 OTA-induzierte Zytotoxizität

3.1.7.11.1 Beeinflussung der Viabilität

Im Rahmen unterschiedlicher Studien zur Untersuchung der Wirkung von OTA wurde häufig begleitend Zytotoxizität erfasst. Spezielle Studien zur Zytotoxizität sind kaum verfügbar. In einer Arbeit wurde die Zytotoxizität vergleichend in unterschiedlichen Zellsystemen mittels der Endpunkte Neutralrotaufnahme und MTT-Reduktion untersucht [Dietrich et al., 2001]. In Tabelle 14 sind die verfügbaren Daten zur Zytotoxizität durch OTA zusammengefasst.

Nach Kurzzeitinkubation von Nierenkortexzellen (Schwein) wurde durch OTA keine Beeinflussung der Membranintegrität beobachtet [Braunberg et al., 1992]. In der Literatur ist häufig nicht angegeben, ob die Inkubation mit OTA unter serumfreien Bedingungen erfolgte. Dies macht eine Interpretation der Ergebnisse schwierig, da OTA stark an Serumproteine bindet (s. Kap. 3.1.7.13) und damit die Toxizität sinkt [Dietrich et al., 2001], wie auch durch eigene Versuche belegt wurde.

Tabelle 14: Literaturdaten zur Messung von Viabilität

Zellsystem	Endpunkt	Dauer [h]	Abnahme ab/ EC ₅₀ [µmol/L]	Referenz
Primäre Nierentubuluszellen (Ratte)	MTT-Reduktion	24	> 12,5	Schaaf et al., 2002
LLC-PK1 ¹⁾	MTT-Reduktion	24	> 6,25	Schaaf et al., 2002
Primäre Nierekortexzellen (Schwein)	Neutralrotaufnahme/ MTT-Reduktion	24	6/ 35	Dietrich et al., 2001
LLC-PK1 ¹⁾	Neutralrotaufnahme/ MTT-Reduktion	24	9/ 75	Dietrich et al., 2001
SB3 ²⁾	Neutralrotaufnahme	24	> 80	Dörrenhaus et al., 2000
WB-F344 ³⁾	Neutralrotaufnahme	24	> 80	Dörrenhaus et al., 2000
MDCK ⁴⁾	Neutralrotaufnahme	24	7	Lebrun & Föllmann, 2002
Primäre Blutzellen (Rind)	MTT-Reduktion	96	4	Charoenpornsook et al., 1998
Rattenastrozyten	LDH-Abgabe	46	> 20	Belmadani et al., 1999

¹⁾ Tubuluszelllinie, Ratte, ²⁾ Nierenepithelzelllinie, Mensch, ³⁾ Nierenepithelzelllinie, Ratte, ⁴⁾ Nierenzelllinie, Kaninchen

3.1.7.11.2 Wachstumshemmung

In einer Reihe von Studien wurde auch die OTA-abhängige Wachstumshemmung untersucht (Tabelle 15). Der Vergleich der Literaturdaten zeigt auch hier, dass OTA in verschiedenen Zellsystemen gänzlich unterschiedliche Effekte zeigt. Ein Problem bei der Interpretation der Daten ist auch hier die Tatsache, dass oft nicht klar ist, ob und wie viel FKS im Inkubationsmedium enthalten war.

In HeLa-Zellen (Epithel, Mensch) und Hepatomzellen wurde gezeigt, dass 77 µmol/L bzw. 40 µmol/L OTA zytostatisch wirkten [Creppy et al., 1979a,c]. Xiao und Mitarbeiter bestimmten mit HeLa-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit OTA einen IC₅₀-Wert von 5 µmol/L [Xiao et al., 1996b].

Tabelle 15: Literaturdaten über die Wachstumshemmung in vitro durch OTA

Zellsystem	Endpunkt	Dauer [h]	IC ₅₀ [µmol/L]	Referenz
MDCK ¹⁾	Proteinbiosynthesehemmung	24	15 ²⁾	Creppy et al., 1986 ³⁾
Vero ⁴⁾	Proteinbiosynthesehemmung	24	14 ²⁾	Grosse et al., 1995a ³⁾
Vero ⁴⁾	Proteinbiosynthesehemmung	24	14,5 ²⁾	Baudrimont et al., 2001 ³⁾
LLC-PK1 ⁵⁾	Wachstumshemmung (Zellzahlen)	24	1	O´Brian et al., 2001
NRK52E ⁶⁾	Wachstumshemmung (Zellzahlen)	24	5	O´Brian et al., 2001
Primäre Kortexzellen (Schwein)	Wachstumshemmung (Zellzahlen)	24	0,7	O´Brian et al., 2001
Primäre Kortexzellen (Schwein)	Wachstumshemmung (Zellzahlen)	24	1	O´Brian et al., 2001
DOK ⁷⁾	Proteinbiosynthesehemmung	34	8	Baudrimont et al., 2000
MEF ⁸⁾	Proteinbiosynthesehemmung	34	9,6	Baudrimont et al., 2000
CHO ⁹⁾	Wachstumshemmung („colony forming“)	24	8	Stetina et al., 1986
AWRF ¹⁰⁾	Wachstumshemmung („colony forming“)	24	16	Stetina et al., 1986
Astrozyten	Proteinbiosynthesehemmung	240	0,025-0,033	Monnet-Tschudi et al., 1997

¹⁾ Nierenzelllinien, Kaninchen, ²⁾ in Gegenwart von 5 % FKS, ³⁾ in einem Labor angefertigte Studien
⁴⁾ Nierenzelllinien, Affe, ⁵⁾ Nierenzelllinie, Schwein, ⁶⁾ Nierenzelllinie, Ratte, ⁷⁾ Keratinozytenzelllinie,
⁸⁾ Fibroblastenzelllinie, Maus (embryonal), ⁹⁾ Epithelzelllinie (Ovar), Hamster, ¹⁰⁾ Fibroblastenzelllinie, Ratte

3.1.7.12 Mechanismen der Zytotoxizität

Der Zelltod ist in zwei Formen differenzierbar: Apoptose, der sogenannte programmierte Zelltod und Nekrose (s. Kap. 3.3). Das Potenzial von OTA, Apoptose zu induzieren, wurde in den proximalen Tubuluszelllinien IHKE (human) und OK (Opossum), sowie in den Zelllinien MDCK-C7 und MDCK-C11 (Sammelleiter, Kaninchen) untersucht. Eine erhöhte Caspase 3-Aktivität, ein Schlüsselenzym bei der Apoptoseinduktion, wurde in IHKE Zellen zeit- und dosisabhängig beobachtet (signifikante Erhöhung nach 7 d: 5 nmol/L; 72 h: 10 nmol/L; 24 h: 10 nmol/L). Die Apoptoseinduktion wurde durch das Auftreten von Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung durch 30-100 nmol/L OTA nach 24h bestätigt. Die Caspase 3-Aktivierung wurde auch in den Zelllinien OK, MDCK-C7 und MDCK-C11 beobachtet.

tet, diese Zellen reagierten jedoch deutlich weniger sensitiv als die IHKE-Zellen. Weitergehende Untersuchungen mit IHKE-Zellen zeigten, dass weder der Radikalfänger N-Acetylcystein noch der Ca-Chelator BAPTA-AM einen Effekt auf die Apoptoseinduktion hatten. Die Autoren schlossen, dass der Mechanismus der durch niedrige OTA-Konzentrationen hervorgerufenen Apoptoseinduktion nicht auf eine Beteiligung freier Radikale oder einer Beeinflussung des intrazellulären Calciumlevels zurückzuführen ist. [Schwerdt et al., 1999b]

In einer anderen Studie wurde an MDCK-C7-Zellen festgestellt, dass der MAP-Kinase-Signalweg an der Apoptoseinduktion beteiligt ist. Nachdem gezeigt worden war, dass OTA die Kinasen ERK 1 und ERK 2 (extracellular signal-regulated kinase) aktiviert, wurde weiterhin eine Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) durch achtstündige Inkubation 10-1000 nmol/L OTA beobachtet. Bei 100 nmol/L aktivierte OTA in MDCK-C7-Zellen die Caspase 3. Zudem wurde DNA-Fragmentierung detektiert, nicht jedoch Nekrose der Zellen (LDH-Austritt). MDCK-C11-Zellen zeigten keine Aktivierung dieser Endpunkte, außer einer DNA-Fragmentierung ab 300 nmol/L OTA, die proportional zur LDH-Freisetzung auftrat, was als Hinweis darauf gewertet wurde, dass das primäre toxische Ereignis in MDCK-C11-Zellen die Nekrose ist. Die pro-apoptotische Wirkung des Tumornekrosefaktors α (TNF α) wurde durch 100-500 nmol/L OTA dosisabhängig verstärkt, in MDCK-C7-Zellen allerdings stärker als in MDCK-C11-Zellen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der JNK-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseinduktion durch OTA spielen könnte und dass dadurch möglicherweise die Veränderungen der renalen Funktion und die Teratogenität erklärt werden könnten. [Gekle et al., 2000]

OTA induzierte außerdem Apoptose in der humanen promyelotischen Leukämiezelllinie HL-60. Eine 24 h-Inkubation mit 3-4 $\mu\text{g/ml}$ OTA führte neben der Apoptose auch zu Zytotoxizität, gemessen über MTT-Reduktion. [Ueno et al., 1995]

In kultivierten proximalen Tubuluszellen der Ratte und in der Niere von Ratten wurde mittels „microarray“ Technik die Aktivierung einer Reihe von Apoptose-relevanten Genen gefunden [Lühe et al., 2003].

In Nieren von Ratten, die fünf Tage mit 0,8 mg/Tier OTA behandelt wurden, detektierten Mantle und Mitarbeiter keine Apoptoseinduktion, wohl aber extensive Nekrose [Mantle et al., 1998].

Die Toxizität von OTA, von drei natürlichen Analogen und von 10 synthetischen Analogen wurde in vivo (Maus, i.p.; Ratte, i.v.) und in vitro (HeLa-Zellen, *Bacillus brevis*) untersucht, um die Strukturelemente zu identifizieren, die für die Toxizität

verantwortlich sind. Die Ergebnisse zeigten, dass die Wirkung mit dem Isocumarinsystem, nicht aber mit der Dissoziation der phenolischen Hydroxylgruppe oder den eisenchelierenden Eigenschaften des Moleküls assoziiert ist. Möglicherweise sei auch die Lacton-Carbonylgruppe in die Toxizität involviert. Von allen untersuchten Derivaten zeigte OTA die stärkste Toxizität. [Xiao et al., 1996b]

3.1.7.13 Bindung an Proteine

Eine frühe Studie fand keine Bindung von OTA an Makromoleküle aus dem Zytosol von Schweinenieren. Allerdings wurde die Bindung von OTA an ein 20kDa Protein aus dem Plasma von Menschen und Schweinen beobachtet. Die Bindung erfolgte mit höherer Affinität als die Bindung an Serumalbumin (s. Kap. 3.1.6) [Stojkovic et al., 1984].

Schwerdt et al. [1999a] untersuchten zahlreiche Proteine aus Nierenzelllinien sowie Intestinum, Leber, Milz, Niere und Plasma von Ratten mittels Westernblotanalyse auf die Fähigkeit OTA zu binden. Eine Bindung wurde für nahezu alle Serumproteine und zahlreiche Proteine (insbesondere mit der Masse 60, 40, und 27 kDa) aus Intestinum, Leber, Milz und Niere gezeigt. Durch Phenylalanin oder Aspartam wurde die OTA-Bindung an die 60 kDa- und 27 kDa-Proteine in der Leber unterbunden, nicht jedoch in den Fraktionen aus anderen Organen. Das Bindungsverhalten von OTA war für alle untersuchten Zelllinien vergleichbar, Phenylalanin und Aspartam hatten keinen Einfluss auf die Bindung. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Proteinbindung für eine Akkumulation in den Zellen verantwortlich, der in anderen Studien beobachtete protektive Effekt von Phenylalanin und Aspartam aber nicht über die Proteinbindung erklärbar sei [Schwerdt et al., 1999a]. Die schwächere Bindung von OTA würde aber zu einer beschleunigten Ausscheidung führen und so die Langzeit-Toxizität von OTA verringern.

In proximalen Tubuluszellen wurde die OTA-abhängige Abnahme intrazellulären ATPs durch zusätzliche Behandlung mit Probenecid, einem Inhibitor des organischen Aniontransporters 1 (OAT1) reduziert. Ebenso waren OAT1-exprimierende Oozyten sensitiver gegenüber OTA. Der Autor schloss, dass OTA durch den OAT1 transportiert werde. [Endou, 1998]

Untersuchungen mit Nierenkortex-Homogenaten unterschiedlicher Spezies (Maus, Ratte, Schwein, Mensch) erbrachten Hinweise auf ein zytosolisches Protein, das spezifisch und sättigbar OTA bindet. Konkurrenzexperimente zeigten, dass es

sich dabei vermutlich nicht um einen steroidhormonartigen Rezeptor und nicht um einen der bekannten organischen Aniontransporter handelt. [Heussner et al., 2002]

In verschiedenen Systemen wurde gezeigt, dass OTA sehr effektiv die Proteinbiosynthese hemmt [Baudrimont et al., 1997b; Braunberg et al., 1992; Creppy et al., 1980a, 1984, 1986; Elling et al., 1985; Grosse et al., 1995; Jeffery et al., 1984; Heller & Rösenthaller, 1978; Monnet-Tschudi et al., 1997; Rösenthaller et al., 1984; Stormer & Lea, 1995; Wiger & Stormer, 1990]. Dieser Effekt wurde auf eine Hemmung der Aminoacylierung von Phenylalanin-tRNA durch die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase zurückgeführt [Bunge et al., 1978; Creppy et al., 1983b,c; Rösenthaller et al., 1984; Roth et al., 1989]. In der Tat wurde eine Bindung von OTA an isolierte Phenylalanyl-tRNA-Synthetase in Rechenmodellen simuliert [McMasters & Vedani, 1999]. In vielen Untersuchungen wurde die Proteinbiosynthesehemmung durch Aspartam und L-Phenylalanin verringert oder aufgehoben [Baudrimont et al., 1997b, 2001; Creppy et al., 1980; 1984, 1986; 1995; 1998]. Die präventive Wirkung von Aspartam könnte auf der Bindung an Plasmaalbumin beruhen, die eine schnellere Ausscheidung von OTA zur Folge hätte. Die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften einer aufgereinigten Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *Bacillus subtilis* bestätigten eine starke Bindung und Inhibierung durch OTA nicht [Roth et al., 1993]. Zanic-Grubisic et al. [2000] zeigten, dass auch die Phenylhydroxylase durch OTA kompetitiv gehemmt wird.

3.1.8 Beobachtungen am Menschen

Expositionsbiomarker:

OTA hat im Menschen eine Halbwertszeit von ca. 35 Tagen [Bauer & Gareis, 1987; Schlatter et al., 1996]. Die Blutkonzentrationen von OTA werden als Biomarker für die Exposition angesehen, was durch vergleichende Kalkulationen der Belastung aus der Blutanalyse und der Aufnahme über Verzehrserhebungen bestätigt wird [Märtlbauer et al., 2000; IPCS, 2001].

Effektbiomarker:

Der nephrotoxische Effekt von OTA ist durch Urinanalytik messbar, allerdings relativ unspezifisch und relativ spät im Verlauf der Nephropathie. Als früher, aber ebenfalls unspezifischer, Effektmarker kann auftretende Anämie dienen. Eine eindeutige Diagnose ist allerdings schwierig. [IPCS, 2001]

3.1.8.1 Endemische Balkan Nephropathie

Die endemische Balkan Nephropathie (BEN) ist eine Nierenerkrankung, die endemisch in ländlichen Bevölkerungsgruppen auf dem Balkan auftritt und mit einer erhöhten Belastung durch OTA in Zusammenhang gebracht wird. Bisher wurde die Krankheit in Bosnien-Herzegowina, Bulgarien, Kroatien und Jugoslawien (Serbien) beobachtet. Erstmals wurde sie in den frühen 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts beschrieben [Danilovic et al., 1957; Tanchev & Dorossiev, 1991], es gibt aber Hinweise, dass sie schon früher auftrat [Belicza et al., 1979].

Die Krankheit beginnt ohne Akutphase im Alter von 30-50 Jahren. Es sind aber auch Krankheitsfälle bei Jugendlichen beschrieben [Chernozemsky et al., 1978b]. Der Krankheitsverlauf ist langsam und nach einer Reihe unspezifischer Symptome manifestiert sich eine untypische Einschränkung der Nierenfunktionen [Radonic & Radosevic, 1992]. Es kommt in den Nierentubuli zur Abnahme des tubulären Transports, sichtbar durch schwache Proteinurie, die begleitet wird durch das charakteristische Auftreten von Proteinen mit niedriger relativer Molekülmasse [Hall & Vasiljevic, 1973]. Anämie gehört zu den ersten klinischen Zeichen der Nephropathie und geht der Niereninsuffizienz voraus [Radonic & Radosevic, 1992]. Weitere allerdings unspezifische klinische Symptome sind häufige Kopfschmerzen, Schmerzen in den Lenden und Asthenie. In fortgeschrittenen Fällen werden bei den Patienten Gewichtsverlust, Xanthodermie und eine ungewöhnliche Gelbfärbung des Fettgewebes beobachtet

[Radonic & Radosevic, 1992; Vukelic et al., 1992]. In der Ultraschalluntersuchung erscheint die Niere in den frühen Krankheitsphase normal, wird aber kleiner mit fortschreitender Nephropathie [Borso, 1996]. In einem Extremfall wog ein Organ post mortem nur noch 20 g. Die Nieren erschienen blass-grau und waren schwer zu schneiden [Vukelic et al., 1992].

Pathomorphologisch kann die Krankheit als interstitielle, bilaterale, nicht-inflammatorische und nicht-obstruktive Nephropathie mit starker Degeneration des tubulären Epithels beschrieben werden. Zudem treten extensive interstitielle Fibrose im Cortex und Hyalinisierung auf [Radonic & Radosevic, 1992; Vukelic et al., 1992]. Als biochemische Parameter treten neben der leichten Proteinurie auch Glucosurie, Leukozyteninfiltration, sowie erhöhte Level an Harnsäure, Kreatinin, IgG und IgM im Blut auf. Zudem sind einige Aktivitäten renaler Enzyme erhöht (γ -Glutamyltransferase, Alkalische Phosphatase, Lactatdehydrogenase). [Pfohl-Leszkowicz et al., 2002b]

Da es keine spezifischen, klinischen und pathognomonischen Laborparameter für diese Krankheit gibt, ist die frühe Diagnose schwer und nur durch wiederholtes Auftreten von Proteinurie, Kreatininämie, Anämie und familiäre Prädisposition durchführbar [IPCS, 2001].

Die Prävalenz für die BEN wird in der Literatur mit 2-10 % in den betroffenen Gebieten angegeben. Für Kroatien wurde bei der Evaluierung der Fälle von 1975 bis 1990 eine Prävalenz von 0,5-4,4 % gefunden. Die spezifische Mortalität (berechnet auf der Basis von offiziellen Statistiken und dokumentierten Fällen) lag in der Zeitperiode von 1957-1984 bei 1,5/1000 pro Jahr. Dabei sind mehr Frauen als Männer von der Krankheit betroffen, zudem sterben sie früher als Männer an der BEN. [Ceovic et al., 1992; Chernozemsky et al., 1977; IPCS, 2001]

In den Gebieten, in denen die BEN auftrat, wurde eine höhere Inzidenz für Tumoren des oberen harnführenden Traktes beobachtet [Ceovic & Miletic-Medved, 1996; Chernozemsky et al., 1977; Markovic et al., 1976; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002b]. In endemischen Regionen in Kroatien war die Prävalenz für Tumoren in Nierenbecken und Harnleiter 11mal höher als in nicht-endemischen Gebieten. Prinzipielle Unterschiede zwischen Tumoren der Harnwege aus endemischen und nicht-endemischen Gebieten sind die höhere Frequenz in endemischen Regionen, das Auftreten bei jüngeren Patienten und das vermehrte Auftreten bei Frauen. Zudem sind in Endemiegebieten vor allem Nierenbecken und Harnleiter betroffen, in anderen Regionen die Harnblase [Sostaric & Vukelic, 1991]. Dies wurde bestätigt durch eine Studie am urologischen Institut der Universitätsklinik Belgrad an 766 Patienten mit Tumo-

ren der oberen Harnwege von 1970-1997, bei der Tumoren in Nierenbecken und Harnleiter in 68 % der Patienten aus Endemiegebieten und bei 32 % der übrigen Bevölkerung gefunden wurde. Des Weiteren waren Frauen stärker betroffen und bilaterale Tumoren traten in Patienten aus endemischen Regionen in 13 % der Fälle auf (2 % bei den übrigen Patienten). [Djokic et al., 1999]

Ähnlichkeiten zwischen den Veränderungen der Nierenstruktur und -funktion in Gebieten mit BEN und der OTA-induzierten Nephropathie bei Schweinen führten zu der Vermutung eines kausalen Zusammenhangs zwischen OTA und BEN [Krogh, 1976b]. Eine Beteiligung von Mykotoxinen an der BEN würde auch epidemiologische Besonderheiten der Krankheit erklären, wie das Auftreten vor allem in ländlichen Gebieten und innerhalb betroffener Dörfer vor allem in Haushalten, die schattig gelegen sind und infolge dessen schlechtere Lagerungsbedingungen für Lebensmittel wie Getreide bieten. Diese Vermutung wird durch epidemiologische Parallelitäten beim Auftreten von erhöhter OTA-Belastung und BEN gestützt [Krogh, 1976b].

Trotz des ubiquitären Auftretens von OTA zeigten Lebens- und Futtermittelproben aus BEN-Gebieten eine deutlich höhere Belastung (s. Kap. 3.1.5) [Krogh, 1992]. In einer Studie, bei der über fünf Jahre 524 Lebensmittelproben aus endemischen und nicht-endemischen Regionen in Bulgarien untersucht wurden, fand man vielfach mehr positive Proben in den endemischen Gebieten [Krogh et al., 1977; Pavlovic et al., 1979; Petkova-Bocharova & Castegnaro, 1985; Vrabcheva et al., 2000]. Belastet waren nicht nur Getreide, sondern z.B. auch geräuchertes Fleisch [Pfohl-Leszkowicz, 2002b].

OTA wurde in humanen Blutproben von Bewohnern aus Endemiegebieten in deutlich höheren Konzentrationen gefunden, als in nicht-endemischen Regionen [Hult et al., 1982; Petkova-Bocharova & Castegnaro, 1985; Radic et al., 1997]. Positive Proben (> 2 ng/mL) wurden bei 17 % der Bevölkerung aus endemischen und 6 % aus nicht-endemischen Regionen gefunden. Ähnliche Befunde ergaben sich aus der Untersuchung von Blutproben in Bulgarien (18 bzw. 8 %) [Petkova-Bocharova et al., 1988]. Bei der Evaluierung der humanen Belastung in Kroatien anhand von Blutproben aus 5 Städten fiel auf, dass die höchste Anzahl positiver Proben (> 0,2 ng/L, 100%), die höchste mittlere OTA-Konzentration (0,68 ng/L) und die höchste Rate an Proben mit mehr als 1ng/ml (18 %) in der Stadt gefunden wurde, die dem endemischen Gebiet in Kroatien am nächsten lag [Peraica et al., 1999]. Im Urin von Bewohnern aus Endemiegebieten wurden ebenfalls erhöhte Gehalte an OTA gefunden, die höchsten Gehalte wurden in BEN-Patienten und Patienten mit Tumoren der oberen Harnwege gefunden [Castegnaro et al., 1991].

OTA ist möglicherweise nicht die einzige Ursache für die BEN. So wurde in einigen Studien zur OTA-Belastung eine Kokontamination von Lebensmitteln mit dem Mykotoxin Citrinin beobachtet [Petkova-Bocharova et al., 1991; Vrabcheva et al., 2000]. Zudem zeigten Tierversuche, dass die Toxizität von Citrinin Ähnlichkeiten mit der von OTA aufweist und dass die OTA-Toxizität bei gleicher Gabe von Citrinin deutlich verstärkt wird [Braunberg et al., 1994; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002b]. In den achtziger Jahren wurde ein weiteres stark nephrotoxisches und nephrokanzerogenes Mykotoxin aus *Penicillium polonicum* (vormals: *Penicillium aurantiogriseum*) isoliert [Yeulet et al., 1988]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass dieses Nephrotoxin Karyomegalien in den proximalen Tubuli von Ratten sehr viel potenter induzierte als OTA selber [Mantle et al., 1991] und ein starker Induktor für Apoptose in der Rattenniere ist [Mantle et al., 1998; Miljkovic et al., 2003]. Die Untersuchungen von Lebensmittelproben zeigten, dass *P. polonicum* häufiger auftrat als ochratoxigene Schimmelpilze [Mantle & McHugh, 1993].

Es gibt außerdem Hinweise für eine Beteiligung von Schwermetallen. So wurden erhöhte Gehalte an Cadmium, Chrom, Mangan, und Kobalt im Wasser in Endemiegebieten gefunden [Nichifor et al., 1985], möglicherweise besteht aber auch ein Zusammenhang mit Selenmangel [Maksimovic & Djujic, 1997]. Weitere Untersuchungen deuten einen Zusammenhang von BEN und dem Braunkohleabbau in den Endemiegebieten und dem damit verbundenen, vermehrten Auftreten von organischen Verbindungen im Wasser an [Feder et al., 1991; Goldberg et al., 1994; Tatu et al., 1998]. Eine Beteiligung des Alkaloids Aristolochiasäure, die ähnliche toxische Effekte wie OTA hervorruft, wurde vermutet, aber nicht eindeutig belegt [Pfohl-Leszkowicz et al., 2002b].

Auch die Rolle von Bakterien, Leptospiren und Viren wurde in zahlreichen Studien untersucht. Dabei wurden Infektionen mit *E. Coli* und Leptospiren nicht als Ursache bestätigt [Pfohl-Leszkowicz et al., 2002b]. Bei pathologischen Untersuchungen von Biopsieproben von sieben BEN-Patienten wurden zytoplasmatische, Partikel enthaltende Vesikel gefunden. Die Partikel zeigten Charakteristika von Coronaviren. Dass die meisten BEN-Patienten Kontakt zu Schweinen hatten, die wiederum bekanntermaßen Coronaviren auf den Menschen übertragen können, stützt die These, dass solche Viren an der BEN beteiligt sein könnten [Apostolov et al., 1975; Uzelac-Keserovic et al., 1999]. Georgescu und Mitarbeiter bestätigten das Vorhandensein von Viruspartikeln in BEN-Patienten, kamen aber zu dem Schluss, dass die Partikel nicht eindeutig einer Familie zugeordnet werden können [Georgescu & Diosi, 1981]. Weitere Untersuchungen zeigten das vermehrte Auftreten von Infektionen mit Papovaviren (BK, SV 40) und murinen Viren in BEN-Gebieten [Stoian et al., 1983; Pfohl-

Leszkowicz et al., 2002b]. Die Injektion von Blutseren aus BEN-Patienten führte in Meerschweinchen, nicht jedoch in Ratten, Mäusen und Hamstern zu Infektionen. Aus den Ergebnissen wurde auf eine Beteiligung einer langsamen Virusinfektion geschlossen, die möglicherweise von Nagern übertragen werde [Draganescu et al., 1983; Radovanovic, 1987].

3.1.8.2 Sonstige Beobachtungen

In Tunesien wurde ebenfalls eine chronische, glomeruläre Nephropathie untersucht, die Ähnlichkeiten mit dem klinischen Bild der BEN aufweist. Untersuchungen von Blutproben betroffener Nephropathiepatienten zeigten eine deutliche Belastung mit OTA [Achour et al., 1993; Bacha et al., 1993; Maaroufi et al., 1995]. Eine Beteiligung von OTA bei Patienten mit Nierenschädigungen wurde auch in Frankreich (Alsace, Aquitaine, Rhône-Alpes; 1991-1992) vermutet [Creppy et al., 1993b]

3.2 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird in Lebewesen hervorgerufen, wenn im Organismus mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, als durch die antioxidative Abwehr beseitigt werden. Weil diese ROS ein hohes Potential besitzen, Gewebe und Zellbestandteile wie Membranen, DNA und Proteine zu schädigen, steht der oxidative Stress im Mittelpunkt zahlreicher Forschungsaktivitäten. [Kelly et al., 1998]

Im Folgenden werden ROS, antioxidative Abwehrmechanismen (s. auch Abbildung 5) und ihre Folgen für den Organismus näher erläutert.

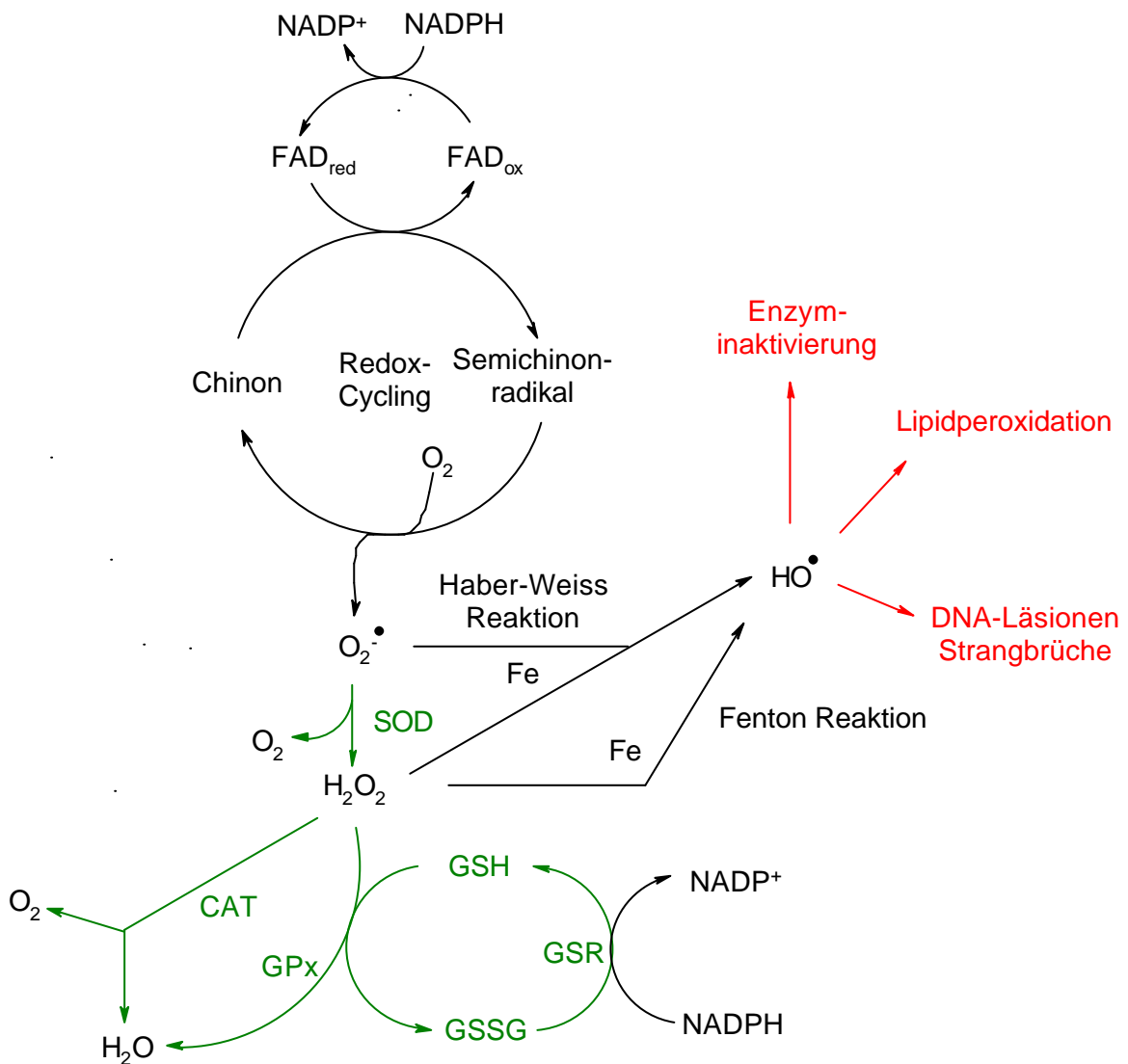


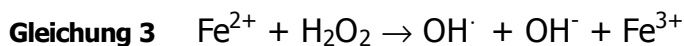
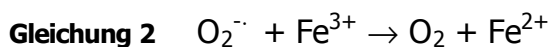
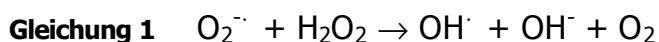
Abbildung 5: Vereinfachte Übersicht über die Entstehung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Abwehrmechanismen (grün) und Schädigungen (rot) [nach Kelly et al., 1998; Sies, 1985]

3.2.1 ROS, ihre Reaktionen und die Folgen

Unter ROS versteht man radikalische und nicht-radikalische Sauerstoffderivate. Radikale sind z.B. das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}), Alkoxy- und Alkylperoxy-Radikale. Zu den nicht-radikalischen Spezies gehören Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon, hypochlorige Säure ($HOCl$) und Alkylhydroperoxide. [Eisenbrand & Metzler, 2001]

Das O_2 -Molekül ist in seinem Grundzustand mit zwei ungepaarten Elektronen (Triplettzustand) als freies Radikal anzusehen und reagiert deshalb auch hauptsächlich mit Radikalen. Durch Reduktion von O_2 in der Atmungskette mit einem Elektron entsteht $O_2^{\cdot-}$, mit zwei Elektronen (und Protonierung) H_2O_2 , nach einer weiteren Elektronenübertragung (und Protonierung) das hochreaktive OH^{\cdot} und OH^- und schließlich nach erneuter Reduktion (und Protonierung) H_2O [Berg et al., 2001]. Während der Reduktion von Sauerstoff in der Atmungskette kann es zu einer Freisetzung der einzelnen Spezies kommen.

Das Hydroxylradikal OH^{\cdot} ist mit einer Halbwertszeit von 10^{-9} s die reaktivste Sauerstoffspezies [Sies, 1991] und wirkt mit einem Standardreduktionspotential von 2,31 V stark oxidierend [Halliwell et al., 1999]. OH^{\cdot} kann in vielen biologisch relevanten Systemen entstehen wie z.B. durch die schwermetallionenkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion (z.B. Kupfer, Eisen, Gleichung 1) aus $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 . Die eisenionenkatalysierte Reaktion wird auch als Fentonreaktion bezeichnet (Gleichung 2 und Gleichung 3) [Eisenbrand & Metzler, 2002].



Durch UV-induzierte homolytische Spaltung von H_2O_2 oder durch die Zersetzung von Wasser durch ionisierende Strahlung wird ebenfalls OH^{\cdot} gebildet [Halliwell et al., 1999]. Bei der Weiterreaktion bevorzugen OH^{\cdot} -Radikale drei Reaktionstypen, die u. a. bei der Autoxidation von Fetten eine Rolle spielen: Wasserstoffabstraktion, Addition und Elektronentransfer.

Das Superoxidradikalanion $O_2^{\cdot-}$ wird in vivo durch eine Reihe von Enzymen gebildet, die O_2 zu $O_2^{\cdot-}$ reduzieren (Tabelle 16).

Tabelle 16: Beispiele für Enzyme, die Superoxidanionradikale generieren nach [Halliwell et al., 1999]

Enzym	Lokalisation
Peroxidasen (nicht spezifisch)	Pflanzen, Bakterien, Tiere (Myeloperoxidase in Phagozyten)
Xanthin-Oxidase	Darm, ischämisches Gewebe
NO-Synthase	Säugetierzellen (überwiegend)
Tryptophan Dioxygenase	Leber
Aldehyd-Oxidase	Leber

Die Xanthin-Oxidase katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin. Dabei können Elektronen zu geringen Anteilen auf O_2 anstatt auf NAD^+ übertragen werden. Hämproteine bilden nach O_2 -Bindung durch Elektronenübertragung von Fe^{2+} auf O_2 Superoxidanionradikale. Aus solchen Proteinen und aus Elektronentransportketten, wie bei Cytochrom P450-Enzymen vermittelten Reaktionen oder in den Mitochondrien, kann es durch Leckage zur Freisetzung von $O_2^{\cdot-}$ kommen. Etwa 1-3% des in den Mitochondrien verbrauchten O_2 verlässt die Atmungskette als $O_2^{\cdot-}$ reduziert, wodurch die erhöhte oxidative Schädigung der mitochondrialen Lipide und DNA erklärt wird [Halliwell et al., 1999; Wei, 1998]. Des Weiteren kann $O_2^{\cdot-}$ durch Autoxidationsreaktionen einiger Moleküle wie FMNH₂, FADH₂, Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin gebildet werden [Sies, 1991]. Xenobiotika, die die strukturellen Eigenschaften zum sogenannten „Redox-Cycling“ aufweisen, können so ebenfalls $O_2^{\cdot-}$ bilden. Hierbei nimmt ein Chinon von einer Reduktase ein Elektron auf, das dann auf O_2 übertragen wird (Abbildung 5). Dieser Prozess ist für die Toxizität vieler Stoffe verantwortlich. [Eisenbrand & Metzler, 2002]

Singulett-Sauerstoff 1O_2 zeichnet sich dadurch aus, dass die $\pi^* 2p$ -Elektronen entgegengesetzten Elektronenspin aufweisen. Dabei existieren zwei Formen, die sich in ihrer Elektronenkonfiguration und Reaktivität unterscheiden. Bei dem Zustand $^1\Delta_g O_2$ handelt es sich zwar nicht um ein Radikal, da keine ungepaarten Elektronen vorliegen, er ist aber dennoch deutlich reaktiver als der Grundzustand. $^1\Sigma_g^+ O_2$ ist wie der Grundzustand ein Diradikal (mit entgegengesetztem Elektronenspin), der noch reaktiver ist als $^1\Delta_g O_2$, zerfällt aber schnell in den Letzteren. Singulett-Sauerstoff entsteht durch Lichtanregung oder CYP 450 abhängig aus Lipidperoxiden und reagiert dann mit ungesättigten Fettsäuren in einer Art „Cyclo-Addition“ [Belitz et al., 2001; Eisenbrand & Schreier, 1995].

Wasserstoffperoxid H_2O_2 wird wie $O_2^{\cdot-}$ durch viele enzymabhängige Prozesse gebildet. Guanyl-Cyclase, Glucose-Oxidase, Monoamin-Oxidase oder die Superoxid-dismutase (SOD, Abbau von $O_2^{\cdot-}$) generieren H_2O_2 , das nur noch schwach oxidierend oder reduzierend wirkt und somit nur schwach reaktiv ist. H_2O_2 ist nicht in

der Lage, direkt DNA, Lipide und Proteine, wohl aber Thiol-Gruppen mancher Proteine zu oxidieren, die dadurch inaktiviert werden können [Sies, 1991; Kelly et al., 1998; Halliwell et al., 1999].

Im Körper entstehen ROS durch die oben geschilderten Prozesse. Sie sind nicht immer nur Nebenprodukte einer Enzymreaktion, sondern werden z.B. von Leukozyten gebildet, um Mikroorganismen zu bekämpfen [Delves et al., 2000]. Des Weiteren werden ROS bei der Synthese der Entzündungsmediatoren Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane aus Arachidonsäure benötigt [Halliwell et al., 1999].

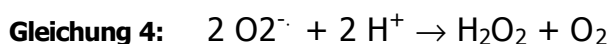
3.2.2 Antioxidative Abwehrmechanismen

Da die unter 3.2.1 vorgestellten Sauerstoffspezies aufgrund ihrer Reaktivität Zellbestandteile schädigen können, brauchen aerobe Organismen effiziente Schutzmechanismen gegen diese ROS, von denen einige im Folgenden näher betrachtet werden.

3.2.2.1 Enzyme, die ROS und Radikale katalytisch beseitigen

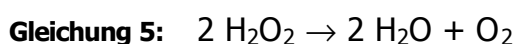
Superoxiddismutase (SOD):

In Eukaryonten existieren drei Isoformen dieses Enzyms: Mangan-SOD, Kupfer/Zink-SOD und extrazelluläre SOD. Alle drei Formen besitzen die Fähigkeit, $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 und O_2 zu dismutieren (Gleichung 4) [Kelly et al., 1998].



Katalase (CAT):

Die CAT können das u.a. von der SOD gebildete H_2O_2 schnell und effektiv zu Wasser und O_2 umsetzen (Gleichung 5). Sie enthalten Mangan oder eine Häm-Gruppe im katalytischen Zentrum und kommen hauptsächlich in Peroxisomen vor [Halliwell et al., 1999].



Glutathionperoxidasen (GPx)/ Glutathion:

Durch die GPx werden organische Peroxide (ROOH) und H_2O_2 reduziert, die ebenfalls zu den ROS gehören. Die Reduktionsäquivalente werden von dem nicht-enzymatischen Antioxidans Glutathion (GSH) bereitgestellt (Gleichung 6) [Kelly et al., 1998].



Das ubiquitär verbreitete Tripeptid GSH (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin), das in der Leber durch enzymatische Verknüpfung von L-Glutaminsäure mit L-Cystein und darauffolgender Kondensation mit Glycin synthetisiert wird, trägt als reaktive Gruppe eine Schwefel-Wasserstoff-Gruppe (Abbildung 6) [Meister & Anderson, 1983]. Die Thiolgruppe reduziert zahlreiche ROS ($^1\text{O}_2$, OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$) und wird dabei zu GSSG oxidiert. Glutathion kann in den Zellen proteingebunden, in reduzierter (GSH) oder in oxidiert (GSSG) Form vorliegen. Intrazellulär beträgt der Anteil von GSH am Gesamtglutathion (tGSH) etwa 90 %, was durch die GSR gewährleistet wird. Eine Senkung dieses Anteils oder eine GSH-Depletion kann durch starken oxidativen Stress verursacht werden oder diesen zur Folge haben, da durch die Depletion die antioxidative Kapazität der Zelle gesenkt wird [Kelly et al., 1998]. In unserer Gruppe wurde die höhere Sensitivität gegenüber Oxidantien (Endpunkt: oxidative DNA-Schäden) nach Depletion von Glutathion durch Behandlung von Zellen u.a. mit Alkenalen gezeigt [Glaab et al., 2002; Janzowski et al., 2003]

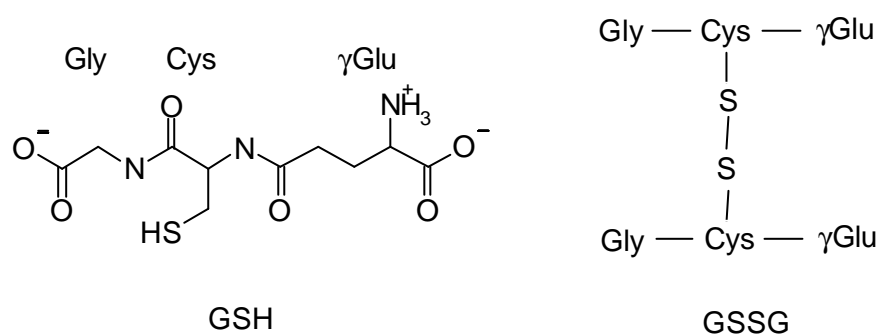


Abbildung 6: Struktur von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) nach [Halliwell et al., 1999]

Wichtig für die Funktion der GPx ist die Glutathion-Reduktase (GSR), die mit NADPH als Kofaktor das oxidierte Glutathion GSSG wieder zu GSH reduziert. Die Oxidation von GSH zu GSSG ist also reversibel und stellt so ein Puffersystem für den Redoxzustand der Zelle dar. Eine wichtige Rolle spielt GSH auch bei der Ent-

giftung elektrophiler Fremdstoffe. Neben der Bildung wasserlöslicher Metabolite werden elektrophile Substanzen gebunden, die sonst mit zellulären Makromolekülen reagieren und dadurch schädigen könnten. Die meisten Elektrophile reagieren bereits nicht-enzymatisch mit GSH, die Reaktion wird jedoch häufig durch Glutathion-S-Transferasen beschleunigt. [Eisenbrand & Metzler, 2002]

3.2.2.2 Antioxidativ wirksame Substanzen

3.2.2.2.1 Proteine

Neben dem Tripeptid GSH, das direkt antioxidativ wirksam ist, gibt es Proteine, die die Aktivität von Prooxidantien (z.B. Eisen-, Kupferionen) minimieren oder über andere Mechanismen vor oxidativem Schaden schützen:

Das Glykoprotein Transferrin bindet freie Eisenionen im Blutplasma (Konzentration: 1,2-3,7 g/L), die dann nicht mehr redoxaktiv sind. Sie werden zu dem Speicherprotein Ferritin transportiert, das mit seinem Umbauprodukt Hämosiderin etwa 20% des gesamten Eisenpools ausmacht [Eisenbrand & Schreier, 1995; Roob et al., 2000].

Kupferionen binden an das Plasmaprotein Albumin und an das spezifische Transport- und Speicherprotein Ceruloplasmin und werden so inaktiviert [Halliwell et al., 1999].

Einige Hitzeschockproteine wie die Chaperone schützen neu gebildete Proteine vor ihrer Umgebung, sodass sie sich richtig falten können. Auch die DNA im Zellkern wird durch Proteine (z.B. Histone) geschützt [Berg et al., 2002].

3.2.2.2.2 niedermolekulare Substanzen

Das Potenzial dieser Moleküle ROS abzufangen, beruht i. A. auf der Eigenschaft, resonanzstabilisierte Radikale bilden zu können, die wenig reaktiv und so nicht zu Wasserstoffabstraktionen oder Elektronentransfers fähig sind. Diese Stoffe werden z.T. endogen, also vom Körper selbst, gebildet, oder werden über die Nahrung aufgenommen:

Bilirubin ist das Endprodukt des Hämabbaus und hat eine intensiv gelbe Farbe. Es liegt im Plasma hauptsächlich albumingebunden in Gesamtkonzentrationen von 3-

21 $\mu\text{mol/l}$ vor. In vitro wurde gezeigt, dass Bilirubin Peroxyl-Radikale und $^1\text{O}_2$ abfangen kann. So kann es sowohl Albumin als auch albumingebundene Fettsäuren schützen. Die Bedeutung in vivo ist allerdings noch unklar. [Berg et al., 2002; Halliwell et al., 1999]

Aus Hypoxanthin werden durch die Xanthin-Oxidase Harnsäure (Abbildung 7) und Xanthin (Purinabbau) gebildet. In vielen Spezies, nicht aber im Mensch und anderen Primaten, wird sie über Allantoin zu Harnstoff und Glyoxylat abgebaut. Im Menschen liegt Harnsäure normalerweise in Plasmakonzentrationen von 120-360 μM vor. Sie bildet nach Abfangen von Radikalen oder Oxidation durch ROS ein resonanzstabilisiertes Uratradikalanion, das nicht mehr zu einer Wasserstoffabstraktion fähig ist. Durch Zwei-Elektronen-Übertragung kann Harnsäure auch weiter oxidiert werden. [Becker, 1993; Berg et al., 2002].

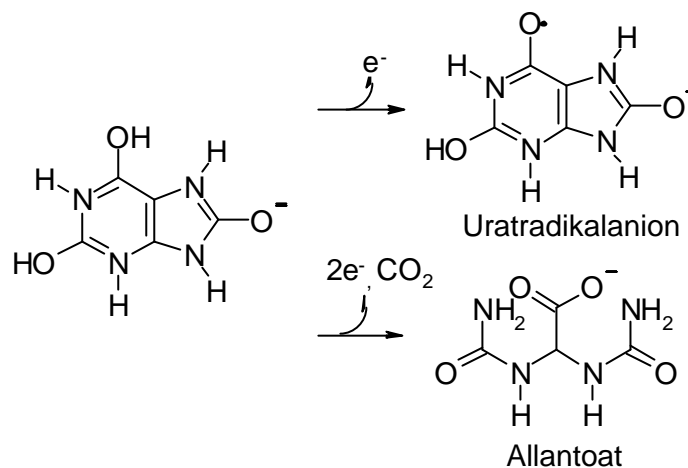


Abbildung 7: Harnsäure und Radikalabbauprodukte nach [Becker, 1993]

Die wasserlösliche Ascorbinsäure (Vitamin C) wird über die Nahrung hauptsächlich aus Obst und Gemüse aufgenommen und fängt ROS ab, ist aber auch Kofaktor zahlreicher Enzyme (z.B. Prolin- und Lysin-Hydroxylase). Bei der Einelektronenoxidation entsteht wie bei Harnsäure ein resonanzstabilisiertes Radikalanion (Semidehydroascorbinsäure), bei Zweielektronenübertragung Dehydroascorbinsäure (Abbildung 8). Das bei physiologischem pH als Anion vorliegende Ascorbat wird z.B. durch die NADPH-Semidehydroascorbat-Reduktase oder die Dehydroascorbat-Reduktase regeneriert. Dehydroascorbinsäure kann zu Oxalat abgebaut und über die Nieren ausgeschieden werden. Der Serumgehalt im Blut beträgt je nach Aufnahme ca. 8 mg/l . In vitro konnte Ascorbinsäure Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren und zeigte so auch prooxidative Eigenschaften. [Belitz et al., 2001; Eisenbrand & Schreier, 1995; Halliwell et al., 1999]

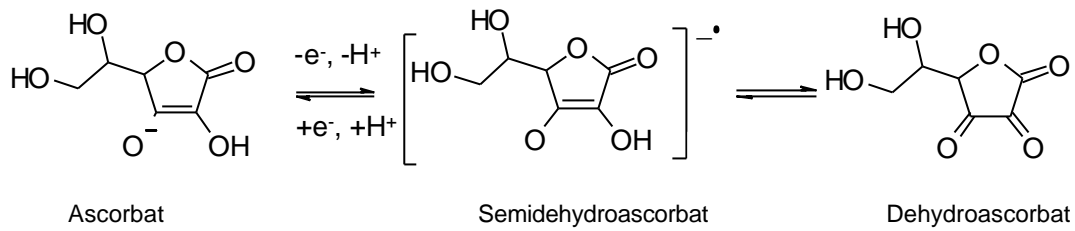


Abbildung 8: Struktur von Ascorbat und seinen Oxidationsprodukten nach [Halliwell et al., 1999]

Das fettlösliche Vitamin E (Sammelbezeichnung für α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Tocopherole und Tocotrienole) wird vor allem über Fette und Öle aufgenommen. Es besteht aus einem substituierten Chromanring und einer lipophilen Phytolseitenkette. Es wirkt wie die Antioxidantien Ascorbinsäure und Harnsäure als Radikalfänger und schützt als lipophiles Molekül vor allem Membranlipide vor der Oxidation (Abbildung 9). Vitamin E unterbricht die Lipidperoxidation, „quencht“ $^1\text{O}_2$ (Übertragung der Anregungsenergie von $^1\text{O}_2$ auf Vitamin E) und fängt es durch Addition ab. Tocopheryl-Radikale werden mit einem Ascorbat-abhängigen Redoxsystem regeneriert. Der Plasmaspiegel liegt etwa bei 10 mg/l. Vitamin E besitzt wie Vitamin C durch Reduktion von Metallionen auch prooxidative Eigenschaften [Eisenbrand & Schreier, 1995; Halliwell et al., 1999; Kelly et al., 1998]

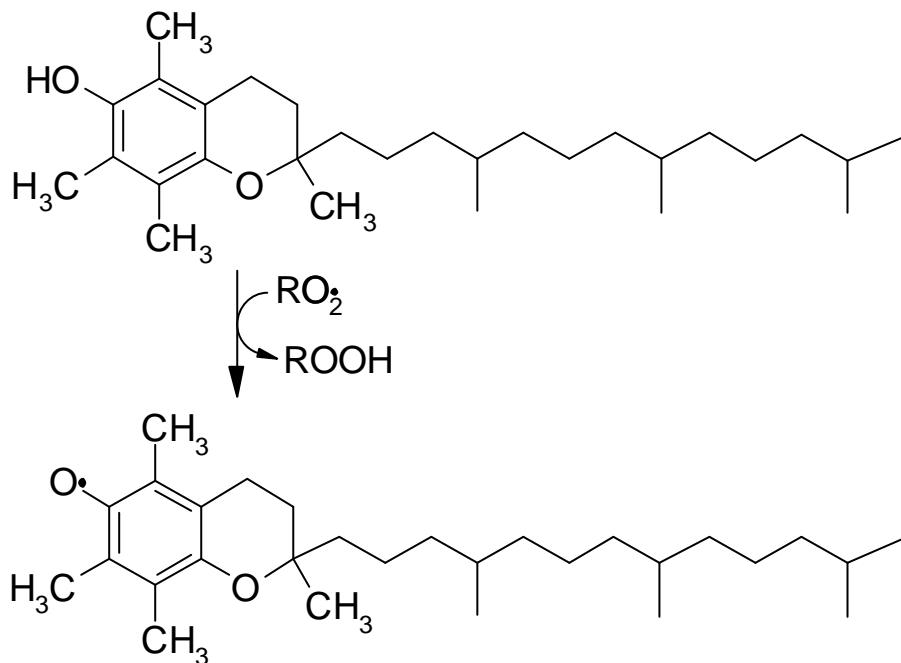


Abbildung 9: Reaktion eines Peroxyl-Radikals mit α -Tocopherol und das entstehende Tocopheryl-Radikal nach [Belitz et al., 2001]

Das in dieser Arbeit zur Modulation der Zytotoxizität eingesetzte Antioxidans Trolox stellt ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat dar, dem die Phytolseitenkette fehlt (Abbildung 10).

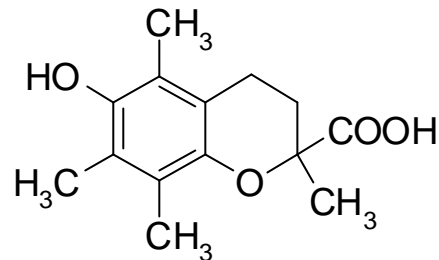


Abbildung 10: Struktur des wasserlöslichen Antioxidans Trolox.

Viele pflanzliche, farbgebende Phenole gelten als Antioxidantien, da sie nach Wasserstoffabstraktion resonanzstabilisierte Radikale bilden und mit Metallionen Chelat-Komplexe eingehen [Hollmann et al., 1999]. Beispiele für Stoffgruppen und deren Vorkommen sind Tabelle 17 und Abbildung 11 zu entnehmen.

Tabelle 17: Einige Quellen pflanzlicher Phenole nach [Halliwell et al., 1999; Hollmann et al., 1999]

Pflanzliche Phenole	Hauptvorkommen
Flavone	Petersilie, Stangensellerie, Thymian
Flavonole	Zwiebeln, Beeren, Brokkoli, Apfel, Kirschen, Tee, Rotwein
Flavanone	Zitrusfrüchte
Flavanole	grüner, schwarzer Tee, Rotwein
Catechine	Apfel, Tee
Anthocyanidine	rote Trauben, Rotwein, Kirschen, Himbeeren, Erdbeeren
Isoflavone	Sojabohnen, Leguminosen

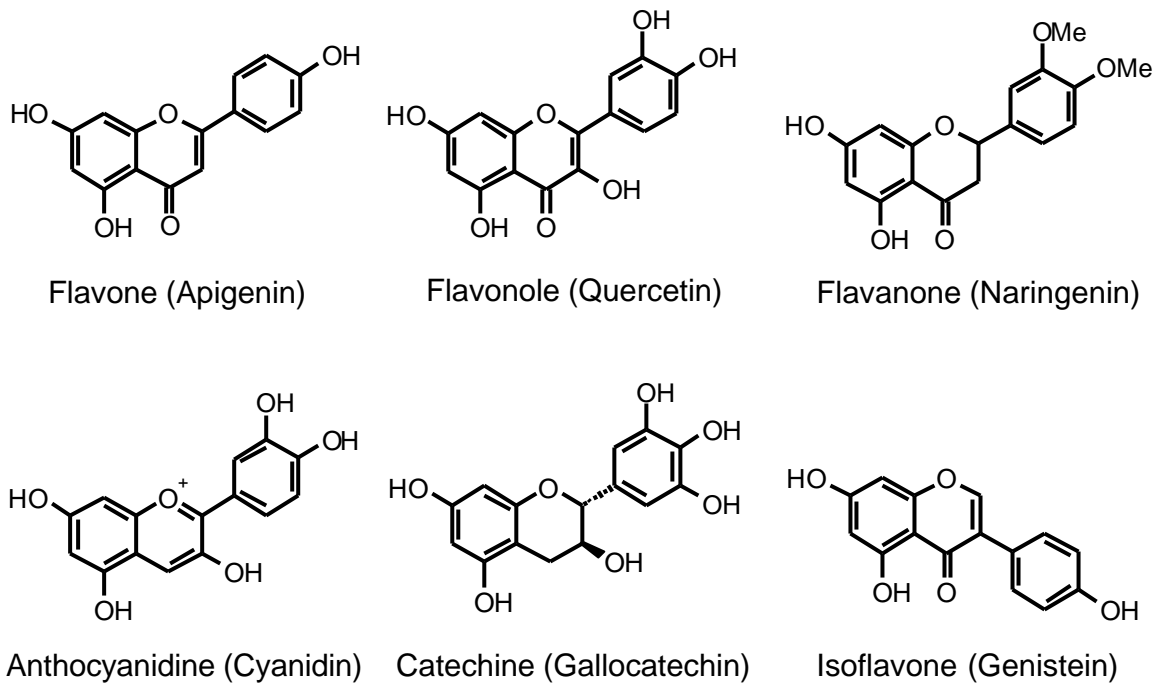


Abbildung 11: Strukturen einiger pflanzlicher Phenole nach [Belitz et al., 2001; Eisenbrand & Schreier, 1995]

Um die antioxidativen Fähigkeiten solcher Substanzen vergleichen zu können, bestimmt man summarische Parameter, wie den TEAC- (Trolox-equivalent antioxidant capacity), ORAC- (oxygen radical absorbance capacity) oder FRAP-Wert (ferrous reducing ability of plasma). Mit diesen Tests kann man zudem die antioxidative Kapazität in biologischen Systemen messen, z.B. in Körperflüssigkeiten und anderen Lösungen [Rice-Evans, 2000].

3.2.3 Lipidperoxidation und Proteinoxidation

Lipide als Bestandteil von zellulären Membranen spielen eine entscheidende Rolle für alle lebenden Organismen. Diese wichtige Rolle in biologischen Systemen wird durch die Bedeutung einer Schädigung durch Lipidperoxidation (LPO) unterstrichen.

Die LPO-Kettenreaktion wird in drei Phasen eingeteilt: Initiation, Propagation, Termination (Abbildung 12). Die Kettenreaktion wird gestartet durch reaktive Spezies, die ein Wasserstoffatom aus einer Methylengruppe abstrahieren (Initiation). OH^\bullet -Radikale starten Kettenreaktionen mit allen Fettsäuren, wohingegen O_2^\bullet nur mit einigen, besonders aktivierten, Fettsäuren reagiert. Daraus entstehen Alkyl- und Peroxyl-Radikale, die dann mit weiteren Fettsäuren reagieren. Die Radikalkettenreaktion verzweigt durch (katalysierten) Zerfall von Peroxiden in zwei Radikale

(Propagation). Ein Kettenabbruch kommt durch Reaktion der Radikale mit Molekülen zu stabilen Produkten zustande (Termination). Idealsubstrate für die LPO sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit bis-allylischen Methylen-Gruppen. An diesen Stellen besitzen die Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen niedrige Dissoziationsenergien, so dass Wasserstoffabstraktionen durch Radikalreaktionen leicht möglich sind. [Belitz et al., 2001; Halliwell et al., 1999; Kelly et al., 1998]

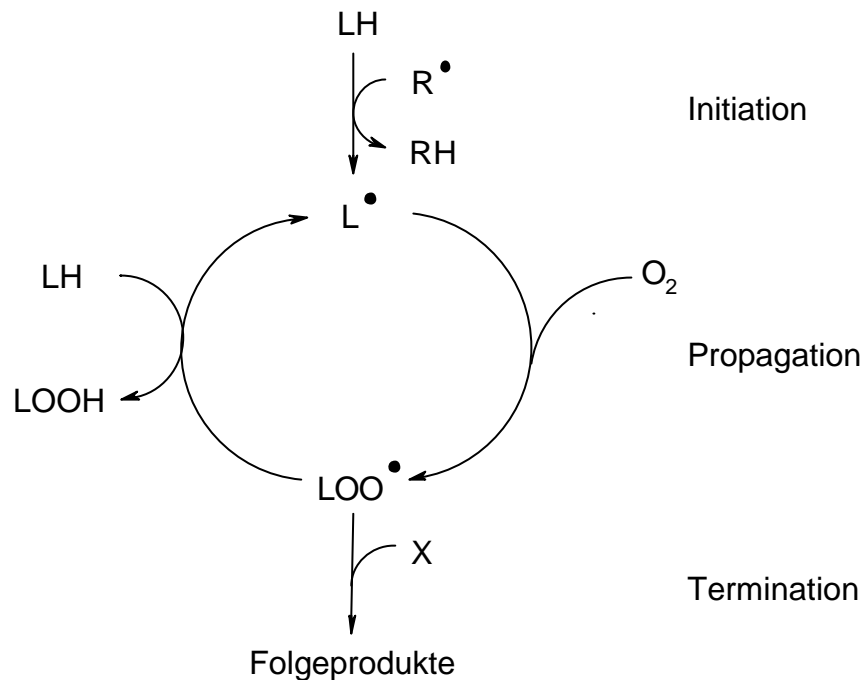


Abbildung 12: Überblick über die Lipidperoxidation nach [Kelly et al., 1998]; LH: Fettsäure; R^\bullet : reaktive Spezies; X: Molekül, mit dem LOO^\bullet abreagiert

Durch die Lipidperoxidation und die damit verbundene Fragmentierung entstehen verschiedene Moleküle wie sowohl gesättigte als auch ungesättigte Alkane, Aldehyde, Ketone, Furane. Als Beispiel für ein LPO-Produkt zeigt Abbildung 13 die Entstehung von Malondialdehyd (MDA). Neben Eigenschaften als Aromakomponenten besitzen diese reaktiven Moleküle auch zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkungen [Belitz et al., 1992; Marnett, 1999].

Als Beispiel für ein LPO-Produkt soll die Entstehung von Malondialdehyd (MDA) erläutert werden:

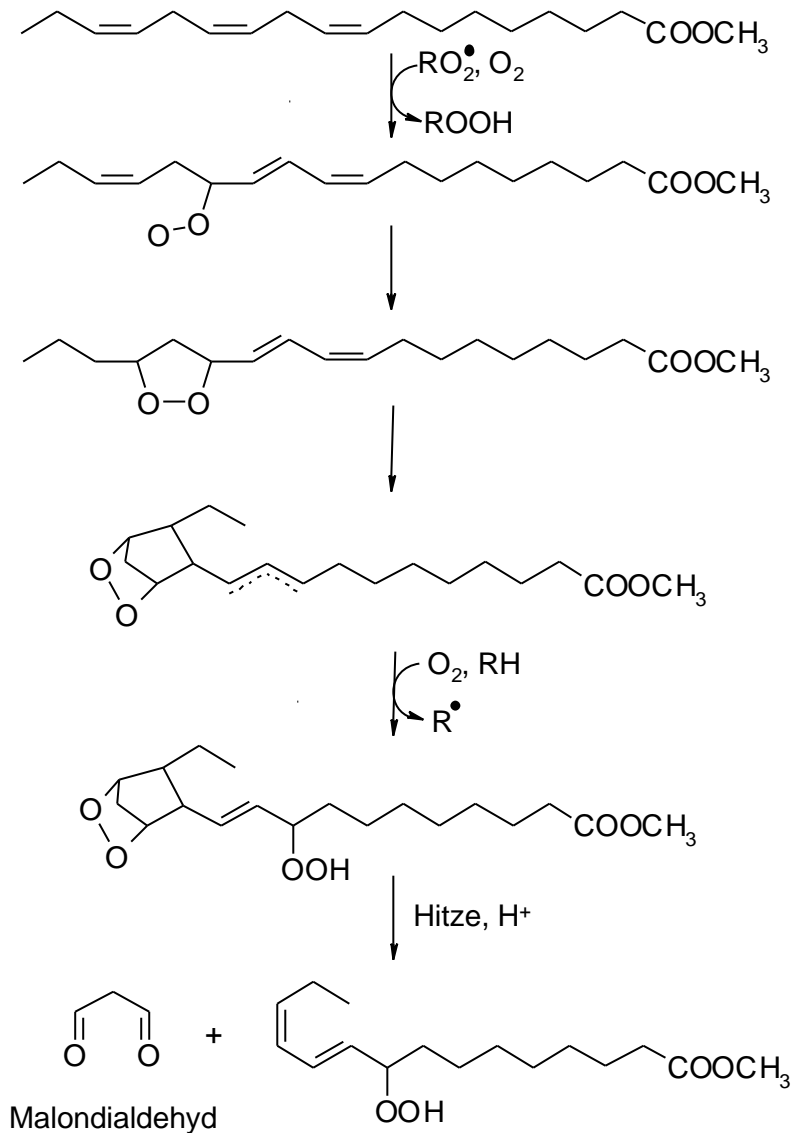


Abbildung 13: Entstehung von Malondialdehyd (MDA) aus α -Linolensäure nach [Belitz et al., 2001]

MDA entsteht aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Reaktion mit einem Peroxyl-Radikal, O_2 , nachfolgender Zyklisierung und Fragmentierung (Abbildung 13). Dies geschieht zum einen durch oxidativen Stress in Lipidmembranen, aber auch bei der enzymkatalysierten Umsetzung von Eicosanoiden. Des Weiteren wird MDA bei Entzündungen durch die Myeloperoxidase (in aktivierten Makrophagen) gebildet. MDA besitzt durch das Keto-Enol-Gleichgewicht Eigenschaften zweier Aldehyd-Gruppen, bzw. einer α,β -ungesättigten Carbonylstruktur. Es ist deshalb hochreaktiv und bindet an viele Zellbestandteile (DNA und Proteine). MDA und andere Aldehyde werden häufig als Marker für LPO herangezogen, indem sie nach

Reaktion mit Thiobarbitursäure als thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) photometrisch bestimmt werden. Ein spezifischer Nachweis von MDA gelingt durch chromatographische Trennung der TBARS per HPLC. [Esterbauer et al., 1991; Janero, 1990; Marnett, 1999]

Durch LPO entstehen noch andere Moleküle, die sich ebenfalls gut als LPO-Marker eignen. Dazu zählen die Isoprostane, die strukturell dem Prostaglandin $\text{PGF}_{2\alpha}$ ähneln und während der Peroxidation der Arachidonsäure gebildet werden (Abbildung 14). Die Bestimmung der F_2 -Isoprostane mit immunchemischen Methoden oder gaschromatographisch nach Derivatisierung ist wesentlich aufwendiger ist, als die HPLC-Bestimmung von MDA. [Halliwell et al., 1999]

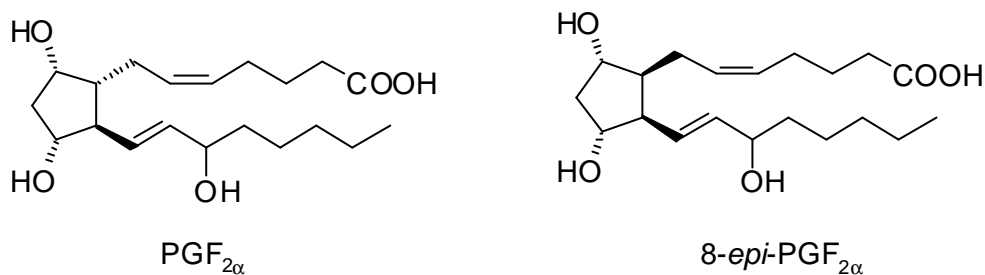


Abbildung 14: Prostaglandin $\text{PGF}_{2\alpha}$ und das stereochemisch verwandte Isoprostan $8\text{-epi-PGF}_{2\alpha}$ nach [Halliwell et al., 1999]

Proteine können ebenfalls durch Reaktion mit ROS oder LPO-Folgeprodukten geschädigt werden: Enzyme verlieren ihre Aktivität, wenn sie in der Nähe des katalytischen Zentrums verändert werden, Veränderungen von Rezeptoren und Transportproteinen beeinflussen den gesamten Zellstoffwechsel [Halliwell et al., 1999].

3.2.4 DNA-Schädigung und Reparatur

Ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Krebsentstehung wird intensiv diskutiert hin. Der Fokus liegt nicht nur bei einer direkten Schädigung der DNA, sondern auch bei einer Beeinflussung der Zellproliferation, Signaltransduktion, Zelltod und der interzellulären Kommunikation (Verweis OTA-Toxizität) [Halliwell et al., 1999; Klaunig et al., 1998; Loft et al., 1996].

3.2.4.1 DNA-Schädigung durch ROS

In diesem Kapitel wird zunächst auf die direkt durch ROS ausgelösten DNA-Schäden eingegangen. Von den ROS ist OH^\bullet für die meisten Schäden verantwortlich, wohingegen Peroxyl-Radikale und H_2O_2 nicht direkt mit der DNA reagieren. Der Angriff von OH^\bullet an den Basen führt zu drei Schädigungsarten: Hydroxylierungen, Ringöffnungen und Fragmentierungen. Daraus entstehen dann eine Vielzahl von Sekundärprodukten (Abbildung 15). Außerdem kann auch direkt das Zucker-Phosphat-Rückgrat geschädigt werden, was zu DNA-Strangbrüchen führt. [Kelly et al., 1998]

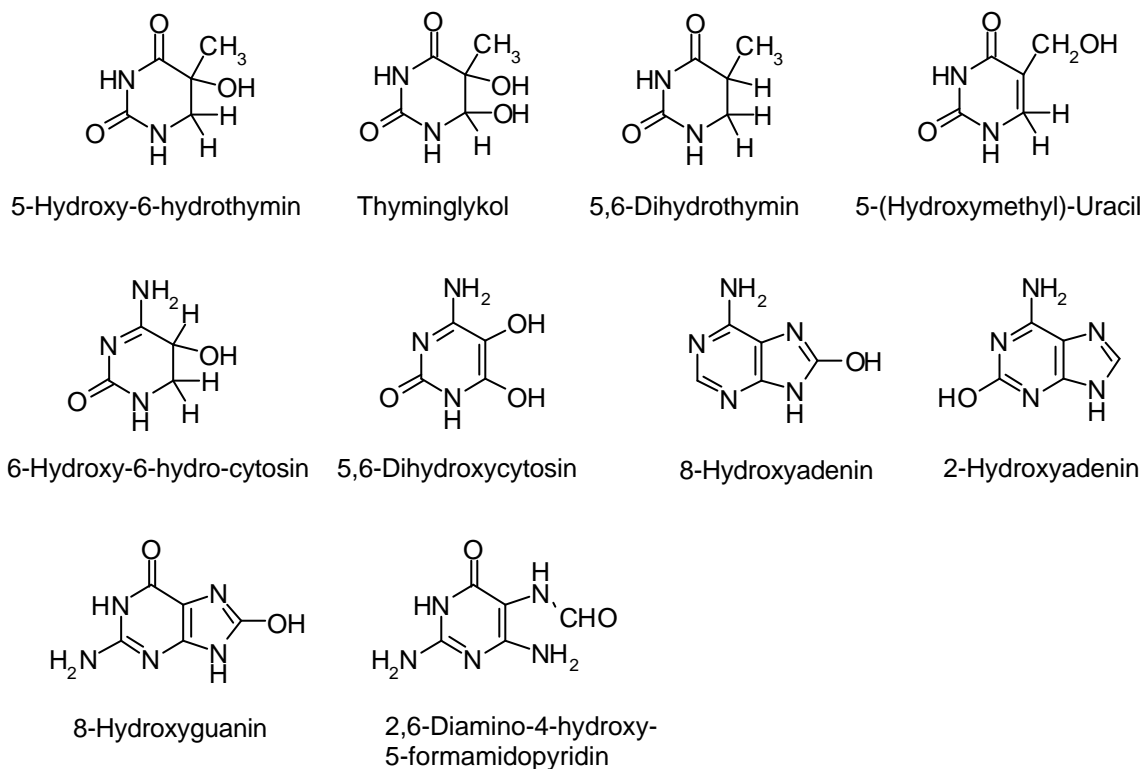


Abbildung 15: Beispiele für oxidierte Pyrimidine und Purine nach [Laval, 1996]

Das Hydroxylradikal vermag vielfältig mit DNA-Basen zu reagieren. So oxidiert es z.B. Guanin in Position 4, 5 oder 8 des Purinrings (8-Oxo-desoxyguanin oder 8-Hydroxy-desoxyguanin, 8-OH-dG). Die Weiterreaktion führt dann zu ringgeöffneten Produkten wie 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPy). (Abbildung 16). Ein Angriff an Pyrimidinen führt, neben den Oxidationsprodukten, auch zu Basendimeren. Nachfolgend kann es zur Abspaltung von den oxidierten Basen und so zu abasischen (apurine/apyrimidine, AP-) Stellen in der DNA kommen. Im Falle der DNA-Replikation kann dies zu Fehlpaarungen und bei der nächsten DNA-Vervielfältigung zu Mutationen führen. So werden zum Beispiel durch 8-OH-dG

Transversionsmutationen ausgelöst. [Halliwell et al., 1999; Jaruga et al., 1996; Kelly et al., 1998]

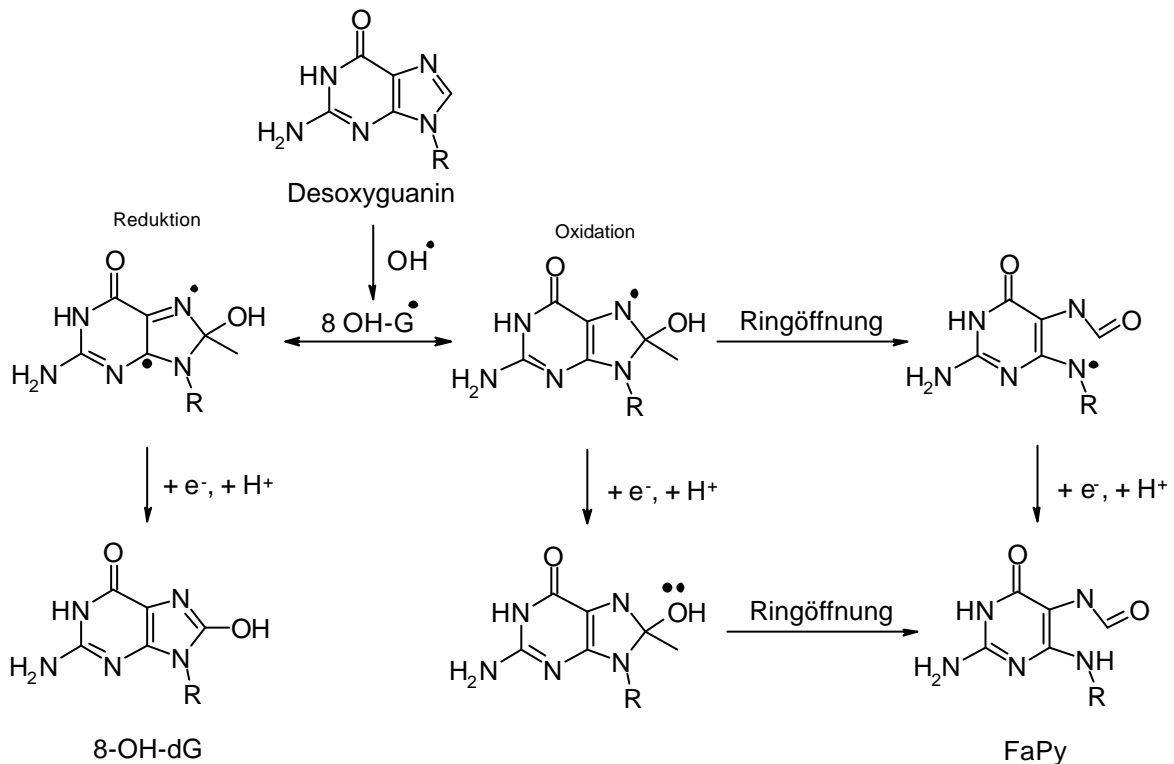


Abbildung 16: Modifikationen von Desoxyguanin durch OH[•]-Radikale nach [Halliwell et al., 1999]

Eine Zelle reagiert auf solche Schädigungen mit der Initiation einer Reparaturkaskade. Bei der Basenexzisions-Reparatur („Base Excision Repair“, BER) wird die fehlgepaarte oder abasische Stelle erkannt, die betroffene Base durch eine DNA-Glykosylase ausgeschnitten und durch eine Endonuklease ein Einzelstrangbruch eingeführt. Anschließend wird durch eine Polymerase die Desoxyribose aus dem Rückgrat entfernt, das neue, korrekte Nukleotid eingeführt und der Strangbruch durch eine Ligase wieder verschlossen. Die Nukleotidexzisions-Reparatur („Nucleotid Excision Repair“, NER) funktioniert nach dem gleichen Prinzip, ist aber aufwendiger, da das herausgeschnittene DNA-Stück etwa 30 Basen lang ist. Eukaryontische Zellen sind nicht zur Basenexzisions-Reparatur befähigt. [Hoeijmakers, 2001]

Auch die während der LPO entstehenden Produkte reagieren mit der DNA, wie z.B. MDA, der auch bei Entzündungsprozessen und während des Arachidonsäurestoffwechsels entsteht. Er reagiert mit den Basen dC, dA und dG u. a. zu M₁dC, M₁dA und M₁dG (Abbildung 17) [Benamira et al., 1995].

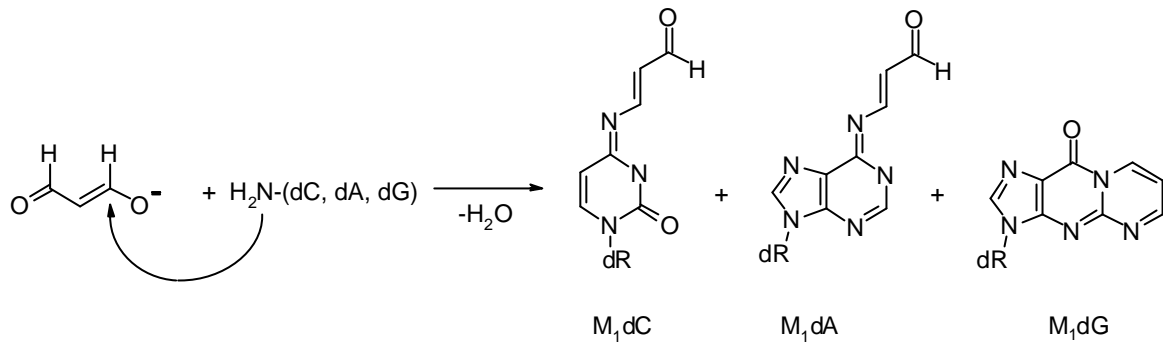


Abbildung 17: Strukturen von MDA-DNA-Addukten nach [Benamira et al., 1995]

Ein anderer, LPO-unabhängiger Weg zu MDA-Addukten führt über einen Radikalangriff am DNA-Zuckerrückgrates in C-4'-Position. Aus dem entstehenden „Basenpropenal“ kann MDA z.B. auf dG übertragen werden (Abbildung 18).

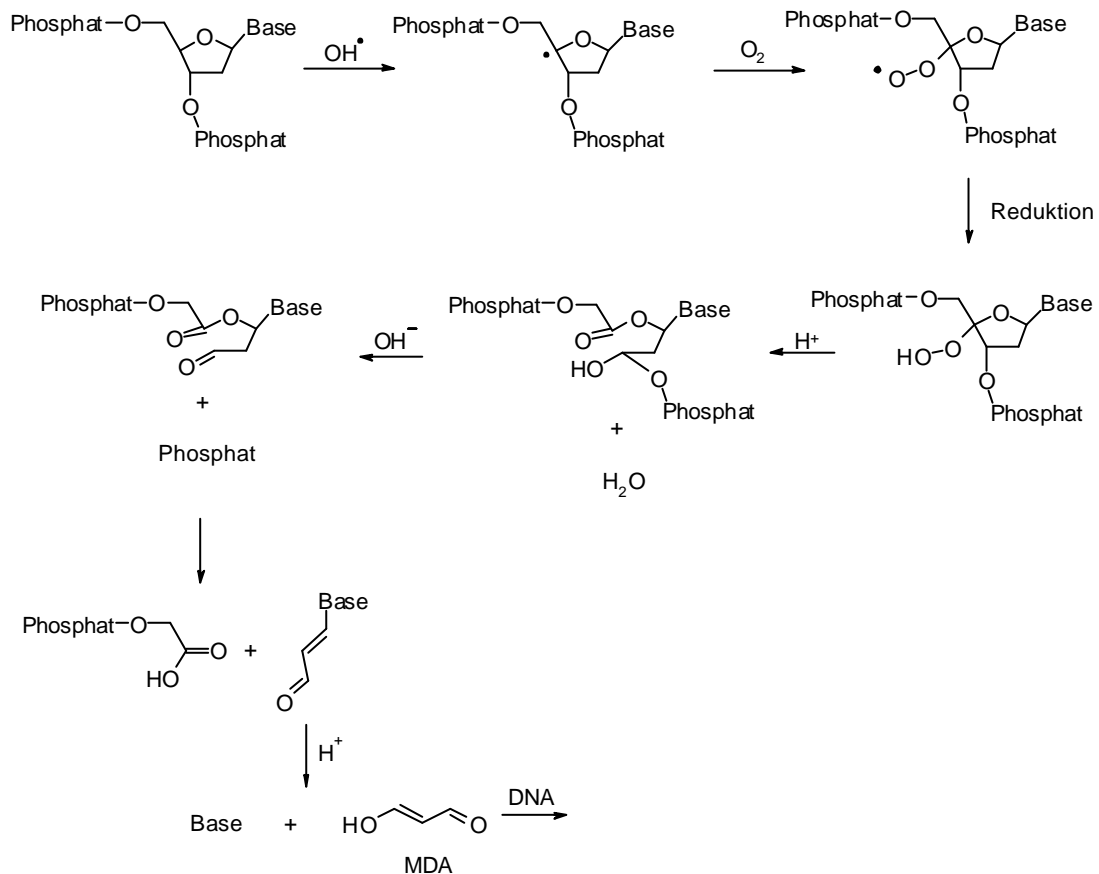


Abbildung 18: MDA-Bildung durch Reaktion von OH^\bullet mit DNA [Janero, 1990; Dedon et al., 1998]

M_1dG ist als prämutagene Läsion anzusehen und wurde zahlreichen Geweben wie z.B. Leber, Pankreas, Brust und in weißen Blutzellen über LC/MS, ^{32}P -Postlabelling und immunchemisch nachgewiesen [Benamira et al., 1995; Dedon et al., 1998; Fang et al., 1996; Leuratti et al., 1998; Marnett, 1999; Singh et al., 2001; Vaca et al., 1992].

3.3 Apoptose und Nekrose

In allen Organismen spielt die Regulation des Gleichgewichtes von Zellteilung und Zelltod eine wichtige Rolle. Der Zelltod ist in zwei Formen differenzierbar: Apoptose, der sogenannte programmierte Zelltod [Kerr et al., 1972] und Nekrose, ein passiver degenerativer Prozess [Dive et al., 1991]. Bei der Embryogenese spielt der programmierte Zelltod z.B. bei der korrekten Ausbildung von Gliedmaßen und Organen wie Leber und Niere eine wichtige Rolle. Beim erwachsenen Menschen erneuern die Zotten der Darmwand alle drei bis fünf Tage ihre Zellen von der Basis her, während solche, die bis zur Spitze nachgewandert sind, absterben. Die Reifung der T-Lymphozyten im Thymus ist begleitet vom apoptotischen Absterben jener Zellen, die einen Funktionsdefekt aufweisen [Duke et al., 1997]. Mit einer Störung der Apoptose werden viele Krankheiten in Verbindung gebracht. So werden bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, der Alzheimer- und Parkinsonerkrankung gesunde Zellen (Neuronen) apoptotisch eliminiert, bei AIDS-Patienten sterben die T-Helferzellen in überhöhtem Maße ab [Guerrero et al., 1998]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Hemmung der Apoptose ein wesentlicher Vorgang im Rahmen der Karzinogenese ist. Der Zellproliferation der Tumorzellen steht eine zu niedrige Apoptoserate gegenüber, was eine selektive Vermehrung der malignen Zellen zur Folge hat [Jäckel, 1998; Darzynkiewicz, 1997].

3.3.1 Morphologische und Biochemische Veränderungen

Nekrose ist ein passiver, degenerativer Prozess, der charakterisiert ist durch das Anschwellen der Zellen und der Mitochondrien, dem Verlust der Plasmamembranintegrität gefolgt von der Freisetzung des Zellinhaltes (Abbildung 19). Die phagocytotische Beseitigung der Zelltrümmer ist begleitet von einer Entzündungsreaktion, verursacht durch die Freisetzung von Zellbestandteilen [Majno et al., 1995]. Der apoptotische Zelltod beginnt mit der Größenabnahme der Zelle gefolgt von Schrumpfung des Zellkerns und Chromatinkondensation. Die Organellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt, das Transmembranpotential bleibt erhalten. Die Bildung von Bläschen („membrane blebbing“) endet im Abschnüren von membranumschlossenen Vesikeln („apoptotic bodies“). Diese apoptotischen Körperchen werden durch Phagozytose beseitigt, es kommt dabei nicht zu einer Entzündungsreaktion [Guerrero et al., 1998].

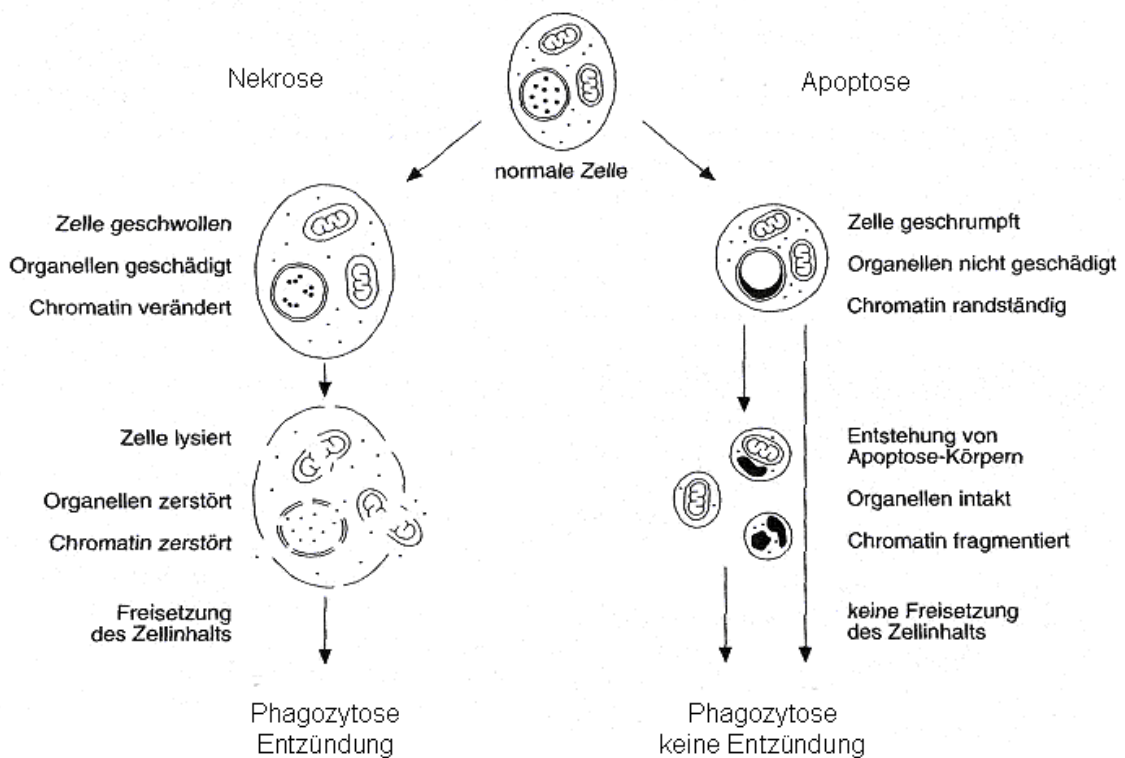


Abbildung 19: Morphologische Veränderungen während Apoptose und Nekrose [Darzynkiewicz, 1997]

Biochemisch kommt es bereits im frühen Stadium der Apoptose zu charakteristischen Veränderungen. Phosphatidylserin, ein Glycerolphosphatid der intrazellulären Seite der Plasmamembran, wird auf die extrazelluläre Seite verlagert. Die zytosolische Calcium-Konzentration steigt an und führt zu Veränderungen bestimmter Enzymaktivitäten. Es kommt zum Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien und zur Freisetzung von Cytochrom C. Im Zellkern erfolgt die Aktivierung calcium- und magnesiumabhängiger Endonukleasen, welche die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke schneiden. Diese Fragmente sind in der Gelelektrophorese als typische DNA-Leiter sichtbar [Whyllie et al., 1980]. Weitere Enzyme sind Transglutaminasen, die zytosolische Proteine vernetzen, und Proteasen wie z.B. Calpain, die das Zytoskelett und Membranproteine abbauen. Eine genetische Steuerung des programmierten Zelltods konnte in *C. elegans* durch Identifizierung der Gene *ced-3* und *ced-4* (cell death) nachgewiesen werden, ohne die Apoptose nicht stattfand [Yuan et al., 1990]. Diese entsprechen den Genen der B-cell-lymphoma-2- (*Bcl-2*-) Familie bei Säugern.

3.3.2 Auslösende Faktoren

Nekrose ist ein Prozess, der durch Abweichungen von physiologischen Bedingungen ausgelöst wird. Dies kann durch extrem toxische Stimuli wie z.B. Membran- oder Atmungsgifte wie Cyanide, durch Sauerstoffmangel oder durch massive Zellschädigung verursacht werden. Ein Beispiel für nekrotischen Zelltod ist der Sonnenbrand. Die Einwirkung starker UV-Strahlung kann zur Rötung der Haut, im Extremfall zum Absterben der Hautzellen und zur Bläschenbildung führen.

Die Induktion von Apoptose kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. In T-Lymphozyten wird Apoptose nach Bindung des Fas-Liganden (ein Protein der Plasmamembran) an den Fas-Rezeptor ausgelöst. Nach DNA-Schäden reagiert die Zelle mit einer Hochregulation des Tumorsuppressorgens p53, was eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase zur Folge hat. Die Zelle hat nun die Möglichkeit vor der Replikation den entstandenen Defekt zu reparieren. Gelingt dies nicht, erfolgt die Aktivierung der Apoptosekaskade. Der Entzug von Wachstumsfaktoren induziert in Zellen Stress. Auch hierbei wird durch p53 ein Zellzyklusarrest hervorgerufen. Ein wichtiges Ziel-Gen ist dabei WAF1/CIP1. Das Protein dieses Gens, p21, bindet an Cyclin-abhängige Kinasen und hemmt so die Zellproliferation [Choi-sy-Rossi et al., 1998]. Eine besondere Bedeutung für die Apoptoseinduktion besitzen die Gene der bcl-2-Familie, die zum Teil eine hemmende (Bcl-2, Bcl-x_L), zum Teil eine fördernde Wirkung (Bax, Bak) zeigen. Das meistuntersuchte Mitglied der bcl-2-Familie ist das Bcl-2, dessen Überexpression zu einer Blockade der Apoptose führt, wodurch für Tumorzellen ein selektiver Überlebensvorteil entsteht. [Guerrero et al., 1998]

3.3.3 Regulation der Apoptose

Es gibt zwei unterschiedliche Signalwege, die über die sog. Caspase-Kaskade Apoptose initiieren. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Im extrinsischen Signalweg werden Liganden wie Apo, Fas oder TNF an Zellmembranrezeptoren, auch Todesrezeptoren genannt, gebunden und aktivieren dann die Initiator-Caspase-8. Weiterhin gibt es den intrinsischen Signalweg, der zum Beispiel durch DNA-Schäden induziert wird. In diesem spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle. Das darin enthaltene Cytochrom C wird ins Zytoplasma freigesetzt und bildet zusammen mit Apaf-1, dem sog. „apoptotic protease activating factor“, der Initiator-Caspase-9 und ATP das Apoptosom (Abbildung 20). Eine

Hemmung dieses Signalweges kann aus der Überexpression des apoptosehemmenden Gens Bcl-2 oder aus der Mutation von p53 resultieren.

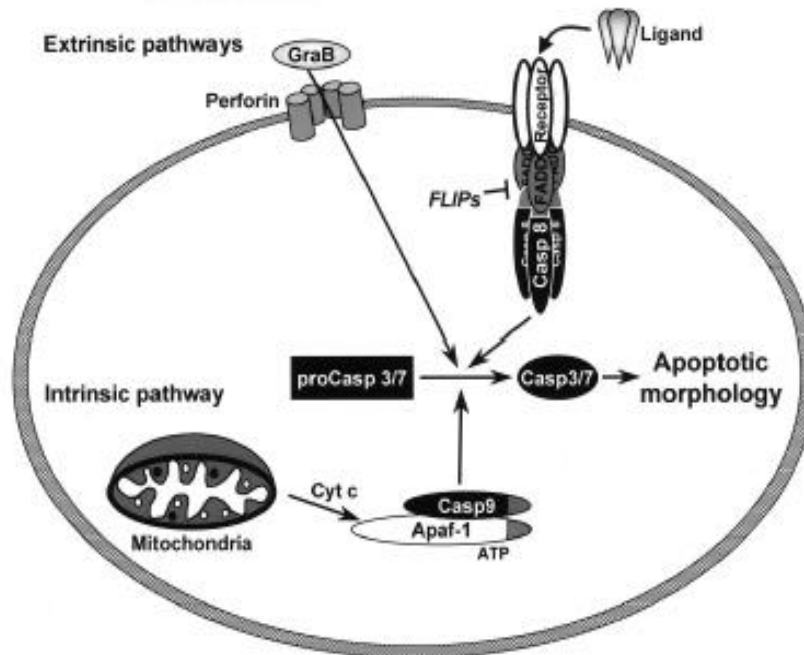


Abbildung 20: Extrinsischer und Intrinsischer Signalweg [Stennicke et al., 2000]

Beide Signalwege münden in die proteolytische Aktivierung der Caspasen-3 und -7, die dann Apoptose einleiten. Die Überexpression von IAPs („Inhibitors of apoptosis proteins“) kann hierbei ebenfalls zu einer Hemmung der Caspasen-3 und -7 und somit zur Blockade der gesamten Apoptosekaskade führen. [Roy, 2000; Stennicke et al., 2000]

3.4 Verwendete Methoden

3.4.1 Zytotoxizität

In der Zellkultur werden zur Detektion von Zytotoxizität häufig Wachstumshemmung und Membranintegrität bestimmt. Zur Messung der Membranintegrität werden die Zellen mit Farbstoffen inkubiert und die Anfärbung der Zellen als Parameter für Zytotoxizität gewählt, da die Farbstoffe die intakte Membran nicht passieren können. In dieser Arbeit wurde dazu der Trypanblauausschluss-Test verwendet. Da Trypanblau (Abbildung 21) bei längerer Einwirkung selbst zytotoxisch ist, wurde die Membranintegrität direkt nach der Mischung mit der Zellsuspension bestimmt. Dabei wurden in einer Neubauerzählkammer die Gesamtzellzahl und die Anzahl der gefärbten, nekrotischen Zellen bestimmt. Die Viabilität ergibt sich aus dem Verhältnis der intakten, viablen Zellen (Gesamtzellzahl minus nekrotische Zellen) zur Gesamtzellzahl und wird in % angegeben.

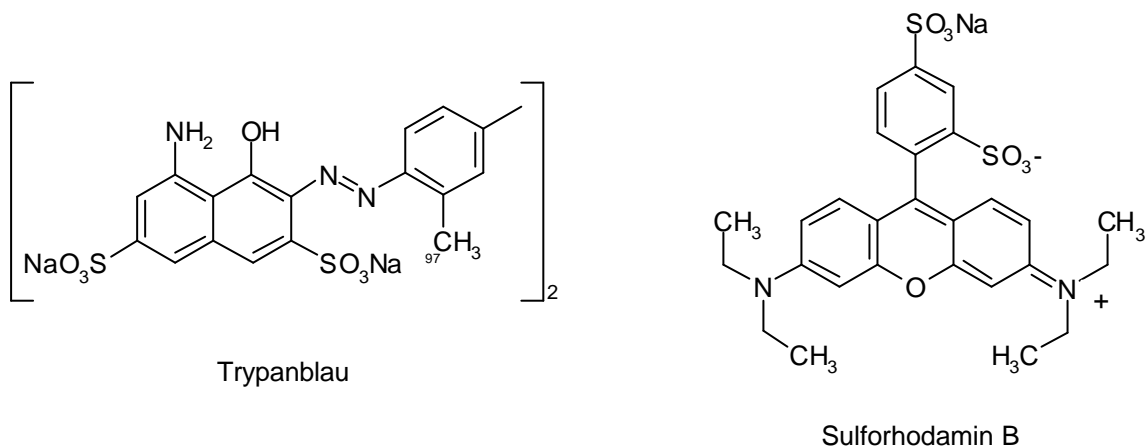


Abbildung 21: In dieser Arbeit verwendete Farbstoffe zur Bestimmung von Membranintegrität und Protein.

Zur Bestimmung der Wachstumshemmung wurde in dieser Arbeit die Entwicklung der Gesamtzellzahlen bzw. die Menge des (Zell-) Proteins in Abhängigkeit von der Substanzinkubation herangezogen. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mit der Neubauerzählkammer. Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch nach Fixierung der Zellen und Anfärbung mit Sulforhodamin B (Abbildung 21). Die verwendete Methode stellt eine Modifikation des klassischen SRB-Tests [Skehan et al., 1990] dar, bei der nach der Inkubationszeit von 24 h direkt die Proteinfärbung erfolgte. [Lindl et al., 2000]

3.4.1.1 Apoptose

3.4.1.1.1 Immunchemischer Test

Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen. Dabei entstehen Protein-DNA-Komplexe, die sogenannten Nukleosomen. Mittels eines immunchemischen Tests (Cell Death Detection ELISA[®] plus) wurde die Bildung von Nukleosomen aus dem Lysat apoptotischer Zellen bestimmt. Bei dem Test handelt es sich um einen sogenannten „sandwich ELISA“, bei dem die Nukleosomen zuerst mit einem Biotin-verknüpften Antikörper gegen das Histonprotein in den Näpfen einer Streptavidin-beschichteten 96-Lochplatte gebunden werden. Danach bindet ein anti-DNA-Antikörper an die Nukleosomen, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Durch die Oxidation von ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonat)) kann die Peroxidase-Aktivität photometrisch vermessen werden. Die Umsetzung von ABTS ist proportional zur Menge der gebundenen Nukleosomen, die Induktion von Apoptose wird durch eine Anreicherung der Nukleosomen gegenüber der Kontrolle quantifiziert [Roche, 2002]

3.4.1.1.2 Durchflusszytometrie

In den letzten Jahren findet die Durchflusszytometrie sowohl in der medizinischen als auch biologischen Forschung breite Anwendung. Sie wird eingesetzt zur quantitativen Bestimmung des zellulären DNA- und Protein-Gehalts von lebenden Zellen, der Messung von Größe, Volumen und Struktur von Zellen, Enzymkinetiken, Stadien der Proliferation, die insbesondere in der Tumordiagnostik und bei immunologischen Untersuchungen eine wichtige Rolle spielen [Lindl et al., 2000].

Das Messprinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung bei gleichzeitiger quantitativer Fluorochromierung (Abbildung 21). Das System besteht dabei aus zwei Kapillaren, die kurz vor der Messküvette (in der Regel Quarz) aufeinander treffen. Ein Flüssigkeitsstrom erfasst die Zellsuspension und die mit fluoreszierenden Farbstoffen angefärbten Zellen erfahren aufgrund der Verengung des Probenstroms eine Beschleunigung (hydrodynamische Fokussierung). Die Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren bei Durchgang durch die Messküvette Lichtenergie, die deren Elektronen auf ein höheres Niveau anhebt. Beim Rücksprung zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon (Fluoreszenz). Dabei geht jedoch immer ein Teil der Energie zum Beispiel in Form von Wärme verloren. Das Emissionsspektrum ist gegenüber dem Ab-

sorptionsspektrum deshalb zu niedrigen Wellenzahlen verschoben. Als Lichtquellen für die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe werden Laser oder Quecksilberdampflampen eingesetzt.

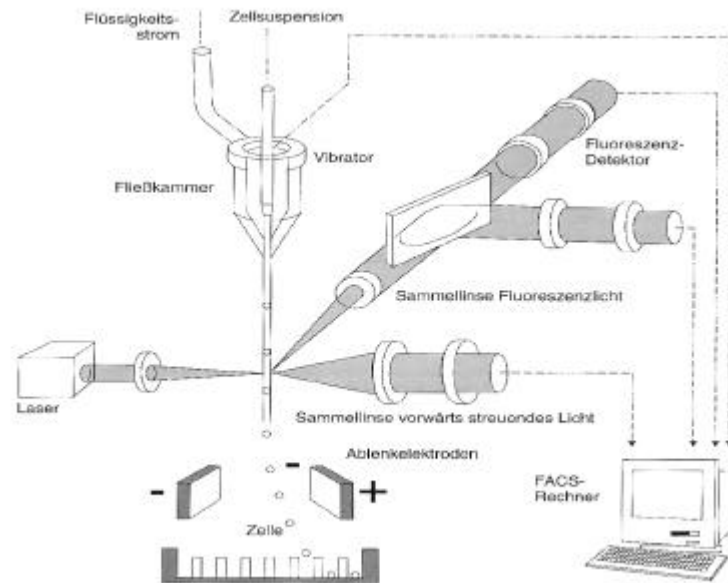


Abbildung 22: Aufbau eines Durchflusszytometers mit Zellsortierung [Lindl et al., 2000].

Ein großer Vorteil der Durchflusszytometrie ist die parallele Bestimmung mehrerer Zellbestandteile durch geeignete Wahl von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Fluoreszenzspektren bei identischer Anregungswellenlänge unterschiedlich sind. In dieser Arbeit wurden zwei Fluorochrome verwendet. Für die 2-Parameter-Durchflusszytometrie zur Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden Annexin V/FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und Propidiumiodid (3,8-Diamino-5-(3-diehtylaminopropyl)-6-phenyl-phenanthridiniumjodid-methiodid) [Tas et al., 1981] ausgewählt (Abbildung 23). Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches während des frühen Stadiums der Apoptose auf die Außenseite der Membran verlagert wird und dient als Nachweis apoptotischer Zellen [Koopman et al., 1994]. Propidiumiodid ist ein kationisch geladener Farbstoff, der in Zellen mit geschädigter Plasmamembran, (nekrotisch) die DNA anfärbt.

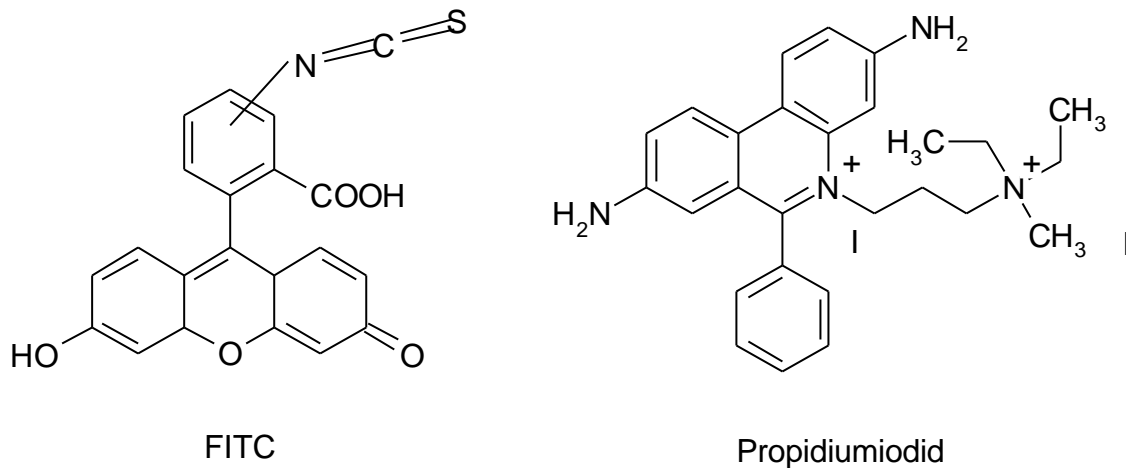


Abbildung 23: Für die Durchflusszytometrie verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

Zur Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen nutzt man die morphologischen und biochemischen Unterschiede der beiden Formen des Zelltods. Kreuzt eine Zelle den Laserstrahl eines Durchflusszytometers, streut sie das Laserlicht (Vorwärtstreulicht, Seitwärtstreulicht). Mit Hilfe des Seitwärtstreulichts können Aussagen über die Granularität und intrazelluläre Strukturen getroffen werden. Die Lichtstreuung verändert sich während des Zelltods und reflektiert morphologische Veränderungen der Zellen wie Anschwellen oder Schrumpfen, Verlust der Plasmamembranintegrität oder Chromatinkondensation. Nekrose ist begleitet von einem parallelen Anstieg und anschließenden schnellen Abfall des Vorwärts- und Seitwärtstreulichtes. Während der Apoptose ist die Abnahme des Vorwärtstreulichtes, die verursacht wird durch das Schrumpfen der Zellen, anfangs nicht begleitet von einer parallelen Abnahme des Seitwärtstreulichtes. Im Diagramm wird das gemessene Seitwärtstreulicht gegen das gemessene Vorwärtstreulicht aufgetragen. Die Kombination dieser Streulichtmessung mit einer Anfärbung von Zellkomponenten kann zum Nachweis nichtvitaler Zellen dienen. Zur Messung wird die calciumabhängige Bindung von Annexin-V/FITC an Phosphatidylserin und die Einlagerung von Propidiumiodid für die Zwei-Parameter-Messung genutzt. Die Messergebnisse werden in Zwei-Parameter-Dotplots dargestellt, wobei „Punktewolken“ entstehen. Anhand der Kontrolle, die überwiegend vitale Zellen enthalten sollte, werden vier Quadranten für die Auswertung definiert (Abbildung 24). [Darzynkiewicz et al., 1997]

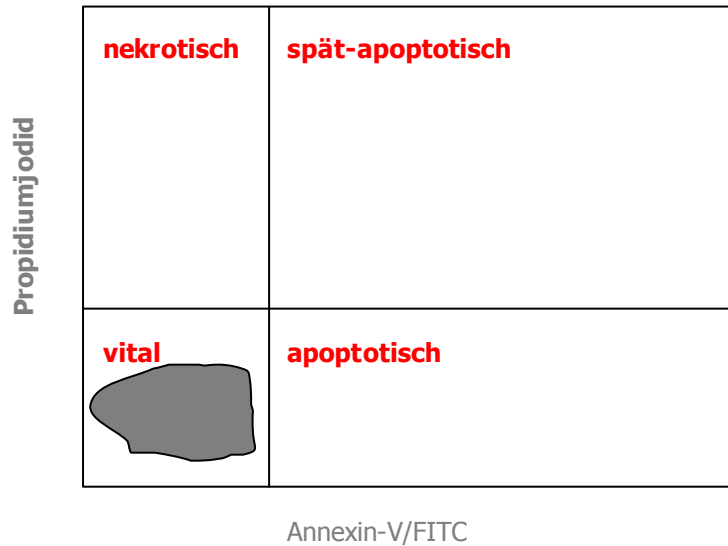


Abbildung 24: Einteilung der Quadranten am Beispiel einer Kontrolle (schematisch)

3.4.1.2 Proteinbestimmung BCA

Die Proteinbestimmungen mit Hilfe des BCA-Tests beruht auf der quantitativen Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen durch reduzierende Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin, Cystein oder Cystin, die in dem zu bestimmenden Protein enthalten sind. Nach Zugabe von BCA-Reagenz C zur proteinenthaltenden Probe entsteht ein intensiv violett gefärbter Cu^+ /BCA-Komplex, dessen Absorption proportional zum in der Probe enthaltenen Proteingehalt ist und photometrisch bei 562 nm bestimmt werden kann [Smith et al., 1985].

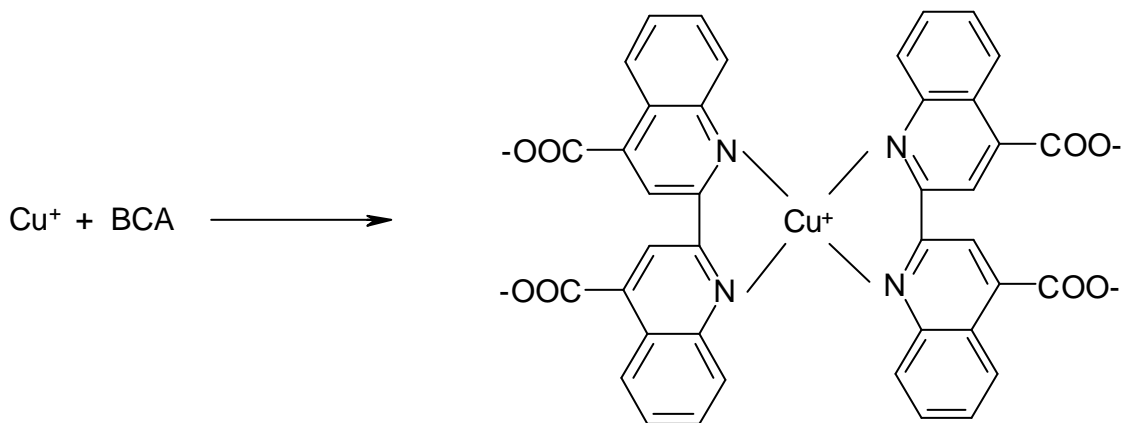
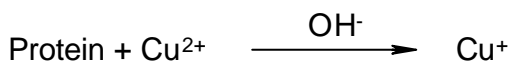


Abbildung 25: Bildung des violetten BCA-Cu-Komplexes

3.4.2 (Oxidative) DNA-Schädigung

In dieser Arbeit wurden DNA-Strangbrüche mittels alkalischer Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) detektiert. Der Comet-Assay ist zurückzuführen auf eine Beobachtung von Rydberg und Johanson [1978], dass die Zellkerne nach Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung mit zunehmender Dosis immer diffuser wurden. Ostling und Johanson [1984] entwickelten daraus eine Technik, bei der die DNA durch Elektrophorese in Abhängigkeit von der Strahlendosis unterschiedlich weit aus dem Zellkern herausstrat.

Zur Durchführung des Comet-Assay werden die zu untersuchenden Zellen in ein Agarosegel eingebettet und lysiert. Anschließend wird in einer Elektrophoresekammer unteralkalischen Bedingungen die DNA denaturiert (entwunden), eine Elektrophorese durchgeführt, die Objektträger neutralisiert und die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 26).

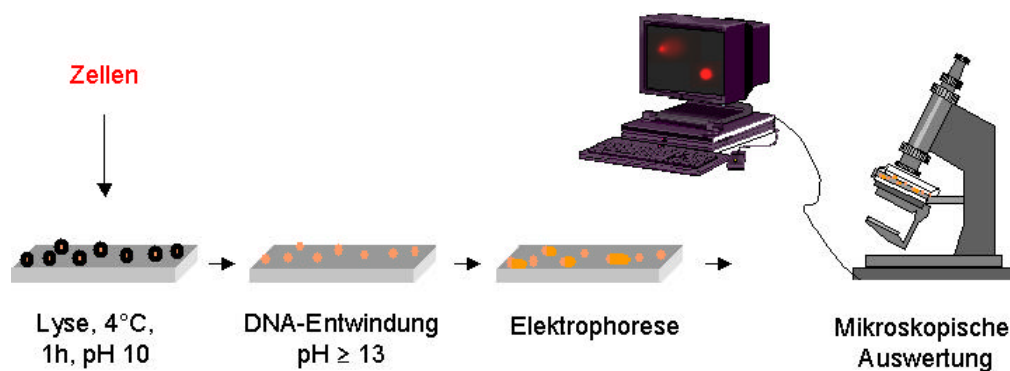


Abbildung 26: Durchführung des Comet-Assay (schematische Darstellung).

An einem Fluoreszenzmikroskop werden die Zellkerne mit Hilfe einer Digitalkamera und eines Computers ausgewertet. Die DNA ungeschädigter Zellkerne erscheint als runder Punkt, geschädigte DNA bildet charakteristische Figuren, die Kometen ähneln und dem Test seinen Namen gaben (Abbildung 27). Als Maß für die DNA-Strangbrüche wurde die Fluoreszenzintensität im Schweif (Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen-Schweif, „tail intensity“, TI%) angewandt.

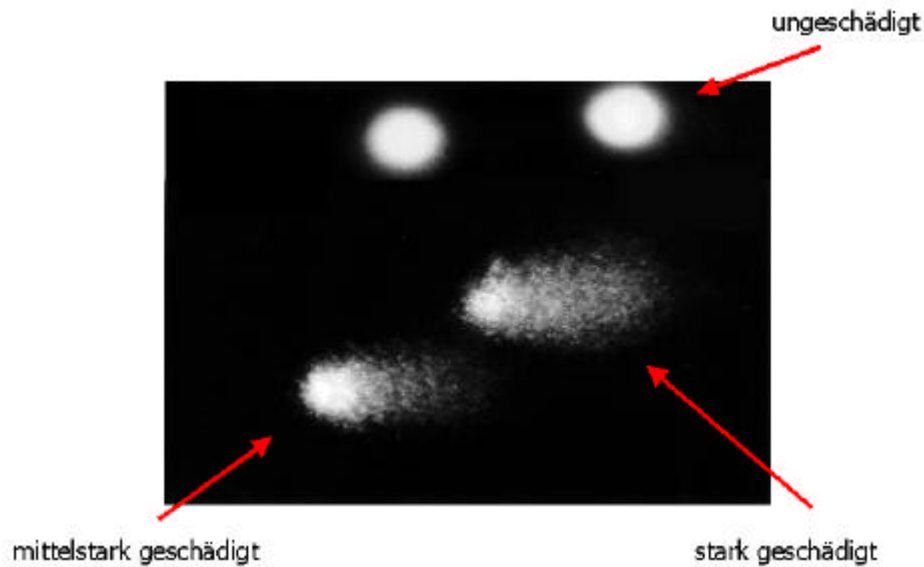


Abbildung 27: Ansicht von „Kometen“ unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Wird die DNA-Denaturierung unter neutralen Bedingungen durchgeführt, werden nur DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erfasst. Im alkalischen Milieu (DNA liegt in Einzelsträngen vor) werden neben DSB ab einem $\text{pH} \geq 12,1$ auch Einzelstrangbrüche (SSB) und ab einem $\text{pH} \geq 13$ alkali-labile Stellen detektiert [Fairbairn et al., 1995], so dass die Variation des pH-Wertes zusätzliche Informationen zur Art der DNA-Schäden liefert [Horváthová et al., 1998]. Der Comet Assay wird mittlerweile meist im alkalischen Milieu ($\text{pH} \geq 13$) durchgeführt [Fairbairn et al., 1995; Kassie et al., 2000; Singh et al., 1988].

Zur Untersuchung oxidativer DNA-Schäden wurden die Zellkerne in den Agarosegelen mit den Reparaturenzymen Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) oder Endonuklease III behandelt. Diese Enzyme erkennen oxidierte DNA-Basen (FPG z.B. relativ spezifisch 8-OH-dG), schneiden diese aus dem Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA (Glykosylase-Aktivität) und fügen an diesen Stellen zusätzliche SSB in die DNA ein (Lyse-Aktivität), was zu einer Verstärkung der Schweifintensität führt (Abbildung 28). Die Differenz aus Strangbrüchen nach Enzymbehandlung und direkten Strangbrüchen (ohne Enzymbehandlung) entspricht den spezifisch oxidativen DNA-Schäden. [Collins et al., 1996]

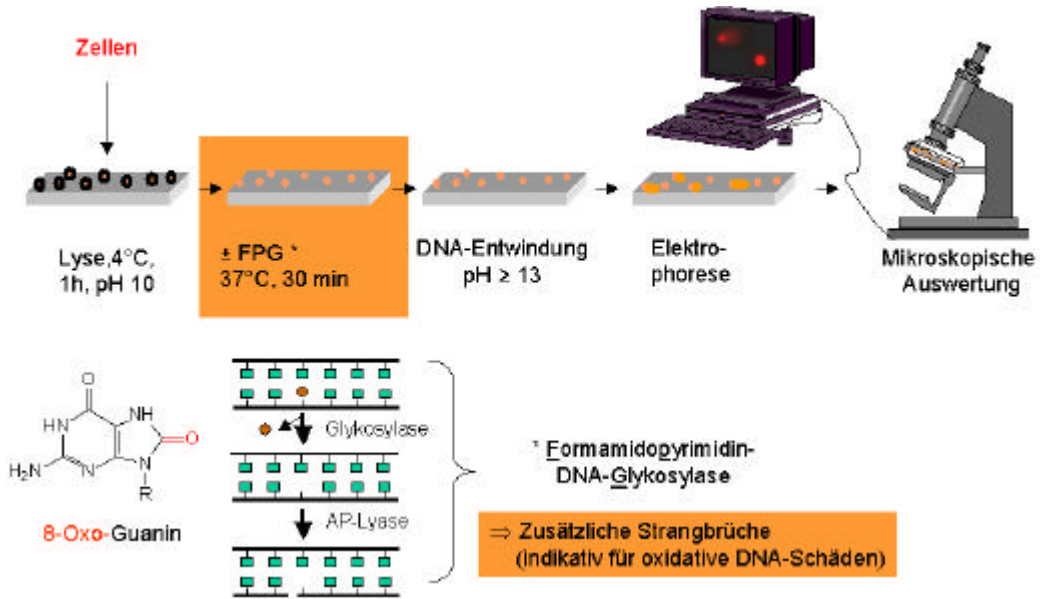
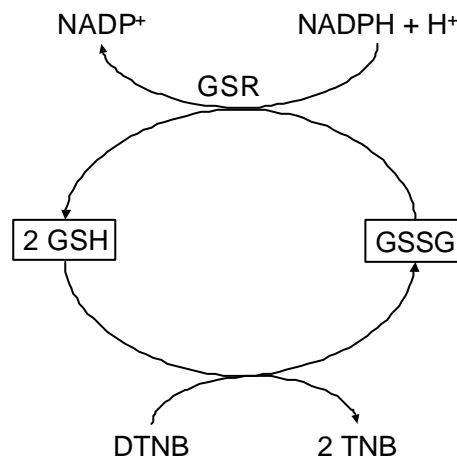


Abbildung 28: Durchführung des Comet-Assay zur Detektion oxidativer DNA-Schäden (schematische Darstellung).

3.4.3 Glutathionbestimmung

Das antioxidativ wirksame Glutathion wurde mit einem Verfahren gemessen, das sich an die Bestimmung von Akerboom und Sies [1981] anlehnt und von Gallagher et al., [1994] modifiziert wurde. Bei diesem Verfahren wird der Gesamtglutathiongehalt über einen kinetischen Test bestimmt, in dem GSH, GSSG und Glutathionreduktase (GSR) kontinuierlich 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in einer NADPH-abhängigen Reaktion zum chromophoren 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB) reduzieren (Abbildung 29).



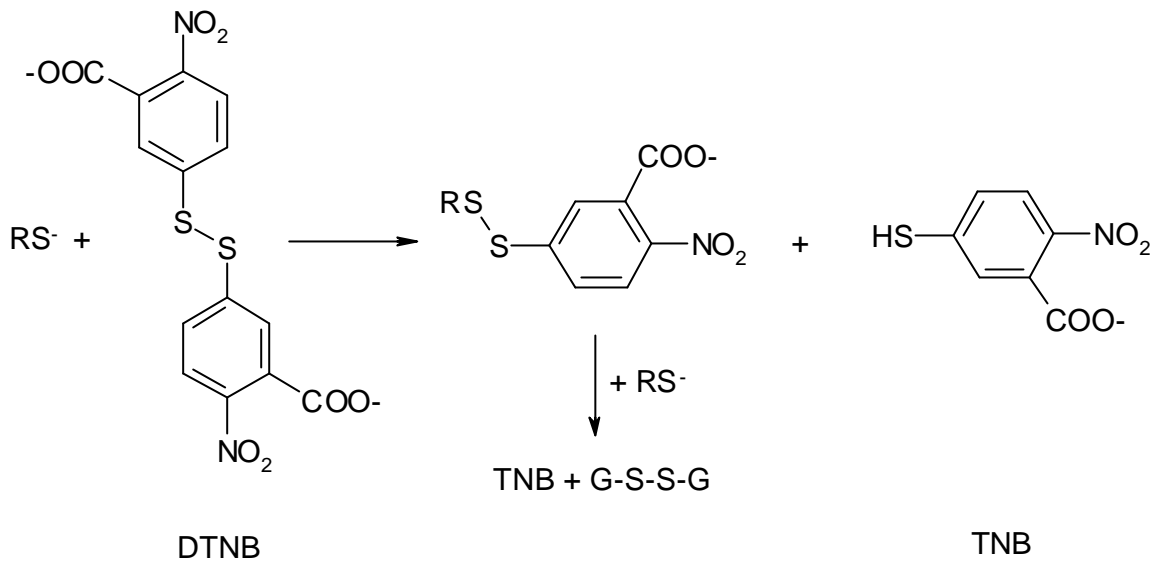


Abbildung 29: Reduktion von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB), in Anwesenheit von GSH und GSSG

Die Bildung von TNB wurde über die Extinktion bei 412 nm zeitlich verfolgt. Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung, also die Extinktionszunahme in einer bestimmten Zeit, war proportional zur tGSH Konzentration, da alle übrigen Reaktionspartner (NADPH, GSR, DTNB) in einem deutlichen Überschuss vorhanden waren. Die Berechnung der tGSH Konzentration erfolgt durch Vergleich mit entsprechenden Standardlösungen.

Zur Messung von GSSG wurde GSH mit dem Nukleophil 2-Vinylpyridin kovalent gebunden (Abbildung 30) und anschließend wieder die obige Messung durchgeführt. Durch Differenzbildung wurde der GSH-Anteil und der GSH-Status (Quotient GSH/tGSH) berechnet.

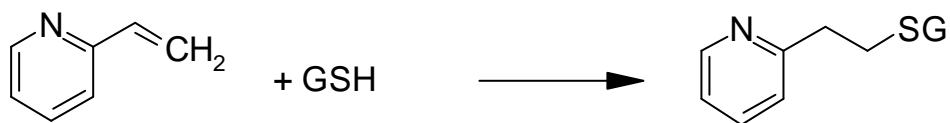


Abbildung 30: Derivatisierung von GSH durch Reaktion mit 2-Vinylpyridin

3.4.4 OTA-Aufnahme

3.4.4.1 OTA-Analytik mittels Hochdruckflüssigchromatographie

Die Hochdruckflüssigchromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC) ist heute die bedeutendste chromatographische Methode zur Analyse löslicher fester und flüssiger Substanzgemische, die in Einzelkomponenten aufgetrennt und dann qualitativ sowie quantitativ analysiert werden. Bei der HPLC liegt die stationäre Phase innerhalb einer Trennsäule und wird von einer mobilen Phase durchströmt. Weil die Löslichkeit der Probenkomponenten von der mobilen Phase abhängt, rührt die Selektivität der HPLC-Analytik sowohl von der stationären als auch von der mobilen Phase her [Aced, 1991].

Zur Analytik von OTA wurden verschiedene Lösungsmitteln über einen Entgaser für das Entfernen gelöster Gase in den Lösungsmitteln in eine HPLC-Anlage gegeben. Mit einem Gradientenformer wurden Gradienten in der Laufmittelzusammensetzung aufgebaut. Über einen automatischen Probengeber wurden die zu untersuchenden Proben zum Laufmittel gegeben und dann durch die Trennsäule transportiert. Die auf der Säule aufgetrennten Fraktionen durchlaufen einen Fluoreszenzdetektor, der an eine EDV-Anlage angeschlossen ist.

Bei der stationären Phase der verwendeten HPLC-Säule handelte es sich um eine sog. RP-18-Säule. Das Material ist unpolar und chemisch an den Kieselgelträger gebunden, also nicht auswaschbar. Die polaren Silanogruppen des Kieselgels werden mit Alkylchlorsilanen umgesetzt, es resultieren Ether oder Ester. Aufgrund der Sterik können höchstens die Hälfte aller Silanogruppen umgesetzt werden. Eine nachfolgende Behandlung mit Trimethylchlorsilan zur Herabsetzung der Polarität des Kieselgels wird „endcapping“ genannt. Die ODS-Phase (OctaDecaSilica, RP-18) mit Octadecadimethylchlorsilan wird in der Praxis häufig verwendet. Als mobile Phasen werden wässrige Lösungen (auch mit einem Anteil organischen hydrophilen Lösungsmittel) eingesetzt.

Als Detektor wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet, der als Lichtemissionsdetektor sehr selektiv für fluoreszierende Komponenten arbeitet. Er benötigt eine ausreichend starke UV-Lichtquelle, der nachfolgende Monochromator sorgt für Licht einer definierten Wellenlänge, das dann in die Detektorzelle gelangt. Dabei muss die Wellenlänge so gewählt werden, dass es zur Fluoreszenzanregung des Moleküls kommt. Das Molekül erreicht nach Durchlaufen verschiedener Relaxati-

onsmechanismen den niedrigsten angeregten Singulettzustand, von dem aus der Grundzustand unter Fluoreszenzemission wieder erreicht wird. Diese emittierte Strahlung wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl durch einen zweiten Monochromator geleitet, um mit definierter Wellenlänge den Photomultiplier zu erreichen.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkultur und Inkubation

4.1.1 Geräte, Chemikalien, Nährlösungen, Verbrauchsmaterialien

Geräte

Brutschrank Cytoperm [Heraeus]

Brutschrank WTC [Binder]

Sterilbank LaminAir HLB BS [Heraeus]

Sterilbank HeraSafe HS 12 [Heraeus]

Auflichtmikroskop [Zeiss]

Fluoreszenzmikroskop Axioskop MC 100 Spot [Zeiss]

Wasserbad [Julabo]

Autoklav Varioklav [HP-Labortechnik]

Trockenschrank U40 [Mettler]

Digitalwaage [Sartorius]

Neubauer Zählkammer

Kolbenhubpipetten (1-1000 µL) [Eppendorf, Gilson]

Multipette [Eppendorf]

Multipetten-Aufsätze (5-20 mL) [Eppendorf]

Pipettierhilfe Pipettus-Akku [Hirschmann]

Biofreezer Herafreeze [Heraeus]

pH-Meter [WTW pH 522, Elektrode Schott L737 A]

Chemikalien und Nährlösungen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg/L Glucose, mit Pyridoxin HCl, mit 15 mg/L Phenolrot als Säure-Base-Indikator

RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin mit 15 mg/L Phenolrot als Säure-Base-Indikator [Invitrogen]

William's Medium E mit L-Glutamin und Phenolrot [PAA]

Fötales Kälberserum (FKS), Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL Penicillin; 10000 µg/mL Streptomycin), Natrium-Pyruvat (100 mmol/L) [Invitrogen]

Trypsin 3,5 U/mg [Serva]

EDTA, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumhydroxid, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol, jeweils p.a.-Qualität [Merck]

Dinatriumhydrogenphosphat p.a. [Riedel-de Häen]

Trypanblau [Sigma]

Ethanol [Roth]

Salzsäure 0,1 N HCl [Fixanal, Merck]

Dimethylsulfoxid (DMSO) für die UV-Spektroskopie [Fluka]

Ochratoxin A [Calbiochem]

Verbrauchsmaterialien

Gewebekulturflaschen, Kryoröhrchen steril, Petrischalen 94/16 mm steril, PP-Röhrchen 50 mL steril, PP-Röhrchen 15 mL steril [Greiner, Sarstedt]

Sterilfilter 0,2 µm [Sartorius]

Spritzen [Braun]

Pipettenspitzen [Greiner, Sarstedt]

Lösungen

CV-1-Zellen (Kulturmedium)

500 mL RPMI-1640 Medium, 50 mL FKS, 5 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung, Lagerung bei 4 °C, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmen

CV-1-Zellen (Inkubationsmedium)

500 mL RPMI-1640 Medium, 5 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung, Lagerung bei 4 °C, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmen

V79-Zellen (Kulturmedium)

500 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium, 50 mL FKS, 5 mL Penicillin/Streptomycin-Lösung, 4 mL Natrium-Pyruvat, Lagerung bei 4 °C, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmen

V79-Zellen (Inkubationsmedium)

500 mL Dulbecco´s Modified Eagle Medium, 5 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung, 4 mL Natrium-Pyruvat, Lagerung bei 4 °C, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmen

HEK-293-Zellen (Kulturmedium)

500 mL Dulbecco´s Modified Eagle Medium, 50 mL FKS, 5 mL Penicillin/Streptomycin-Lösung, Lagerung bei 4 °C, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmen

HEK-293-Zellen (Inkubationsmedium)

500 mL Dulbecco´s Modified Eagle Medium, 5 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung, Lagerung bei 4°C, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmen

PBS-Stammlösung („phosphate buffered saline“)

2,1 g/L KH_2PO_4 , 90 g/L NaCl, 7,26 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, mit Aqua bidest. auf 1 L auffüllen; pH-Wert 7,3

PBS-Gebrauchslösung

50 mL Stammlösung mit Aqua bidest. auf 500 mL auffüllen, steril autoklavieren, Lagerung bei 4 °C, vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmen

Trypsinlösung

0,125 g Trypsin, 0,0625 g EDTA, mit PBS-Lösung auf 250 mL auffüllen; pH-Wert 7,2, Sterilfiltration (0,2 µM), Lagerung in sterilen PP-Röhrchen bei -20 °C

Trypanblau

0,5 g Trypanblau, 0,9 g NaCl, mit Aqua bidest. auf 100 mL auffüllen, Lagerung in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäßen bei -20 °C

DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung

0,2 mol/L Tris, 0,2 mol/L NaCl, 8 µmol/L 4',6-Diamidino-2-phenyl-indoldihydrochlorid (DAPI), 50 µmol/L Sulforhodamin 101, in 100 mL Aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C unter Lichtausschluss

4.1.2 Zelllinien

4.1.2.1 Kultivierung

Die Zelllinie **CV-1** wurde aus der Niere einer männlichen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen. Es handelt sich um eine adhärent wachsende Zelllinie mit fibroblastenähnlicher Morphologie. [Gluzman et al., 1981].

Bei der Zelllinie **V79** handelt es sich um eine Lungenfibroblastenzelllinie aus dem chinesischen Hamster. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. J. Döhmer, TU München, zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie **HEK-293** entstammt einer menschlichen embryonalen Niere und wurde durch das Adenovirus Typ 5 (Ad 5) immortalisiert. Es handelt sich um adhärenzte Zellen, die auch in Medium mit geringen Calcium- oder Serumkonzentrationen wachsen. Eine besondere Eigenschaft dieser Zellen ist die Expression des virusspezifischen T-Antigens [Graham et al., 1977]. Im Vergleich zu Rattenzellen besitzen diese humanen Nierenzellen eine geringere Wachstumsrate und eine sehr geringe onkogene Stimulierbarkeit. Die Morphologie hingegen ähnelt der von Fibroblasten.

Alle verwendeten Zelllinien wachsen als Monolayerkulturen und werden im Brutschrank bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen werden abhängig von der gewünschten Zellausbeute in 25 cm² oder 85 cm² Gewebekulturflaschen kultiviert. Alle Arbeitsschritte bei der Zellkultur werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.1.2.2 Mediumwechsel

Für das Wachstum und die Vitalitätserhaltung benötigen die Zellen regelmäßig frisches Kulturmedium, da Mediumbestandteile metabolisiert werden oder im Laufe der Zeit zerfallen, und saure Stoffwechselprodukte ausgeschieden werden. Spätestens nach Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb wird ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen und Stoffwechselprodukte zu eliminieren. Dazu wird das Medium abgegossen und die Zellen einmal mit PBS-Lösung gespült. Anschließend kultiviert man mit ca. 50 mL Kulturmedium. [Lindl et al., 2000]

4.1.2.3 Subkultivierung von Zellen

Wachsen die Zellen zu dicht, verändert sich ihr Stoffwechsel, einzelne Zellen sterben ab oder hören auf, sich zu teilen (Kontaktinhibition). Ist der Boden der Kulturflasche mit Zellen konfluent bewachsen, werden die Zellen subkultiviert (passagiert). Die Passagehäufigkeit hängt dabei von der Generationszeit der jeweiligen Zelllinie ab. Für eine Passage wird das Medium abgegossen und die Zellen zweimal mit PBS-Lösung gespült, um tote Zellen und Mediumreste zu entfernen. Die Zellen werden mit ca. 2 mL Trypsinlösung bei Raumtemperatur bis zum beginnenden Ablösen inkubiert und dann durch vorsichtiges Abklopfen vom Boden gelöst. Durch Zugabe von 5 mL FKS-haltigem Medium wird das Trypsin inaktiviert. Eine zu lange Behandlung mit Trypsin kann ein Absterben der Zellen zur Folge haben. Die Zellsuspension wird anschließend durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette gut durchmischt und die Zellen so vereinzelt. Anschließend streut man in eine neue Flasche je nach Bedarf eine entsprechende Anzahl von Zellen aus und kultiviert mit 50 mL frischem Kulturmedium.

HEK 293-Zellen haften weniger gut am Boden an, so dass es bereits beim Abgießen des Mediums zu einer Ablösung von Zellen kommen kann. HEK-293-Zellen werden einmal mit PBS-Lösung gespült. Ein Abtrypsinieren ist nicht notwendig, da die Zellen bereits durch leichtes Abklopfen abgelöst werden. Die abgelösten Zellen werden in 5 mL Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert, nach Bedarf wieder ausgestreut und mit 50 mL Kulturmedium kultiviert. [Lindl et al., 2000]

4.1.2.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden nach 4.1.2.3 passagiert und nach 4.2.1 dann die Zelldichte in der Zellsuspension bestimmt. Pro Kryoröhrchen sollten zwischen 1×10^6 und $1,5 \times 10^6$ Zellen eingefroren werden. Aus der Zellsuspension werden jeweils 1,2 mL in jedes Kryoröhrchen pipettiert und mit 150 μ L FKS und 150 μ L DMSO versetzt. Der Zusatz von DMSO verhindert während des Einfriervorgangs eine Kristallbildung, die zur Schädigung der Zelle führen würde. Die Zellen werden 24 h bei -20 °C eingefroren und anschließend bei -80 °C im Biofreezer oder bei -180 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. [Lindl et al., 2000]

4.1.2.5 Auftauen von Zellen

Die im Biofreezer bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff bei -180 °C gelagerten Zellen werden rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, um ein Platzen der Zellmembran und Schädigungen durch das zum Einfrieren eingesetzte DMSO zu verhindern. Die Zellen werden in ein mit 15 mL Kulturmedium gefülltes PP-Röhrchen pipettiert und anschließend bei 4 °C und 1500 Upm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 10 mL frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension dann in eine 25 cm² Kulturflasche überführt. Nach 24 h erfolgt ein Mediumwechsel. [Lindl et al., 2000]

4.1.2.6 Kontrolle der Zellkultur auf Mykoplasmen

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten, die parasitär in enger Vergesellschaftung mit Pflanzen- oder Tierzellen leben. Sie sind wechselnd in ihrer Morphologie und leicht verformbar, ihre Größe schwankt zwischen $0,2\text{ }\mu\text{m}$ und $2\text{ }\mu\text{m}$. Dementsprechend sind sie in der Lage, die üblichen Sterilfilter aus Cellulose- und Polyvinylidenderivaten der Kulturflaschen (Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$) zu passieren und so in die Zellkultur zu gelangen. Mykoplasmen sind in der Zellkultur unerwünscht, da sie nicht nur die Zellen und deren Stoffwechsel verändern, sondern auch die Ergebnisse von Versuchen beeinträchtigen können.

Als Nachweismethode für Mykoplasmenkontaminationen hat sich die Fluorochromierung mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) bewährt. Die DNA der Mykoplasmen und der Zellen wird mit DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheint die DNA der Mykoplasmen als kleine, hell leuchtende Punkte auf oder in den Zellen, deren Zytoplasma rot leuchtet. Zur Durchführung des Nachweises werden wenige Tropfen der zu untersuchenden Zellsuspension auf einem sterilen Objektträger in einer bereits mit Medium gefüllten 94/16 mm Petrischale ausgestreut und für mindestens 24 h im Brutschrank kultiviert. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen werden mit eiskaltem Methanol gespült und anschließend mindestens 30 Minuten in eiskaltem Methanol fixiert. Nach dem Trocknen werden die Zellen mit 40 μl DAPI-Lösung angefärbt, mit einem Deckglas bedeckt und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung bei 365 nm betrachtet. Im Fall einer Mykoplasmenkontamination werden die Zellen nach Herstelleranweisung mit BM Cyclin[®] [Roche] behandelt.

4.1.2.7 Inkubation

Kurzzeitinkubationen (1 h) erfolgen mit den Zelllinien in der Suspension der abtrypsinisierten Zellen. In DMSO gelöstes OTA wird in den gewünschten Konzentrationen zum Inkubationsmedium gegeben, so dass die DMSO-Konzentration während der Inkubation bei 1 % liegt. Längere (4 bzw. 24 h) Inkubationen werden in der Monolayerkultur in Petrischalen durchgeführt, die DMSO-Konzentration während der Inkubation liegt bei 0,1 %.

Für die Untersuchung der Modulation der Zytotoxizität durch Trolox wurde in Koinkubationsexperimenten das Inkubationsmedium gleichzeitig mit Trolox und OTA versetzt (0,2 % DMSO). In Inkubationsexperimenten mit einer Vorinkubation mit Trolox wurde Kulturmedium mit den gewünschten Trolox-Konzentrationen versetzt (0,1 % DMSO), für 24 h inkubiert und dann ein Mediumwechsel mit OTA-haltigem Inkubationsmedium (0,1 % DMSO) vorgenommen.

4.1.3 Primäre proximale Tubuluszellen der Ratte

4.1.3.1 Gewinnung

4.1.3.1.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Geräte

Schlauchpumpe Gilson Miniplus 2 [Abimed]

Wasserbad

Lösungen

HBSS-Stamm-Lösung

80 g NaCl, 4 g KCl, 0,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g KH_2PO_4 , 3,5 g NaHCO_3 (wasserfrei), 10 g Glucose, 48 g HEPES, auf 1000 mL mit Aqua bidest. auffüllen

HBSS-Lösung

HBSS-Stamm-Lösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen, pH 7,4, steril filtrieren, Lagerung bei Raumtemperatur

Pentobarbital-Lösung

33 mg/mL Pentobarbital in Aqua bidest.

Heparinlösung

1000 U/mL in 0,9 %iger NaCl-Lösung (steril)

FKS

Williams-Medium

Collagenase-Lösung

Collagenase Typ IV [Sigma], 5 U/mL in Williams-Medium

Trypsin-Lösung (0,25 % in PBS mit 0,125 % EDTA)

Verbrauchsmaterialien

Spritzen, Kanülen, Braunülen [Braun]

PP-Röhrchen, 50 mL

sterile Bechergläser und Erlenmeyerkolben

sterile Seide (250 µm Maschenweite)

4.1.3.1.2 Durchführung

- Lösungen auf 37 °C erwärmen, einen Teil HBSS-Lösung auf Eis stellen
- Männliche Wistar-Ratten (ca. 200 g) mit 300 µL/100 g Körpergewicht Pentobarbital-Lösung narkotisieren und rücklings auf dem Operationstisch fixieren
- Bauchdecke eröffnen, Ratte heparinisieren (0,1 mL) und Ligatur um die Vena Renalis der rechten Niere legen
- Mit der Braunüle die Vena Renalis anstechen und die rechte Niere 3 min mit 10 mL/min blutfrei spülen
- Rechte Niere präparieren und in eiskaltem HBSS lagern
- Linke Niere ligieren und wie oben blutfrei waschen, präparieren und auf Eis in HBSS lagern
- Nieren aus der Organkapsel lösen und Kortex präparieren
- Kortex mechanisch in kleine Fragmente zerkleinern, diese 30 min bei 37 °C in 15 mL Collagenase-Lösung unter Rühren inkubieren
- 15 mL eiskalte HBSS-Lösung zugeben, mit einer Pipette resuspendieren und durch die Seide in ein 50 mL PP-Röhrchen filtrieren
- 30 s zentrifugieren bei 60 x g

- Überstand vorsichtig verwerfen, Pellet vorsichtig mit eiskaltem HBSS resuspendieren, zentrifugieren (30 s, 60 x g), erneut waschen und zentrifugieren
- Pellet in 500 µL Medium aufnehmen, 500 µL Trypsinlösung zugeben und 30 min bei 37 °C inkubieren (gelegentlich resuspendieren)
- 100 µL FKS zugeben und Viabilität der Einzelzellen nach 4.2.1 bestimmen
- die Zellen können direkt für Kurzzeitinkubationsexperimente eingesetzt oder kultiviert werden

4.1.3.2 Kultur

Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Rattenschwanzcollagen-Lösung in Essigsäure

Petrischalen (60 mm)

Durchführung

- Petrischalen mit Collagenlösung benetzen und unter einer UV-Lampe in der Sterilbank sterilisieren
- isolierte Zellen in Williams-Medium in Petrischalen aussäen (1×10^6 Zellen pro Schale) und im Brutschrank kultivieren
- nach 4-6 h Mediumwechsel
- Substanzinkubation nach insgesamt 24stündiger Kultivierung

4.1.3.3 Inkubation

Kurzzeitinkubationen (1 h) erfolgen mit PNZ in der Suspension der frisch isolierten Zellen. OTA (in DMSO gelöst) wird in den gewünschten Konzentrationen zum Inkubationsmedium gegeben, so dass die DMSO-Konzentration während der Inkubation bei 0,1 % liegt. 24 h-Inkubationen werden in der Monolayerkultur durchgeführt. Die DMSO-Konzentration liegt während der Inkubation bei 0,1 %. Die Zellen werden nach der Inkubation durch Trypsinieren geerntet.

4.2 Zytotoxizität

4.2.1 Viabilitätsbestimmung

4.2.1.1 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen wird mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese besteht aus neun großen Quadraten. Jedes große Quadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 , dies ergibt bei einer Tiefe der Kammer von $0,1 \text{ mm}$ ein Volumen von $0,1 \text{ }\mu\text{L}$. Für die direkte Zellzählung wird ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop kann anschließend die Zellzahl pro $0,1 \text{ }\mu\text{L}$ bestimmt werden. [Lindl et al., 2000]

4.2.1.2 Bestimmung der Viabilität

Mittels Trypanblauausschluss-Test können lebende von toten Zellen unterschieden und so die Lebendzellzahl bzw. Viabilität bestimmt werden. Hierfür werden in einem Mikroreaktionsgefäß ein Aliquot Zellsuspension mit einem Aliquot Trypanblau gemischt und auf die Zählkammer gebracht. Aufgrund der permeablen Membran von geschädigten Zellen lagert sich der Farbstoff in diese ein, sie erscheinen blau gefärbt. Lebende Zellen erscheinen im Mikroskop hell leuchtend. Die Viabilität ergibt sich aus dem Verhältnis der intakten, viablen Zellen (Gesamtzellzahl minus nekrotische Zellen) zur Gesamtzellzahl und wird in % angegeben. [Lindl et al., 2000]

4.2.2 Wachstumshemmung

4.2.2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Photometer [Kontron Uvikon 810]

Küvetten [Brandt]

24-Lochplatten [Greiner]

TCA (Trichloressigsäure), 50 % (w/v) in Aqua bidest.

SRB (Sulforhodamin B), 0,4 % in 1 %iger Essigsäure

Essigsäure (1 %ig)

TRIS-Base (TRIS-Puffer pH 10,5)

4.2.2.2 Durchführung

Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit wachstumshemmender und zytotoxischer Effekte auf die Zelllinie erfolgt mittels eines modifizierten Sulforhodamin B-Tests (SRB-Test) nach Skehan. Das Verfahren basiert auf einer photometrischen Bestimmung des Proteingehaltes nach Anfärbung mit dem Farbstoff SRB [Skehan, 1990]. Dazu werden in 24-Loch-Platten in jedes Loch etwa 50.000 Zellen ausgesät. Anschließend lässt man die Zellen 24 h im Brutschrank wachsen und inkubiert dann mit unterschiedlichen Konzentrationen an OTA für weitere 24 h. Die Inkubation wird durch Überschichten mit TCA-Lösung beendet, wodurch das Protein am Boden fixiert wird. Nach 1 h bei 4 °C wird die TCA abgegossen und mit Wasser nachgespült. Die Platte wird dann an der Luft getrocknet. Mit 250 µL SRB-Lösung wird das Protein angefärbt und 30 min einwirken gelassen. Anschließend wird ungebundenes SRB mit 1% Essigsäure ausgewaschen. Die Platten werden erneut getrocknet und der gebundene Farbstoff dann in 1 mL TRIS-Base aufgenommen. Die Messung erfolgt photometrisch bei 563 nm. [Mußler, 1999]

4.2.3 Proteinbestimmung (BCA)

4.2.3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Photometer [Kontron Uvikon 810]

Küvetten [Brandt]

Mikroreaktionsgefäße 2 und 1,5 ml [Greiner]

Schüttelwasserbad [Julabo]

Minifuge [Heraeus]

Lösungen

BCA-Protein Kit Uptima [KMF Laborchemie, Lohmar]:

Reagenz A: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , BCA (Bichinonic Acid), Na-Tartrat

Reagenz B: CuSO_4

Reagenz C: Gemisch aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1

Proteinstandards: BSA 2 mg/mL

4.2.3.2 Durchführung

- die Messung wird grundsätzlich als Doppelbestimmung durchgeführt
- aus dem BSA-Proteinstandard (2 mg/mL) eine Standardreihe von 100 µL/mL bis 1000 µL/mL ansetzen
- zweimal jeweils 50 µL Probe, Standard und Blindwert (Aqua bidest.) in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen mit jeweils 1 mL BCA-Reagenz C versetzen
- Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37 °C für 30 min
- Lösungen kurz auf Eis stellen, um die Reaktion zu stoppen
- in Messküvetten überführen und umgehend gegen den Blindwert messen

4.2.3.3 Auswertung

Aus den Extinktionswerten der Standardlösungen wird eine Standardgerade erhalten. Nach linearer Regression werden die entsprechenden Extinktionen der Proben in die errechnete Gleichung eingesetzt und so der jeweilige Proteingehalt [µg/mL] bestimmt.

4.2.4 Apoptose

4.2.4.1 Immunochemischer Test

4.2.4.1.1 Geräte, Lösungen und Verbrauchsmaterial

96-Loch-Mikrotiterplatten [Greiner]

Cell Death Detection ELISA[®] plus Test-Kit [Roche]

biotinverknüpfter Anti-Histon-Antikörper

POD-verknüpfter Anti-DNA-Antikörper

Positivkontrolle (stabilisierter DNA-Histonkomplex)

Inkubationspuffer

Lysepuffer

Substratpuffer

ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonat))

Streptavidin-beschichtete 96-Lochplatte

Multiplattenphotometer

4.2.4.1.2 Durchführung

In 96-Loch-Mikrotiterplatten werden in 200 µL Kulturmedium 10.000 (4 h-Inkubation) bzw. 5.000 (24 h-Inkubation) CV-1-Zellen pro Napf ausgesät und ca. 24 h im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss an die Inkubation mit den Testsubstanzen wird die Mikrotiterplatte 10 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Als Apoptose-induzierende Substanz wird immer der Topoisomerasehemmstoff Camptothecin in mehreren Konzentrationen eingesetzt. Es sind immer mindestens Doppelbestimmungen durchzuführen. Zur Messung von Nekrose wird der Zentrifugationsüberstand verwendet, Apoptose wird aus den abzentrifugierten Zellen und Apoptosekörperchen bestimmt:

- 200 µL Lysepuffer in jeden Napf geben, inkubieren bei 15-25 °C für 30 min
- Zentrifugation bei 200 x g für 10 min
- je 20 µL der Zellysate (ggf. Zellüberstände zur Nekrosemessung), der Positivkontrolle (stabilisierter DNA-Histonkomplex) und der Hintergrundkontrolle in einen Napf der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte geben.
- je 80 µL Immunreagenz zugeben, nach Abdecken der Mikrotiterplatte für 2 h in einem Mikrotiterplattenschüttler (300 Upm) inkubieren
- Immunreagenz entfernen, dreimal mit 250-300 µL Inkubationspuffer waschen, Puffer entfernen
- 100 µL ABTS-Lösung zu jedem Napf geben, auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 250 Upm inkubieren bis eine ausreichende Färbung eingetreten ist (10-20 min)
- Messung im Multiplattenphotometer bei 405 nm gegen die ABTS-Lösung als Blindwert (gemessen bei 490 nm)

4.2.4.1.3 Auswertung

Aus den Einzelmesswerten der Proben wird der Mittelwert gebildet und nach Subtraktion des Hintergrundwertes wird dieser durch den Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle geteilt. Das Ergebnis wird als Anreicherung der Nukleosomen im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

4.2.4.2 Durchflusszytometrie

4.2.4.2.1 Allgemeine Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Geräte

Vortexer [Scientific Industries]

Zentrifuge [Heraeus, Sigma]

Durchflusscytometer FACSCalibur [Beckton Dickinson]

Verbrauchsmaterialien

Petrischalen 94/16 mm [Greiner]

Pipettenspitzen [Greiner]

PP-Röhrchen 15ml [Greiner, Sarstedt]

Zentrifugenröhrchen [Sarstedt]

Messküvetten [Sarstedt]

Chemikalien

DMSO [Fluka]

Ethanol (70%ig) [Roth]

Annexin-V/FITC-Propidiumjodid-Kit [Beckman Coulter Company]

4.2.4.2.2 Zellernte und Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der CV-1-Zellen nach 24 h Inkubation mit OTA erfolgt unter nicht-sterilen Bedingungen:

- Inkubationsmedium mit einer 10 mL Pipette in 15 mL PP-Röhrchen überführen
- Petrischale mit 1 mL PBS spülen, PBS-Lösung in PP-Röhrchen pipettieren
- Zellen mit 1 mL Trypsin versetzen, ca. 30 Sekunden warten, Zellen vorsichtig abklopfen und ebenfalls in PP-Röhrchen pipettieren
- Petrischale dreimal mit jeweils 1 mL FKS-Medium spülen, Medium in PP-Röhrchen überführen
- Zellsuspension resuspendieren und dann bei 1000 Upm und Raumtemperatur 12 min abzentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellpellet abtropfen lassen, erneut in 2 mL FKS-Medium aufnehmen und resuspendieren, 60 min auf Eis stellen, ab und zu schütteln
- danach 50 µL für Viabilitätsbestimmung nach 4.2.1 entnehmen
- Zellen bei 1000 Upm, 12 min abzentrifugieren, Medium verwerfen, Zellpellet in 2 mL PBS-Lösung aufnehmen, dabei nicht resuspendieren, auf Eis stellen
- PBS-Lösung vorsichtig absaugen, Pellet in 100 µL „Binding-Buffer“ aufnehmen und in Messküvette überführen
- zur Zellsuspension 5 µL Annexin-V/FITC, 2,5 µL Propidiumjodid und 100 µL Binding-Puffer pipettieren, 15 min im Dunkeln inkubieren
- Messung

4.2.4.2.3 Messung

Die Messungen durften freundlicherweise am Durchflusszytometer FACSCalibur im Arbeitskreis Prof. Brüne durchgeführt werden. Die Auswertung wird mit dem Programm Cell Quest Pro durchgeführt. Die Einteilung des Dotplots in vier Quadranten erfolgt anhand der Kontrolle. Die überwiegend vitalen Zellen sind sowohl Annexin-V/FITC als auch Propidiumjodid negativ, der Quadrant für vitale Zellen wird dementsprechend definiert. Für apoptotische, spät-apoptotische und nekrotische Zellen ergeben sich die übrigen Quadranten entsprechend. Gleichzeitig erhält man den Prozentsatz an Ereignissen des jeweiligen Quadranten.

4.3 DNA-Schädigung

4.3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Wasserbad [Julabo]

Zentrifuge Minifuge [Heraeus]

Zeiss Axioskop 20, Filter Set 15 [Anregung: BP 546/12; Emission: LP 590]

Comet II [Perceptive Instruments, Suffolk, England]

Elektrophoresekammer für horizontale Gelelektrophorese mit Powerpack [Sub Cell GT Biorad]

Färbekammern für die Mikroskopie

Lösungen

PBS:

8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,15 g Na_2HPO_4 , mit Aqua bidest. auf 1 L auffüllen und mit 1 mol/L NaOH auf pH 7,4 einstellen

NMA („normal melting agarose“ [Biorad]), 0,5 % in PBS

LMA („low melting agarose“ [Biorad]), 0,7 % in PBS

Lyse-Stammlösung

146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA, 1,2 g Tris, mit Aqua bidest. Auf 1 L auffüllen und mit NaOH auf pH 10 einstellen, 10 g N-Laurylsarcosin Na-Salz zugeben

Lyse-Gebrauchslösung

89 Teile Lyse-Stammlösung, 1 Teil Triton X-100, 10 Teile DMSO

Elektrophoresepuffer (Stammlösungen)

200 g NaOH in 500 mL Aqua bidest.

14,9 g EDTA in 200 mL Aqua bidest.

Elektrophoresepuffer (Gebrauchslösung)

30 mL NaOH-Lösung, 5 mL EDTA-Lösung, auf 1 L mit bidest. Wasser auffüllen

Neutralisationspuffer

48,5 g Tris auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Ethidiumbromid (Stammlösung)

10 mg in 50 mL Aqua bidest.

Ethidiumbromid (Gebrauchslösung)

100 µL Stammlösung + 900 µL Aqua bidest.

Immersionsöl [Serva]

4.3.2 Durchführung

- 40 µL Normal Melting Agarose (NMA) auf einen Objektträger geben, mit der kurzen Kante eines zweiten Objektträgers ausstreichen und trocknen lassen
- zweimal nebeneinander je 65 µL NMA auftragen und sofort mit einem Deckglas (24 x 24 mm) zudecken, Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C in einer feuchten Box
- Aliquots der Zellsuspension (ca. 50.000 Zellen) in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße geben und zentrifugieren (4 °C, 800 x g, 10 min)
- Überstand verwerfen, Zellen in 65 µL LMA resuspendieren, schnell auf die vorbereiteten Gele der Objektträger (nach Entfernung der Deckgläser) geben und mit einem Deckglas abdecken, auf Eis erkalten lassen
- Deckgläser entfernen, Objektträger in eine mit eiskaltem Lysepuffer gefüllte Färbekammer stellen und mindestens eine Stunde bei 4°C lysieren
- Objektträger in einer Färbekammer dreimal 5 min mit je ca. 100 mL eiskaltem Enzympuffer waschen und leicht trocknen lassen
- 50 µL Enzymlösung bzw. 50 µL Enzympuffer auf die Gele geben, mit einem Deckglas zudecken und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
- Deckgläser entfernen, Objektträger in eine eisgekühlte Elektrophoresekammer legen, die Kammer so mit eiskaltem Elektrophoresepuffer füllen, dass Gele etwa 0,5 cm hoch bedeckt sind und DNA 20 min denaturieren
- Spannung einstellen (25V; 0,89V/cm) und durch Zugabe oder Entnahme von Puffer die Stromstärke auf 300mA regulieren, 20 min elektrophanieren

- Objektträger in einer Färbekammer dreimal 5 min mit je ca. 100 mL eiskaltem Neutralisationspuffer waschen, mit 40 μ L Ethidiumbromidlösung pro Gel färben und mit einem Deckglas bedecken, Lagerung bei 4 °C in einer feuchten dunklen Box
- pro Deckglas 50 Zellen am Fluoreszenzmikroskop auswerten, dabei das Deckglas mäanderförmig absuchen und alle einzelnen, sich nicht überdeckenden Zellen erfassen
- Quantifizierung der DNA-Strangbrüche über die Schweifintensität (Anteil der Fluoreszenzfärbung im Kometenschweif)

Die Zeiten für DNA-Denaturierung und Elektrophorese müssen möglichst genau eingehalten werden, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Die Schweifintensitäten von 50 Zellen pro Deckglas wurden gemittelt, anschließend die Mittelwerte aus zwei Gelen berechnet und dieser als eine unabhängige Bestimmung verwendet.

4.4 Glutathionbestimmung

4.4.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Photometer [Kontron Uvikon 810]

Küvetten [Brandt]

Mikroreaktionsgefäße 2 und 1,5 mL [Greiner]

Minifuge [Heraeus]

Lösungen

Puffer A

1,7 g KH_2PO_4 , 234 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, in 100 mL Aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C

Puffer B

2,175 g K_2HPO_4 , 234 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, in 100 mL Aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C

Puffer (A+B)

15 mL Puffer A + 85 mL Puffer B; pH=7,5

NADPH-Lösung

20 mmol/L in 0,5%iger NaHCO₃-Lösung (18 mg NADPH in 1 mL 0,5 %iger NaHCO₃-Lösung)

NaHCO₃-Lösung, 0,5%ig

500 mg NaHCO₃ lösen in 100 ml Aqua bidest., Lagerung bei 4 °C

DTNB-Lösung (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)), 6 mmol/L

24 mg DTNB (Sigma) lösen in 10 ml Puffer (A+B)

GSR-Lösung: Glutathion-Reduktase [Sigma-Aldrich]

0,5 U Glutathion-Reduktase/ 10 µL Puffer (A+B)

5-Sulfosalicylsäure (5-SSA)

10 %ig: 100 g 5-SSA in 1000 mL Aqua bidest.

5 %ig: 50 g 5-SSA in 1000 mL Aqua bidest.

Lagerung bei 4 °C

Glutathion, oxidiert [Acros]

Glutathion, reduziert [Sigma-Aldrich]

4.4.2 Durchführung

Die Aufarbeitung der CV-1-Zellen nach 24 h Inkubation mit OTA erfolgt unter nicht-sterilen Bedingungen:

- Inkubationsmedium mit einer 10 mL Pipette in 15 mL PP-Röhrchen überführen
- Petrischale mit 1 mL PBS-Lösung spülen, Lösung in PP-Röhrchen pipettieren
- Zellen mit 1 mL Trypsin versetzen, nach ca. 30 Sekunden Zellen vorsichtig abklopfen und ebenfalls in PP-Röhrchen pipettieren
- Petrischale dreimal mit jeweils 1 mL FKS-Medium spülen, Medium in PP-Röhrchen überführen
- Zellsuspension resuspendieren und dann bei 1000 Upm und Raumtemperatur 12 Minuten abzentrifugieren

- Überstand verwerfen, Zellpellet abtropfen lassen, dann in 1 mL A+B Puffer aufnehmen, resuspendieren und in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß überführen
- Das PP-Röhrchen dreimal mit jeweils 250 μ L A+B Puffer spülen, Lösung ebenfalls in Mikroreaktionsgefäß überführen
- Zellen bei 2000 Upm, 4 °C 10 min abzentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet erneut in 1 mL A+B Puffer aufnehmen und bei 2000 Upm, 4 °C 10 min abzentrifugieren
- Pellet in 700 μ L A+B Puffer aufnehmen und resuspendieren
- zweimal jeweils 50 μ L Zellsuspension zur Proteinbestimmung (s. Kap. 4.2.3) in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße pipettieren
- Zellsuspension mit 10 %iger 5-SSA im Verhältnis 1:1 verdünnen, ausgefällte Proteine bei 13.000 Upm und 4 °C 12 min abzentrifugieren
- die Glutathionbestimmung erfolgt aus dem Überstand

Küvettenmix

In jede Küvette werden jeweils 20 μ L NADPH-Lösung, 150 μ L Aqua bidest., 100 μ L DTNB-Lösung und 700 μ L A+B-Puffer vorgelegt

4.4.3 Messung

Aus einem GSH-Standard (400 μ mol/L) werden Eichlösungen im Bereich von 0,625 μ mol/L bis 20 μ mol/L erstellt. Ein entsprechender Leerwert (5 %ige 5-SSA) wird mitgeführt. Jeweils 20 μ L Standard oder Probe werden zum Küvettenmix gegeben. Gemessen wird die Extinktion bei 412 nm zum Zeitpunkt $t = 0$ min und nach Zugabe von 10 μ L GSR-Lösung nach $t = 10$ min. Die erhaltenen Extinktionen sind direkt proportional zur tGSH-Konzentration in der Probe.

4.4.4 Auswertung

Aus den Extinktionswerten der Standardlösungen wird eine Standardgerade erhalten. Nach linearer Regression werden die entsprechenden Extinktionen der Proben in die Regressionsgleichung eingesetzt und so der jeweilige tGSH-Gehalt

[nmol/mL] bestimmt. Da die Zellzahl in den Probelösungen nicht exakt übereinstimmt, gibt man den tGSH-Gehalt bezogen auf das Protein [nmol/mg Protein] an.

4.5 OTA-Aufnahme

4.5.1 Analytik

4.5.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Die Wahl der HPLC-Bedingungen (Haupt- und Vorsäule, Probenvolumens Laufmittel, Detektoreinstellungen) erfolgte nach der analytischen Methode nach §35 LMBG 15.00 1/1. Die Etablierung der OTA-Analytik wurde an einer nicht-computergestützten HPLC-Anlage vorgenommen:

- Entgaser Modell DG-980-50 [Jasco]
- Niederdruckgradientenformer Modell LG-980-02 [Jasco]
- HPLC-Pumpe Modell PU-980 [Jasco]
- Fluoreszenzdetektor Modell FP-920 [Jasco]
- RP-18 Säulen (5 µm), Vorsäulen [Merck, LiChrospher[®] 100]
- Schreiber: C-R6A Chromatopac [Shimadzu]

Die Analytik wurde auf eine computer-gesteuerte HPLC-Anlage übertragen; an dieser Anlage mit automatischem Probengeber wurde dann die Aufnahmen von OTA in CV-1-Zellen untersucht:

- Entgaser Modell DG 1580-53 [Jasco]
- Niederdruckgradientenformer Modell LG 1580-02 [Jasco]
- HPLC-Pumpe Modell PU 1580 [Jasco]
- Fluoreszenzdetektor Modell FP 1520 [Jasco]
- Automatischer Probengeber Modell AS 1550 [Jasco]
- RP-18 Säulen (5 µm), Vorsäulen [Merck, LiChrospher[®] 100]

4.5.1.2 Einstellungen

- Laufmittel: 99 Volumenanteile Acetonitril, 99 Volumenanteile Aqua bidest., 2 Volumenanteile Eisessig.

(Durch die Essigsäure liegt OTA im Lösungsmittelgemisch als neutrales Molekül vor und kann auf der RP-18-Säule retardiert werden.)

- Flussrate: 1,0ml/min.
- Detektion: Excitation: 333 nm, Emission: 460 nm.

Die RP-18-Säule wurde nach Beendigung der Arbeiten etwa 15 min lang mit einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Aqua bidest. Wasser (1:1) gespült.

4.5.2 Aufnahme

Nach der Inkubation 24 h mit OTA wurden die CV-1-Zellen mittels Abschaben gereinigt, gepottert und die fragmentierten Zellen einer fraktionierenden Zentrifugation unterzogen. Die einzelnen Fraktionen wurden dann auf OTA untersucht.

Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Tisch-Zentrifuge Minifuge [Heraeus]

Mikro-Handpotter [Roth]

Petrischalen 60 mm

EtOH p.a. [Roth]

HPLC-Laufmittel

Durchführung

- CV-1-Zellen zweimal mit PBS spülen
- Zellen abschaben und Petrischale zweimal mit je 500 µL PBS spülen
- Zellsuspension auf Eis pottern (Mikro-Handpotter, 40 Hübe, „tight pistill“)
- zentrifugieren (600 x g, 120 min, 4 °C), Pellet (Zellkerne, Zytoskelett) bei -20 °C aufheben
- Überstand zentrifugieren (15.000 x g, 120 min, 4 °C), Pellet (Mitochondrien, Lysosomen, Peroxysomen) bei -20 °C aufheben
- Überstand zentrifugieren (100.000 x g, 120 min, 4 °C), Pellet bei (Plasmamembran, Endoplasmatisches Retikulum (Fragmente), Mikrosomen) -20 °C aufheben

- Überstand zur Proteinfällung mit EtOH versetzen, bei -20 °C mindestens eine Stunde ausfällen, zentrifugieren (15.000 x g, 15 min, 4 °C) und mittels HPLC auf OTA untersuchen
- Pellets mit 50 µL Laufmittel resuspendieren, vortexen, Protein fällen (s.o.), zentrifugieren (14.000 x g, 15min) und mittels HPLC auf OTA untersuchen

Zur Untersuchung der Bindung von OTA in verschiedene Zellkompartimente werden vor den Zentrifugationsschritten definierte Mengen OTA zugegeben.

4.6 Statistische Auswertung

Von den einzelnen Wiederholungen der Versuche (eine Wiederholung ist das arithmetische Mittel aller Bestimmungen aus einem Versuchsansatz) wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Nur in den Fällen, in denen nur zwei unabhängige Wiederholungen vorlagen wurde der Mittelwert mit der rechnerischen Mittelwertabweichung angegeben.

Alle Berechnungen wurde mit Microsoft Excel 2000 durchgeführt, alle Regressionen (linear und sigmoidal) mit Microcal Origin 6.0. Zu Untersuchung auf Signifikanzen wurde mit den Einzelwerten der zu vergleichenden Gruppen ein t-Test durchgeführt, bei dem die Gruppen als unabhängig betrachtet wurden. Die Berechnung wurde mit Microcal Origin 6.0 durchgeführt. Dabei unberücksichtigt blieben statistische Ausreißer nach Nalimov ($p < 0,05$), die mit Microsoft Excel 2000 berechnet wurden.

Die statistische Auswertung des Tierversuchs erfolgte durch die Durchführung des t-Tests mit unabhängigen Gruppen nach Logarithmierung der Einzelwerte, um eine Normalverteilung der Werte zu gewährleisten. Die Berechnungen wurden von Dr. Stockis, Fachbereich Mathematik, Universität Kaiserslautern durchgeführt.

5 Ergebnisse und erste Diskussion

5.1 Gewinnung primärer Nierenzellen

In der *in vitro* Toxikologie haben viele Zellsystemsyste den Nachteil, keine oder nur sehr geringe metabolische Aktivität aufzuweisen. Eine Möglichkeit, metabolische Aktivität in ein Testsystem zu bekommen, ist die Verwendung sog. primärer Zellen, die direkt nach der Isolierung aus dem Tier (i.d.R. durch Perfusionstechniken) für die Versuche eingesetzt werden. Die metabolische Kompetenz solcher Zellen lässt -abhängig vom betrachteten metabolisierenden Enzymsystem- relativ rasch nach (h, d). Bei der Gewinnung von primären Rattennierenzellen (PNZ) handelt es sich im Vergleich zur Leberperfusion um eine selten angewendete Technik, die zunächst etabliert werden musste. Grundlage war eine Methode zur Nierenperfusion von Brendler-Schwaab [Brendler-Schwaab & Herold, 1997; Brendler-Schwaab et al., 1994] Zur Perfusion wurden juvenile männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 200-250 g eingesetzt. Die Bauchdecke der mit Pentobarbital narkotisierten Ratte wurde eröffnet und zunächst die rechte Niere mit wässriger Pufferlösung über die Vena renalis blutfrei gewaschen. Anschließend wurde die Niere aus der Bindegewebskapsel herauspräpariert und in Pufferlösung gelegt. Mit der linken Niere wurde nach der gleichen Prozedur verfahren. Von den Nieren wurden die Kortices isoliert, in kleine Stücke geteilt und einem Collagenase-Verdau unterworfen. Danach werden die Gewebefragmente gewaschen, isoliert und anschließend einem Trypsinverdau unterworfen.

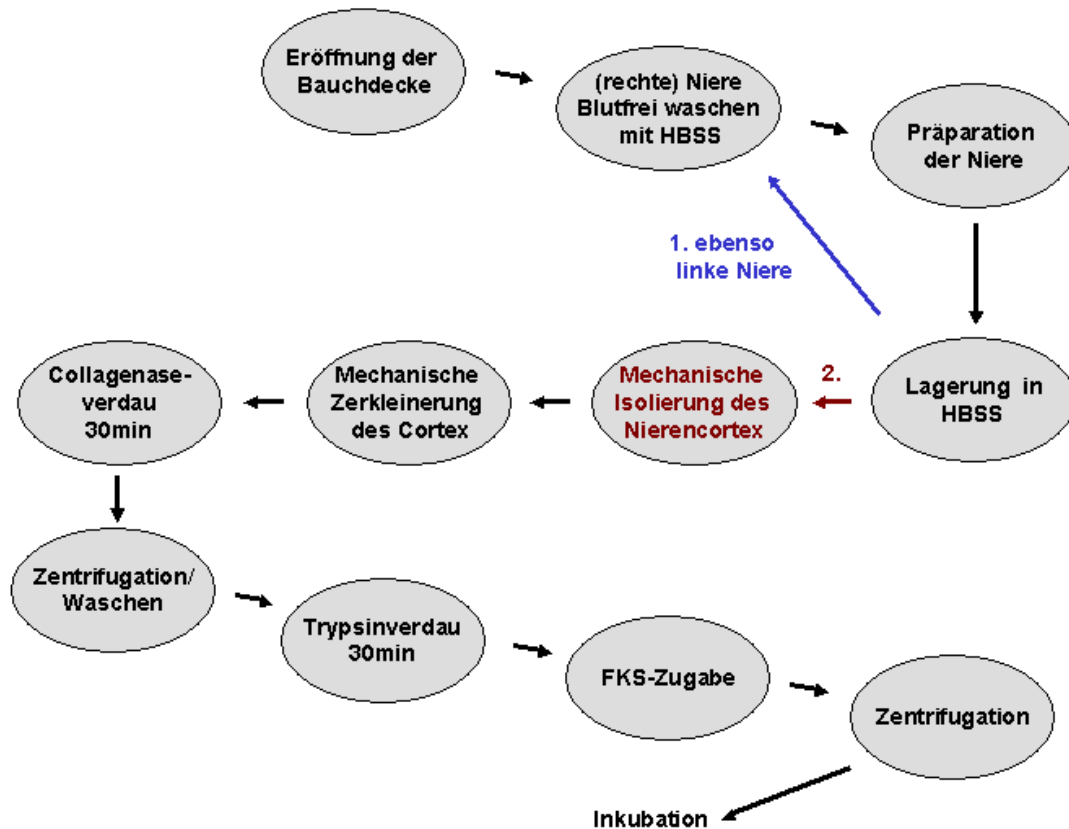


Abbildung 31: Schematischen Darstellung der Nierenperfusion

Durch Variation der Wasch- und Zentrifugationsschritte konnten die Ausbeuten deutlich erhöht werden

Alternativ wurden auch Nieren von Ratten, die einer Leberperfusion unterworfen wurden, zur Gewinnung von PNZ genutzt. Voraussetzung war, dass eine ausreichende Entblutung der Nieren während der Leberperfusion gewährleistet wurde. Die so erhaltenen primären Zellen zeigten Viabilitäten von 70-85%. Die Zellausbeuten lagen bei $2-10 \times 10^6$ Zellen. Der erneute Zuwachs in der Ausbeute dürfte auf eine effektivere Collagenase-Wirkung zurückzuführen sein, da während der Leberperfusion bereits Collagenase-Lösung die Nieren durchspült. Beide Methoden liefern Zellen mit ausreichender Viabilität, im Comet-Assay zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der DNA-Schädigung. Um weniger Tiere für die Zellgewinnung einsetzen zu müssen, bietet sich an, die Nieren nach der Leberperfusion zu verwenden.

Tabelle 18: Ausbeuten und Viabilitäten der PNZ nach der Nierenperfusion

Zentrifugation		Zeitpunkt	Waschlösung	Ausbeute x 10 ⁶	Viabilität [%]
Anzahl	x g				
3	60	vor Trypsin	1. HBSS (kalt), 2.-3. HBSS (kalt) + FKS	0,5-1,5	70-80
3	60	vor Trypsin	1. HBSS (kalt), 2.-3. HBSS + FKS	0,5-2	75-85
4	3 x 60 plus Dichtegradient	Nach Trypsin		<0,5	90-95
2	60	Vor Trypsin	1. HBSS (kalt), 2. HBSS +FKS	1-5	75-90
2	60	Vor Trypsin	1. HBSS (kalt), 2. HBSS	1-5	70-90

5.2 Zytotoxizität

Die Bestimmung von Zytotoxizität ist ein grundlegender Parameter in der in vitro-Toxikologie. Viele Endpunkte werden durch die zytotoxische Wirkung einer Substanz beeinflusst und täuschen so einen spezifischen Effekt vor. Während der Zytotoxizität kommt es unter anderem zu einer Fragmentierung der DNA. Deshalb muss insbesondere bei der Untersuchung von DNA-Schäden darauf geachtet werden, dass unter den Versuchsbedingungen keine starke Zytotoxizität auftritt, da diese zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Die Zytotoxizität, die in Nekrose und Apoptose unterschieden werden kann (s. Kap. 3.3), wurde mit verschiedenen Tests untersucht. Als Maß für Nekrose, mit der ein Verlust der Membranintegrität verbunden ist, wurde die Aufnahme des Farbstoffes Trypanblau über die geschädigte Zellmembran untersucht (Trypanblauausschluss-Test). Unter dem Mikroskop können nekrotische Zellen von lebenden (viablen) Zellen aufgrund der Färbung unterschieden werden, das Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl in % wird als Viabilität bezeichnet. Des Weiteren wurde Nekrose mit einem immunchemischen Test untersucht, der den Austritt von Nukleosomen (DNA-Histon-Komplexe) über die geschädigte Zell- und Kernmembran ins Inkubationsmedium nachweist. Über die Detektion von Nukleosomen wurde auch die Induktion von Apoptose, der sog. Programmierter Zelltod, immunchemisch gemessen. Die Messung erfolgte im Lysat der adhärenenten Zellen, da während der Apoptose die Zellmembran intakt bleibt. Zudem wurde mittels der Durchflusszytometrie durch Annexin V-FITC- und Propidiumiodidfärbung zwischen apoptotischen, nekrotischen und viablen Zellen diskriminiert (s. Kap. 4.2.4.2). Durch Vergleich mit der Kontrolle wurde nach Quantifizierung der Zellen in den einzelnen Populationen die Apoptoseinduktion quantifiziert. Einflüsse auf das Zellwachstum nach 24stündiger Inkubation wurden durch Bestimmung der Gesamtzellzahl und des Gesamtproteins detektiert. Das Gesamtprotein adhärenenten Zellen wurde mittels Färbung mit Sulforhodamin B photometrisch direkt nach der Inkubation mit OTA bestimmt.

5.2.1 Beeinflussung der Viabilität

5.2.1.1 Zelllinien nach Kurzzeitinkubation (1 h)

Die einstündige Inkubation von V79-Zellen und CV-1-Zellen mit OTA führte bis zu Konzentrationen von 1000 $\mu\text{mol/L}$ nicht zu einer Reduktion der Viabilität. Ein leichter Rückgang der Viabilität war nur für die höchste getestete Konzentration (2000 $\mu\text{mol/L}$ OTA) messbar, die Viabilität sank auf Werte von $75,3 \pm 15,6 \%$ für V79-Zellen und $82,3 \pm 11,4 \%$ für CV-1-Zellen (Abbildung 32).

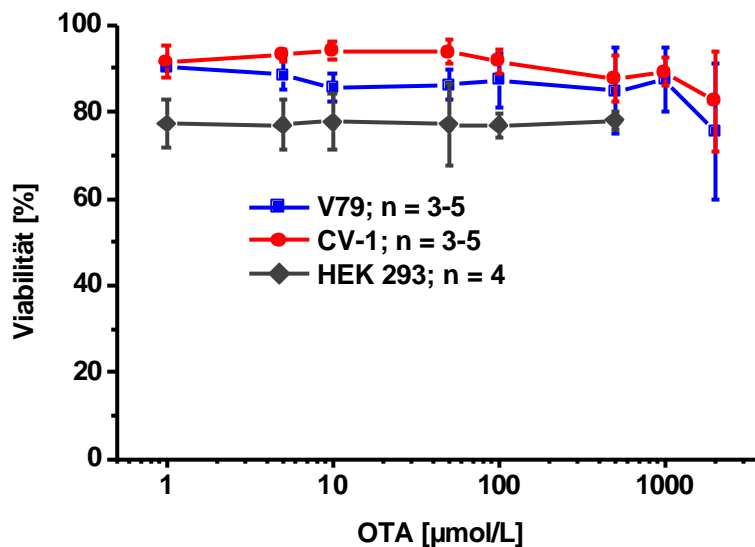


Abbildung 32: Viabilität (Trypanblau-Ausschluss) von Zelllinien nach Inkubation mit OTA (1 h; 1 % DMSO; MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Kontrollen: V79: $93,5 \pm 3,9 \%$; CV-1: $93,0 \pm 5,7 \%$; HEK 293: $79,5 \pm 4,9 \%$.

In HEK 293-Zellen war kein Effekt auf die Viabilität bis 500 $\mu\text{mol/L}$ OTA feststellbar. In den weiteren Untersuchungen wurden die HEK 293-Zellen aufgrund der schwierigeren Handhabung während der Zellkultur nicht mehr eingesetzt. Als Nierenzelllinie wurden CV-1-Zellen weiter verwendet.

5.2.1.2 Zelllinien nach Langzeitinkubation (24 h)

V79-Zellen zeigten nach 24stündiger Einwirkung von OTA im Vergleich zu CV-1-Zellen deutlich stärker eingeschränkte Viabilitäten (Abbildung 33).

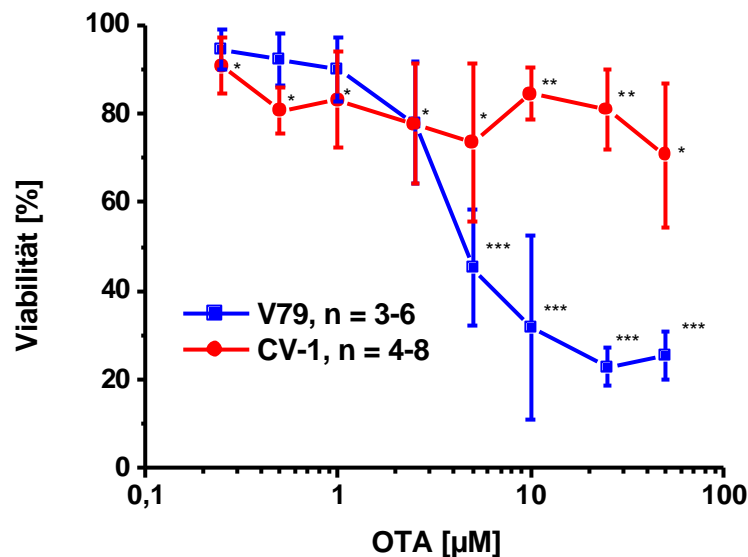


Abbildung 33: Viabilität (Trypanblau-Ausschluss) von Zelllinien nach Inkubation mit OTA (24 h; 0,1 % DMSO; MW ± SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Kontrollen: V79: $92,9 \pm 5,4$ %; CV-1: $92,7 \pm 1,0$ %. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Die Viabilität sank nach Inkubation mit 25 bzw. 50 µmol/L OTA bei V79-Zellen auf $22,8 \pm 3,1$ % bzw. $25,4 \pm 5,2$ %. Durch sigmoidale Regression wurde für V79-Zellen ein EC_{50} -Wert von $3,8 \pm 0,2$ µmol/L bestimmt. CV-1-Zellen waren in ihrer Membranintegrität nahezu unverändert bis zur höchsten eingesetzten Konzentration, die Viabilität nahm leicht ab auf $70,6 \pm 16,1$ %.

5.2.1.3 Primäre Nierenzellen nach Kurzzeitinkubation (1 h)

Aufgrund der Isolierung durch Nierenperfusion wiesen die PNZ schon direkt nach der Gewinnung eine Viabilität von nur ca. 70-85 % auf. Nach einstündiger Inkubation mit 0,1 % DMSO im Schüttelwasserbad ging die Viabilität der Kontrollzellen auf $67,4 \pm 3,7$ % zurück. Die Behandlung mit OTA über eine Stunde hatte relativ zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Viabilität (Abbildung 34). Die höchste getestete Konzentration war $100 \mu\text{mol/L}$.

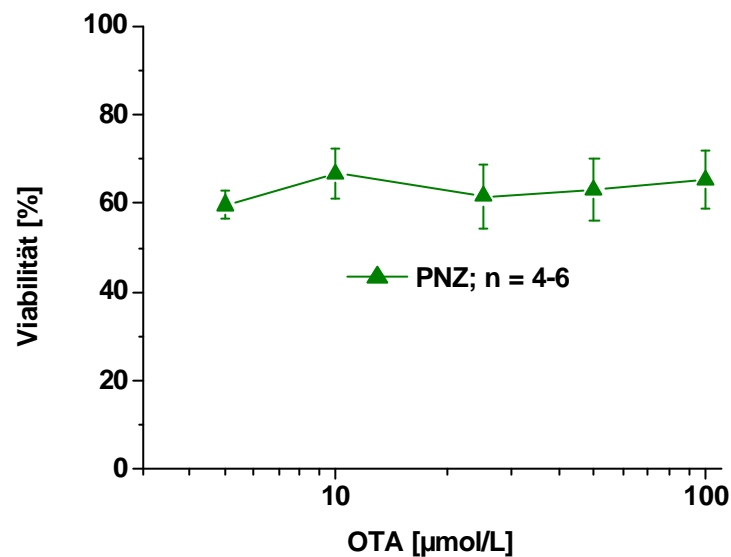


Abbildung 34: Viabilität (Trypanblau-Ausschluss) von PNZ nach Inkubation mit OTA (1 h; 0,1 % DMSO; MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Kontrolle: $67,1 \pm 3,7$ %.

5.2.1.4 Primäre Nierenzellen nach Langzeitinkubation (24 h)

Vor der Inkubation mit OTA für 24 h wurden die PNZ nach der Nierenperfusion in collagenisierte Petrischalen ausgesät und für 24 h vorkultiviert. Die Viabilität der Kontrolle lag nach 24stündiger Inkubation mit $67,7 \pm 17,2$ % in der gleichen Größenordnung wie nach einstündiger Inkubation, zeigte jedoch eine deutlich größere Schwankung. Die Zellzahlen variierten nach der insgesamt 48stündigen Kultur der Zellen sehr stark. Möglicherweise sind die Kulturbedingungen für die primären Zellen nicht optimal, was zu den Schwankungen in der Zellzahl und Viabilität führen könnte. Die Inkubation mit OTA bis zu einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/L}$ für 24 h hatte keinen Einfluss auf die mittlere Viabilität der Zellen (Abbildung 35).

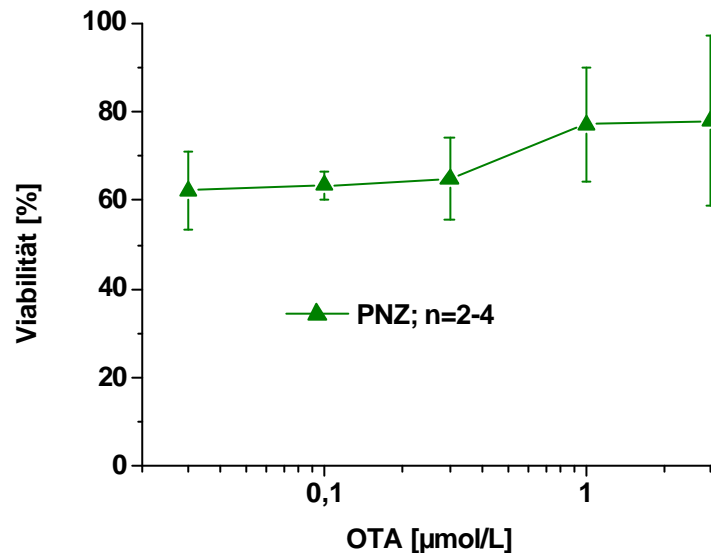


Abbildung 35: Viabilität (Trypanblau-Ausschluss) von PNZ nach Inkubation mit OTA (24 h; 0,1 % DMSO; $\text{MW} \pm \text{SA}$, außer $0,03 \mu\text{mol/L}$: $\text{MW} \pm$ Mittelwertabweichung, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Kontrolle: $67,7 \pm 17,2$ %.

5.2.1.5 Diskussion der Viabilitätsdaten

Nach einstündiger Inkubation war weder in den verwendeten Zelllinien (V79: Hamsterlungenfibroblasten, CV-1: Affennierenzellen, HEK 293: humane embryonale Nierenzellen), noch in PNZ eine Einschränkung der Viabilität messbar. Auch nach einer Inkubationszeit von 24 h zeigten die verwendeten Nierenzellen (PNZ und CV-1) keine nachlassende Membranintegrität. Einzig in V79-Zellen wurde eine deutliche Verringerung der Viabilitäten nach dieser längeren Inkubation beobachtet. Dabei deutet sich für Konzentrationen $> 10 \mu\text{mol/L}$ ein Plateau minimaler Viabilität bei ca. 25 % an.

Auch in der Literatur finden sich deutlich unterschiedliche Ergebnisse (s. Kap. 3.1.7.11.1). Die Unterschiede können auf unterschiedlich empfindliche Zellsysteme und Endpunkte zurückzuführen sein. Offensichtlich bestätigen aber auch die Literaturdaten, dass weder primäre Nierenzellen noch Nierenzelllinien per se erhöhte Sensitivität gegenüber OTA-induzierte Beeinträchtigung der Viabilität zeigen, obwohl die Niere in vivo das Zielorgan v.a. der OTA-Zytotoxizität ist.

5.2.2 Wachstumshemmung

5.2.2.1 Zelllinien

Die Auswertung der Zellzahlen zeigte, dass OTA nach 24 h ohne Nachinkubation in niedrigen, $\mu\text{molaren}$ Konzentrationen effektiv das Wachstum von V79-Zellen und CV-Zellen verminderte (V79: $8,0 \pm 3,3 \%$; CV-1: $11,3 \pm 1,1 \%$; bezogen auf die Kontrolle Abbildung 36). Die Balken geben die relative Zellzahl, bezogen auf die Kontrolle an, der dunkel eingefärbte Teil der Balken die relative Lebendzellzahl, d.h. die Zellen mit intakter Membran. Die Lebendzellzahlen wurden durch Multiplikation der relativen Zellzahl mit der Viabilität erhalten. Mittels sigmoidaler Regression ließen sich folgende IC_{50} -Werte für die Wachstumshemmung errechnen: $1,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$ für V79-Zellen und $2,2 \pm 0,5 \mu\text{mol/L}$ für CV-1-Zellen.

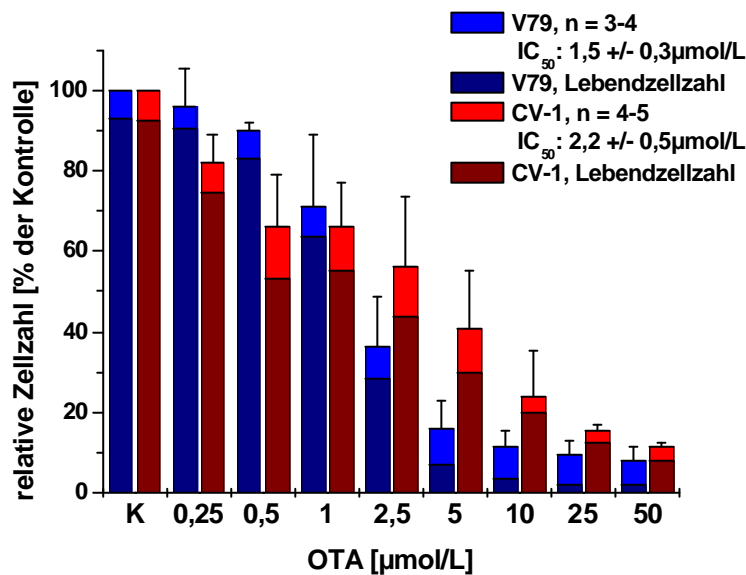


Abbildung 36: Zellzahlen nach 24stündiger Inkubation von V79-Zellen und CV-1-Zellen mit OTA (0,1 % DMSO; MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche), bezogen auf die Kontrolle. IC_{50} -Werte berechnet durch sigmoidale Regressionsanalyse.

Die Wachstumshemmung wurde außerdem mit einem variierten Sulforhodamin-B-Test nach 24stündiger Behandlung ohne Nachinkubation untersucht. Die Fähigkeit von OTA in $\mu\text{molaren}$ Konzentrationen das Zellwachstum in den beiden untersuchten Zelllinien zu hemmen, wurde bestätigt (V79: $26,4 \pm 3,2 \%$; CV-1: $42,4 \pm 2,5 \%$; Abbildung 37), die Hemmung war aber nicht so effektiv, wie bei der Bestimmung der Zellzahlen. Die durch sigmoidale Regression ermittelten IC_{50} -Werte von $1,4 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$ für V79-Zellen und $2,2 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ für CV-1-Zellen stimmen gut mit den der relativen Zellzahlen überein. OTA ist also in der Lage, im niedrigen $\mu\text{molaren}$ Konzentrationen Wachstum von Zellen effektiv zu hemmen.

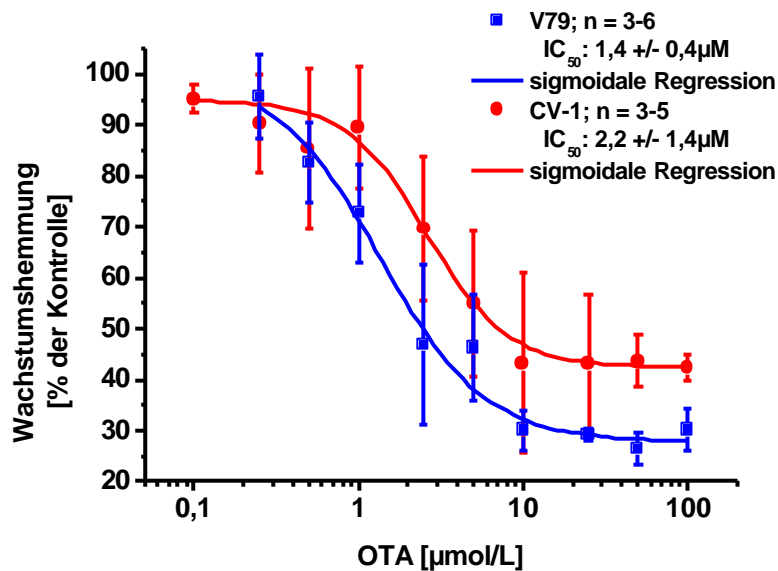


Abbildung 37: Proteinbestimmung (SRB) nach 24stündiger Inkubation von V79-Zellen und CV-1-Zellen mit OTA (0,1 % DMSO; MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche), bezogen auf die Kontrolle. IC_{50} -Werte berechnet durch sigmoidale Regressionsanalyse.

5.2.2.2 Primäre Nierenzellen

In Abbildung 38 sind die relativen Zellzahlen (bezogen auf die Kontrolle) nach der 24 h Inkubation von PNZ mit OTA dargestellt. Die Zellzahlen nahmen bis auf Werte von $42,0 \pm 12,5$ % bei $3 \mu\text{mol/L}$ OTA ab.

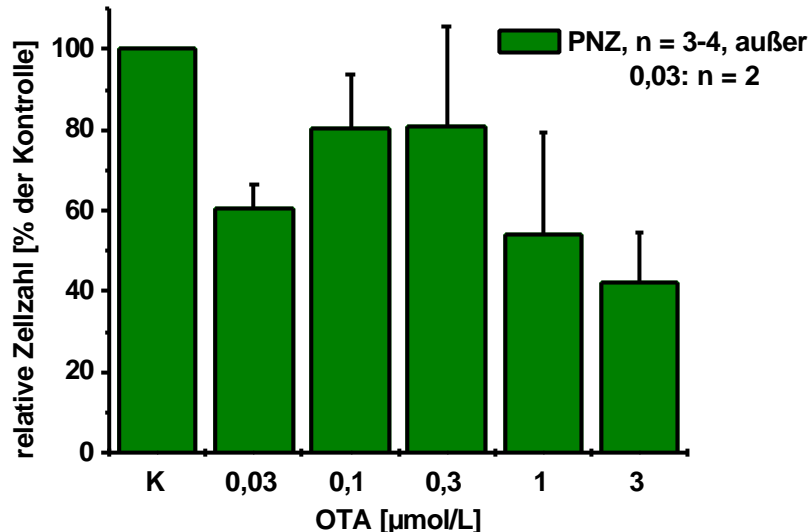


Abbildung 38: Zellzahlen nach 24stündiger Inkubation PNZ mit OTA (0,1 % DMSO; $\text{MW} \pm \text{SA}$, außer $0,03 \mu\text{mol/L}$: $\text{MW} \pm$ Mittelwertabweichung, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche), bezogen auf die Kontrolle.

Bei $0,03 \mu\text{mol/L}$ OTA wurden nur 2 unabhängige Messwerte erhoben, deren Mittelwert bei ca. 60 % lag. Dieser Wert kommt möglicherweise durch die sehr starken Schwankungen der Zellzahlen nach der insgesamt 48stündigen Kultur der Zellen zustande. Eine schwache Proliferation der PNZ wurde in der Kultur anhand der Bildung von Kolonien beobachtet, jedoch nicht in gleichem Maße an den unterschiedlichen Versuchstagen. Die Kulturbedingungen sind möglicherweise nicht ausreichend, um ein konstantes Wachstum zu sichern. Zudem haften die Zellen, evtl. in Abhängigkeit von Schwankungen bei der Isolierung, unterschiedlich gut an der collagenierten Petrischale an, was zu den Schwankungen in Zellzahl und Viabilität (s. Kap. 5.2.1.4) führen könnte.

5.2.2.3 Diskussion der Wachstumshemmung

Für V79- und CV-1-Zellen wurden unabhängig von der Messmethode (Zellzahl bzw. Proteinfärbung) für die Wachstumshemmung IC_{50} -Werte in gleicher Größenordnung gefunden (V79: $1,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$; CV-1: $2,2 \pm 0,5 \mu\text{mol/L}$ bzw. V79: $1,4 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$; CV-1 $2,2 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$). Da sich IC_{50} -Werte und Kurvenverläufe nicht nennenswert für die beiden Messmethoden unterscheiden, ist davon auszugehen, dass der Proteingehalt pro Zelle nicht wesentlich verändert war. Dies wurde durch Vergleich der Zellzahlen mit deren Proteingehalt (bestimmt nach Bradford) bestätigt. Somit scheint die für OTA in der Literatur beschriebene Proteinbiosynthesehemmung (s. Kap. 3.1.7.13) direkt zu einer Wachstumshemmung und nicht zu Zellpopulationen mit vermindertem Proteingehalt zu führen.

In diversen eukaryontischen Zellsystemen wurde die Wachstums- und Proteinsynthesehemmung untersucht, ein einheitliches Bild zeichnet sich dabei, wie bei der Beeinflussung der Viabilität auch, nicht ab (s. Kap. 3.1.7.11.2).

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Wachstumshemmung ist mit den Daten aus der Literatur vergleichbar unter Berücksichtigung der Tatsache, dass FKS, die OTA-Toxizität herabsetzt. Nach Behandlung von PNZ mit OTA wurden sehr starke Schwankungen der Zellzahlen nach der insgesamt 48stündigen Kultur der Zellen bestimmt. Eine schwache Proliferation der PNZ wurde beobachtet, die jedoch an den unterschiedlichen Versuchstagen nicht in gleichem Maße vorhanden war. Die Kulturbedingungen sind möglicherweise nicht ausreichend, um ein konstantes Wachstum zu sichern. Zudem waren die Zellen durch Schwankungen bei der Isolierung unterschiedlich stark geschädigt und wuchsen so unterschiedlich gut in der collagenierten Petrischale an, was möglicherweise zu den Schwankungen in der Zellzahl und Viabilität (s. Kap. 5.2.1.4, 5.2.2.2) führte.

5.2.3 Induktion von Apoptose

5.2.3.1 Immunchemischer Test

5.2.3.1.1 CV-1-Zellen nach Kurzzeitinkubation (4 h)

Mit einem sog. „sandwich-ELISA“-Test, der mit Hilfe von zwei Antikörpern Nukleosomen nachweist, wurde die Induktion von Apoptose durch OTA nach 4 h gemessen. Das Maß für die Apoptose ist hierbei die Anreicherung von Nukleosomen aus dem Lysat der adhärennten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. 100 $\mu\text{mol/L}$ OTA induzierte in gleichem Maße Apoptose wie die Positivkontrolle Camptothecin bei 2 $\mu\text{g/mL}$. Nukleosomen wurden dabei ca. dreifach im Vergleich zur Kontrolle angereichert (Abbildung 39).

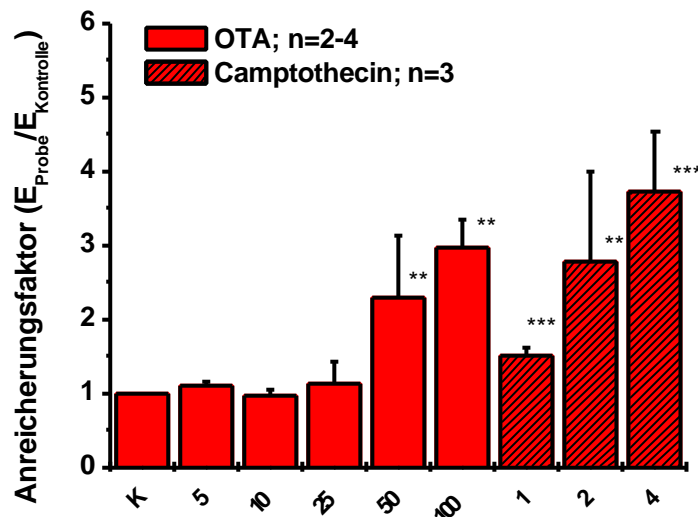


Abbildung 39: Induktion von Apoptose (Cell Death Detection ELISA[®] plus, Roche) nach Inkubation mit OTA (4 h; 0,1 % DMSO; MW \pm SA, außer 5 und 25 $\mu\text{mol/L}$ OTA: MW \pm Mittelwertabweichung, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

5.2.3.1.2 CV-1-Zellen nach 24 h Inkubation

Eine bis ca. vierfache Anreicherung der Nucleosomen wurde nach 24stündiger Inkubation ab 10 $\mu\text{mol/L}$ OTA beobachtet. Die Induktion der Apoptose war vergleichbar mit der durch 1 $\mu\text{g/mL}$ Camptothecin (Abbildung 40). Eine beginnende Induktion der Apoptose wurde bereits ab 2,5 $\mu\text{mol/L}$ OTA gemessen, also in dem Konzentrationsbereich, in dem der IC_{50} -Wert der Wachstumshemmung bei CV-1-Zellen liegt (s. Kap. 5.2.2).

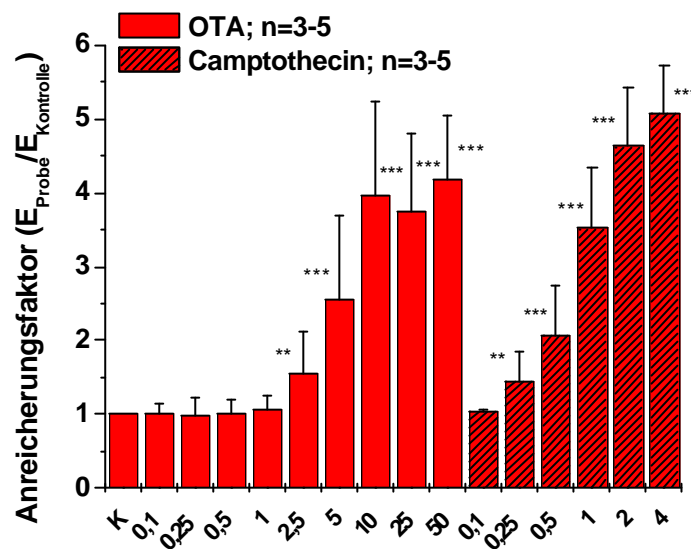


Abbildung 40: Induktion von Apoptose (Cell Death Detection ELISA[®] plus, Roche) nach Inkubation mit OTA (24 h; 0,1 % DMSO; MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche).
 : $p < 0,01$, *: $p < 0,001$

5.2.3.2 Durchflusszytometrie

Nach Annexin V/FITC- und Propidiumiodid-Färbung der über 24 h inkubierten CV-1-Zellen ließen sich mit der Durchflusszytometrie apoptotische, spät-apoptotische und nekrotische Zellen von viablen Zellen unterscheiden. In der Kontrollpopulation befinden sich nach der Präparation ca. 85 % viable Zellen, ca. 1 % apoptotische und 8% spät-apoptotische Zellen, die Annexin V/FITC-positiv sind sowie ca. 5 % nekrotische Zellen (Abbildung 41). Dieser Befund für die Nekrose deckt sich mit den parallel bestimmten Daten aus der Viabilitätsbestimmung mit dem Trypanblauausschluss-Test. Da die Zellernte hier nach Trypsinbehandlung durch Abschaben erfolgt, sind die Viabilitäten der Kontrollzellen mit ca. 85-90 % etwas niedriger als nach der Zellernte ausschließlich durch Trypsinieren (s. Kap. 5.2.1.2).

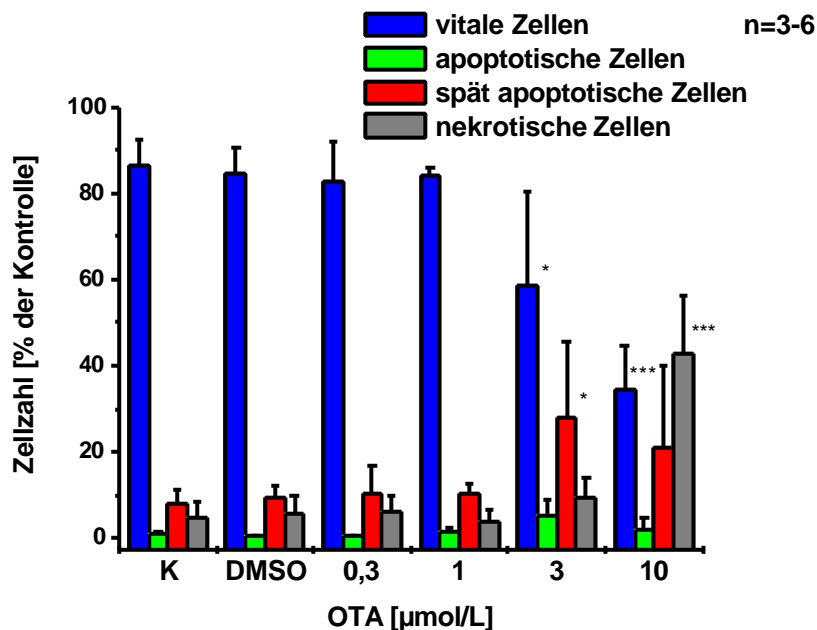


Abbildung 41: Quantitative Darstellung der viablen, apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen (Durchflusszytometrie, Annexin-V/FITC- und Propidiumiodidfärbung) nach 24 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche).

*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$

Bei einer Konzentration von 3 µmol/L OTA war eine Abnahme der viablen Zellen ($58,5 \pm 21,6$ %) bei gleichzeitiger Zunahme der apoptotischen ($5,0 \pm 4,0$ %),

spät-apoptotischen ($28,0 \pm 17,6$ %) und nekrotischen Zellen ($9,2 \pm 4,8$ %) zu sehen. Bei $10 \mu\text{mol/L}$ OTA nahm der Anteil der nekrotischen Zellen sehr stark zu ($42,8 \pm 13,5$ %), der Anteil der apoptotischen und spät-apoptotischen Zellen hingegen ging wieder etwas zurück ($2,0 \pm 3,0$ % bzw. $20,9 \pm 19,1$ %). Bei diesen hohen Konzentrationen waren nur noch $34,3 \pm 10,3$ % vitale Zellen vorhanden.

5.2.3.3 Diskussion der Apoptoseinduktion

Schon nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurde mit dem Cell Death Detection ELISA[®] plus eine erhöhte Anzahl von Nukleosomen im Lysat von CV-1-Zellen ab OTA-Konzentrationen von $50 \mu\text{mol/L}$ gemessen. Das Auftreten dieser Nukleosomen ist auf die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen zurückzuführen. Endonukleasen werden während der Apoptose aktiviert, die von ihnen durchgeführte Reaktion kann also als Hinweis auf Apoptoseinduktion interpretiert werden. Eine Fragmentierung der DNA kommt auch im Verlauf nekrotischer Prozesse zustande, in diesem Fall ist allerdings der Nachweis von Nukleosomen dann auch im Kulturmedium möglich. Ein Auftreten von Nukleosomen ausschließlich im Zelllysate ist deshalb auf Apoptose zurückzuführen. Ein erhöhtes Auftreten von Nukleosomen in Zelllysaten wurde auch nach 24stündiger Inkubation mit OTA detektiert. Konzentrationen ab $2,5 \mu\text{mol/L}$ induzierten dabei die DNA-Fragmentierung.

Mittels der Durchflusszytometrie nach Annexin V/FITC- und Propidiumiodid-Färbung von CV-1-Zellen wurde die Induktion von Apoptose nach 24stündiger Inkubation bestätigt. Eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen trat ab $3 \mu\text{mol/L}$ OTA auf, ebenso eine erhöhte Zahl spät-apoptotischer Zellen. Spät-apoptotische (oder auch sekundär-nekrotische) Zellen zeigen Merkmale der Apoptose (Phosphatidylserin auf der Zellaußenseite) und nekrotische Eigenschaften (verringerte Membranintegrität) und treten als Folge von Apoptose in relativ späten Phasen des Apoptose-Prozesses auf. Nach Inkubationen mit Konzentrationen $\geq 3 \mu\text{mol/L}$ OTA nahm auch die Population nekrotischer Zellen deutlich zu. Dies kann auf die Zytotoxizität von OTA zurückgeführt werden (s. Kap. 5.2.1). Der Anteil an Zellen, die eine verringerte Membranintegrität (Propidiumiodid-positiv) aufweisen, ist allerdings bei dieser Messmethode größer ($10 \mu\text{mol/L}$: 40 %), als die Anzahl nekrotischer Zellen, die mit dem Trypanblauausschluss-Test identifiziert wurden ($10 \mu\text{mol/L}$: 20 %). Dies könnte auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Farbstoffe (z.B. Membrangängigkeit), auf die Unterschiede in der Inkubationszeit mit

den Farbstoffen (Propidiumiodid: 15 min, Trypanblau: direkte Auswertung nach Anfärbung) oder eine höhere Empfindlichkeit in der Erfassung der Zellen bei der durchflusszytometrischen Bestimmung sein. Zudem müssen bei der Quantifizierung der Zellzahlen in der Durchflusszytometrie anhand von Kontrollen Bereiche (sog. „gates“) festgelegt werden, deren Zellen als viabel, nekrotisch, apoptotisch und spät-apoptotisch bewertet werden. Wird der Bereich für die viablen Zellen zu eng gefasst, kann auch hierdurch zu einer erhöhten Anzahl nekrotischer Zellen kommen. (s. Kap. 4.2.4.2)

In der Literatur ist die Induktion von Apoptose durch OTA für verschiedene in vitro Zellsysteme beschrieben. Die Konzentrationen, die dabei eingesetzt wurden, schwanken sehr stark in Abhängigkeit der untersuchten Zellsysteme und der betrachteten Endpunkte. In einer Nierenzelllinie humanen Ursprungs (IHKE) wurde nach 24stündiger Inkubation mit 10-300 nmol/L OTA die Induktion der Caspase-3-Aktivität als wichtiges Schlüsselenzym in der Apoptose-Signalkaskade beobachtet. Chromatinkondensation, als morphologischer Parameter der Apoptose, wurde ab 30 nmol/L OTA (24 h) beobachtet, DNA-Fragmentierung („DNA-laddering“) Konzentrationen von 10-100 nmol/L OTA (24 h). Die Aktivierung der Caspase-3 wurde auch nach längeren Inkubationszeiten (72 h, 7 d) detektiert [Schwerdt et al., 1999b]. Die Autoren gaben allerdings keine Auskunft über die Caspase-Aktivierung in der Kontrolle, sondern nur die relative Aktivität im Vergleich zur Kontrolle an. Da die Inkubation unter serumfreien Bedingungen erfolgte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Inkubationsbedingungen die Caspase schon aktiviert wird. Es ist also keine Interpretation der Ergebnisse aus den Langzeitinkubationen hinsichtlich ihrer Relevanz möglich.

Auch in anderen Nierenzelllinien wurde die Caspase-3-Aktivierung untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde in OK- (Opossum) und in MDCK-C7-Zellen (Kaninchen) ab 100 nmol/L OTA eine erhöhte Aktivität der Caspase-3 gemessen [Schwerdt et al., 1999b]. In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe wurden nach Inkubation mit 1 µmol/L OTA für 12 h in MDCK-C7-Zellen Komponenten der MAP-Kinase-Kaskade aktiviert (ERK1, ERK2 und JNK). Die Aktivierung dieser Kinasen kann zur Induktion der Apoptose in der Zelle führen [Gekle et al., 2000]. Nach 24stündiger Inkubation mit 0,1 µmol/L OTA wurde außerdem DNA-Fragmentierung in MDCK-C7-Zellen beobachtet. Auch in COS-Zellen wurde die Induktion der Caspase-3-Aktivität und apoptose-relevanter Signalwege beobachtet [Scibelli et al., 2003]. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nierenzelllinie CV-1 liegen keine Daten vor.

Als Ursache für Apoptose werden auch mitochondriale Störungen diskutiert. Die Störung der mitochondrialen Atmung durch OTA wurde in isolierten proximalen Tubuli der Ratte 15 bzw. 30 min nach Inkubation mit 1mmol/L OTA gezeigt [Aleo et al., 1991]. Die Inkubation von HeLa-Zellen (Epithel, Mensch) mit 20 µg/ml OTA (\equiv 50 µmol/L) für 24 bzw. 48 h führte zur Bildung apoptotischer Körperchen. Eine neunstündige Inkubation von HaK-Zellen (Hamster, Niere) mit der gleichen Konzentration führte zu DNA-Fragmentierung [Seegers et al., 1994]. OTA-induzierte DNA-Fragmentierung konnte auch mit der humanen Leukämiezelllinie HL-60 gezeigt werden [Ueno et al., 1995].

Auch in Ratten wurde die Induktion von Apoptose in Nierenzellen untersucht, die Ergebnisse waren aber widersprüchlich. Die orale Behandlung von Wistar-Ratten mit 120 µg/kg KG/d OTA führte nach zehn Tagen zu einem fünffachen Anstieg der apoptotischen Zellen, nach 30 Tagen zu einem 6,4fachen, nach 60 Tagen 12,7fachen Anstieg, detektiert mit dem TUNEL-Test [Petrik et al., 2003]. Mantle et al., [1998] hingegen beobachteten mit einem Färbetest keine Apoptoseinduktion im Nierengewebe von behandelten Ratten (800 µg/Tier, 5 Tage über Futter). Es ist unklar, ob die Autoren die Aufnahme der OTA-Dosis sicherstellten.

Die Konzentrationen, durch die in CV-1-Zellen Apoptose induziert wurde liegt im Bereich der Literaturdaten.

5.2.4 Modulation der Zytotoxizität durch Trolox

In der Literatur ist beschrieben, dass OTA in verschiedenen Testsystemen oxidativen Stress induziert (s. Kap. 3.1.7.10). Unter Verwendung der Durchflusszytometrie nach Annexin V/FITC- und Propidiumiodid-Färbung sollte untersucht werden, ob die Zytotoxizität von OTA in CV-1-Zellen durch das Antioxidans Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat, moduliert werden kann.

Bei paralleler Inkubation mit Trolox (10 mol/L) und OTA wurde kein protektiver Effekt durch das Antioxidans beobachtet (Abbildung 42). Während durch Trolox alleine im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung der Zellpopulationen gemessen wurde, zeigte sich bei der Inkubation mit beiden Substanzen sogar eine leichte Verstärkung der OTA-induzierten Wirkung. Die gemessene Zellverteilung bei 10 µmol/L OTA ohne Trolox weicht von der unter 5.2.3.2 mit dem gleichen Test Erhaltenen ab, zeigte aber große Schwankungen, so dass dies nicht im Widerspruch zu den oben beschriebenen Ergebnissen steht.

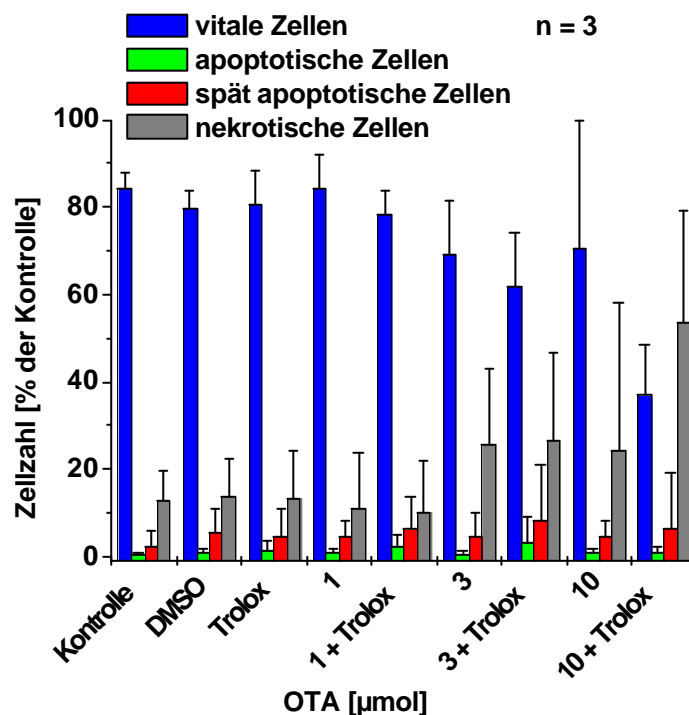


Abbildung 42: Quantitative Darstellung der viablen, apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen (Durchflusszytometrie, Annexin-V/FITC- und Propidiumiodidfärbung) nach 24stündiger paralleler Inkubation von CV-1-Zellen mit OTA und 10 µmol/L Trolox (0,1 % DMSO, MW ± SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche).

In einem weiteren Experiment wurden die CV-1-Zellen zunächst 24 h mit Trolox (10-100 $\mu\text{mol/L}$) und anschließend 24 h mit 1-3 $\mu\text{mol/L}$ OTA inkubiert. Wie Abbildung 43 zeigt, wurde kein Einfluss von Trolox auf die OTA-induzierten Wirkungen festgestellt.

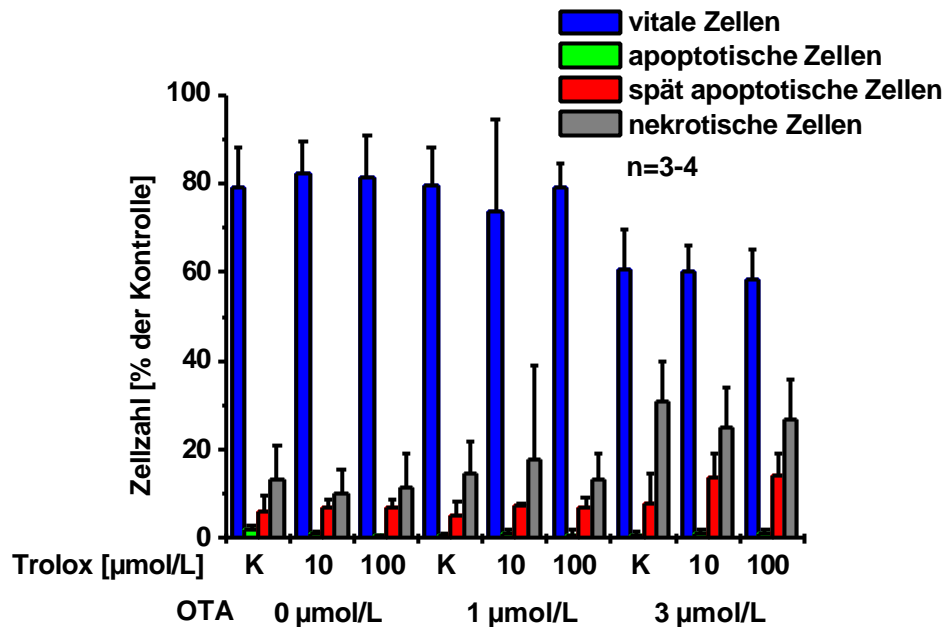


Abbildung 43: Quantitative Darstellung der viablen, apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen (Durchflusszytometrie, Annexin-V/FITC- und Propidiumiodidfärbung) nach 24stündiger Inkubation mit 10-100 $\mu\text{mol/L}$ Trolox und anschließender 24stündiger Inkubation mit 1-3 $\mu\text{mol/L}$ OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche).

5.2.5 Diskussion der Zytotoxizität

OTA zeigte in Kurzzeitinkubations-Experimenten (1 h) kein Potenzial, die Viabilität von Zelllinien und PNZ zu verringern. Dies steht im Einklang mit Literaturdaten [Braunberg et al., 1992]. Nach 24stündiger Inkubation war die Membranintegrität (Trypanblauausschluss) der untersuchten Nierenzellen (CV-1, PNZ) ebenfalls nicht beeinträchtigt, wohl aber die in V79-Zellen. Mittels der Durchflusszytometrie nach Propidiumiodidfärbung wurde für OTA-Konzentrationen $\geq 3 \mu\text{mol/L}$ OTA eine Induktion der Nekrose gemessen, was auf Unterschiede in den Testmethoden zurückzuführen sein könnte. In der Literatur wurde die Fähigkeit von OTA, die Viabilität in Zellen nach 24stündiger Inkubation zu reduzieren, gezeigt (s. Kap. 5.2.1.5).

Eine starke Wachstumshemmung mit IC_{50} -Werten um $2 \mu\text{mol/L}$ wurde in beiden verwendeten Zelllinien gemessen. Über diesen Effekt wurde in zahlreichen Publikationen berichtet, die publizierten IC_{50} -Werte liegen zwischen 7 und $15 \mu\text{mol/L}$ nach

24stündiger Inkubation. Allerdings wurden die Versuche teilweise in Gegenwart von FKS durchgeführt, welches die Toxizität von OTA durch Bindung herabsetzt [Dietrich et al., 2001]. Nach noch längerer Inkubationszeit sind auch deutlich niedrigere IC₅₀-Werte beschrieben worden (s. Kap. 5.2.2.3).

Bei Konzentrationen über 1 µmol/L OTA (24 h) wurde mittels eines immunchemischen Tests die Induktion von Apoptose beobachtet. Die Apoptoseinduktion wurde mit der Durchflusszytometrie nach Färbung der Zellen mit Annexin V/FITC bestätigt. Auch in der Literatur ist die OTA-abhängige Induktion von Apoptose mit unterschiedlichen Testsystemen gezeigt worden. Die beschriebenen Systeme waren teilweise deutlich empfindlicher, als die CV-1-Zellen in Kombination mit dem ELISA-Test oder der Durchflusszytometrie (s. Kap. 5.2.3.3).

Die in CV-1-Zellen beobachteten Parameter für Zytotoxizität (Nekrose, Apoptose, Wachstumshemmung) zeigen, dass die Effekte in einem relativ eng begrenzten Konzentrationsbereich zu beobachten sind. Dies konnte mit den Daten aus der durchflusszytometrischen Bestimmung bestätigt werden. Die Effekte treten also parallel auf, woraus gefolgert werden kann, dass OTA nicht spezifisch Nekrose oder Apoptose auslöst, sondern dass beide Mechanismen gemeinsam der Zytotoxizität von OTA zugrunde liegen. Diskutiert werden als solche sekundären Mechanismen z.B. die Induktion von oxidativem Stress und (oxidativer) DNA-Schädigung.

In der Literatur gibt es keine vergleichenden Untersuchungen von Apoptose und Nekrose unter identischen Versuchsbedingungen. In einer Studie wurde die DNA-Fragmentierung als Parameter für Apoptoseinduktion mit der LDH-Freisetzung als Parameter für Membranintegrität korreliert. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Fragmentierung infolge von Apoptose und nicht infolge von Nekrose zustande kam, stellten allerdings die Daten zur LDH-Freisetzung nicht dar [Gekle et al., 2000]. Ein paralleles Auftreten von Nekrose und Apoptose kann demnach nicht ausgeschlossen werden.

5.3 Induktion (oxidativer) DNA-Schädigung

5.3.1 Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus dem Comet-Assay werden in Säulendiagrammen dargestellt (Abbildung 44):

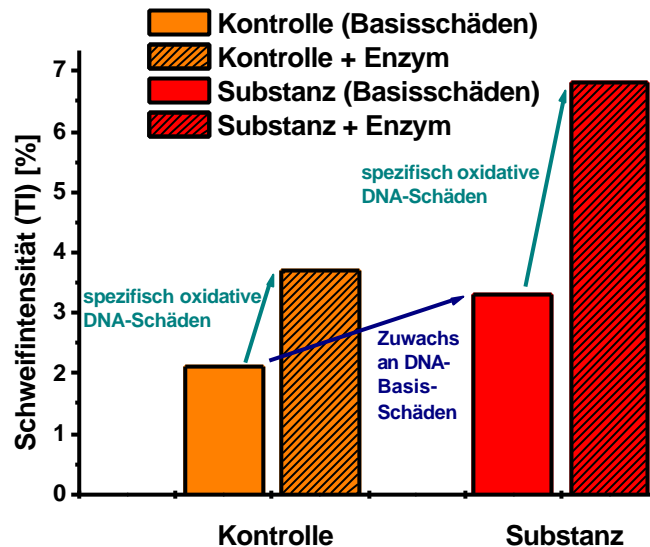


Abbildung 44: Beispiel für die Darstellung eines Ergebnisses aus dem Comet-Assay: Schweifintensitäten [%] als Säulendiagramm

Die gemessenen Strangbrüche ohne Enzymbehandlung, ausgedrückt als Schweifintensität („tail intensity“, TI), werden als Basisschäden bezeichnet. Durch Subtraktion Schweifintensitäten der Kontrolle von den Schweifintensitäten nach Substanzinkubation kann man den Zuwachs an Basisschäden berechnen und darstellen. Durch die Behandlung mit Reparaturenzymen (z.B. FPG, Endo III) werden spezifisch an Stellen in der DNA mit oxidierten DNA-Basen zusätzliche Strangbrüche in der DNA eingeführt, was zu einer größeren Schweifintensität führt (schraffierte Balken). Die Differenz zwischen Basisschäden und Schäden nach Enzymbehandlung wird als spezifischer oxidativer DNA-Schaden interpretiert. Durch diese Differenzbildung für alle Inkubationsbedingungen erhält man für jede Bedingung den spezifischen oxidativen DNA-Schaden (Δ TI). Dessen Zuwachs in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration kann wiederum nach Abzug der spezifischen oxidativen DNA-Schäden der Kontrolle von denen der Substanzinkubationen dargestellt werden.

5.3.2 DNA-Schädigung in Zelllinien

5.3.2.1 Zelllinien nach 1 h Inkubation

Abbildung 45 zeigt die Schweifintensitäten nach einstündiger Inkubation in Abhängigkeit der OTA-Konzentration. Eine Tendenz für eine Erhöhung der Basischäden ist erst ab 1000 $\mu\text{mol/L}$ OTA zu erkennen (s.a. Abbildung 46). Eine deutliche Zunahme an oxidativen DNA-Schäden ist für V79-Zellen ab 2000 $\mu\text{mol/L}$ OTA, für CV-1-Zellen ab 500 $\mu\text{mol/L}$ OTA zu sehen (Abbildung 45). Die spezifischen oxidativen DNA-Schäden erreichen nach Inkubation mit 2000 $\mu\text{mol/L}$ OTA Werte von $7,1 \pm 8,9 \%$ (V79) und $10,9 \pm 7,8 \%$ (CV-1), unterliegen aber sehr großen Schwankungen (Abbildung 47). Bei Konzentrationen $<500 \mu\text{mol/L}$ OTA waren keine erhöhten Schäden detektierbar.

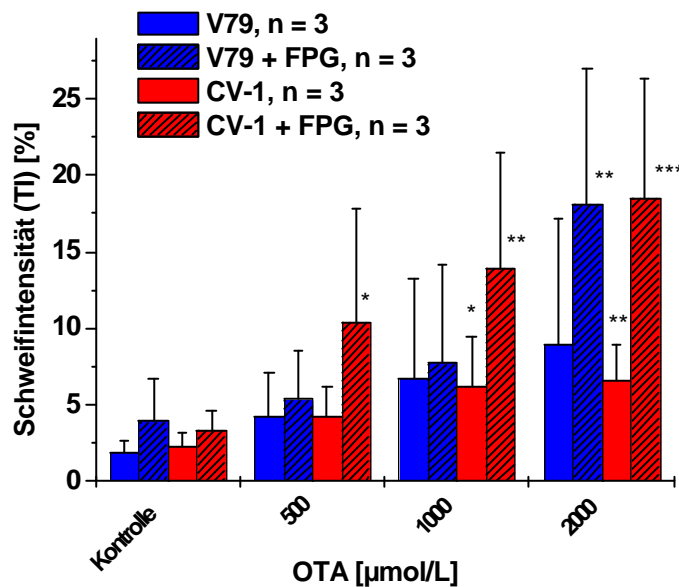


Abbildung 45: Schweifintensitäten in Zelllinien (Comet-Assay) nach 1 h Inkubation mit OTA (1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

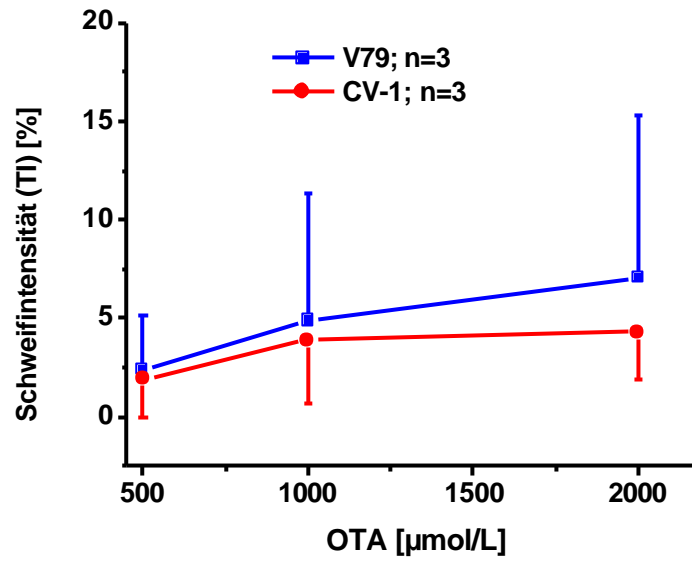


Abbildung 46: Zunahme der Basisschäden in Zelllinien (Comet-Assay) nach 1 h Inkubation mit OTA (1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Differenz der Basisschäden zwischen Kontrolle und Substanzkonzentrationen.

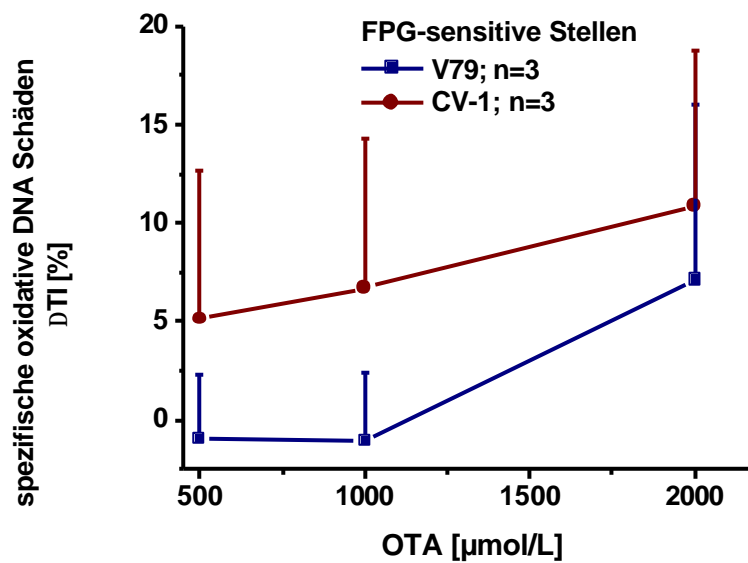


Abbildung 47: Zunahme der spezifischen oxidativen DNA-Schäden in Zelllinien (Comet-Assay) nach 1 h Inkubation mit OTA (1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Differenz der Schäden zwischen Substanzkonzentrationen und Kontrolle.

5.3.2.2 Zelllinien nach 24 h Inkubation

In Abbildung 48 ist zu sehen, dass OTA nach 24stündiger Inkubation in der Lage ist, im sehr niedrigen $\mu\text{molaren}$ Konzentrationsbereich DNA-Schäden zu induzieren. Ein leichter Anstieg der Basisschäden war nur für V79-Zellen ab $0,5 \mu\text{mol/L}$ OTA zu erkennen (s.a. Abbildung 49). Ein leichter Anstieg der spezifischen oxidativen Schäden wurde ab $0,25 \mu\text{mol/L}$ OTA beobachtet (Abbildung 50). Für kleinere Konzentrationen wurden keine Induktion von DNA-Strangbrüchen oder oxidativen Schäden detektiert. Es fällt auf, dass für Konzentrationen $\geq 2,5 \mu\text{mol/L}$ die gemessenen Schäden wieder abnehmen. Möglicherweise zeichnet sich die bei diesen (über dem IC_{50} -Wert für die Wachstumshemmung liegende) Konzentrationen noch vorhandene Zellpopulation durch besondere Resistenz gegenüber der Induktion von DNA-Schäden aus.

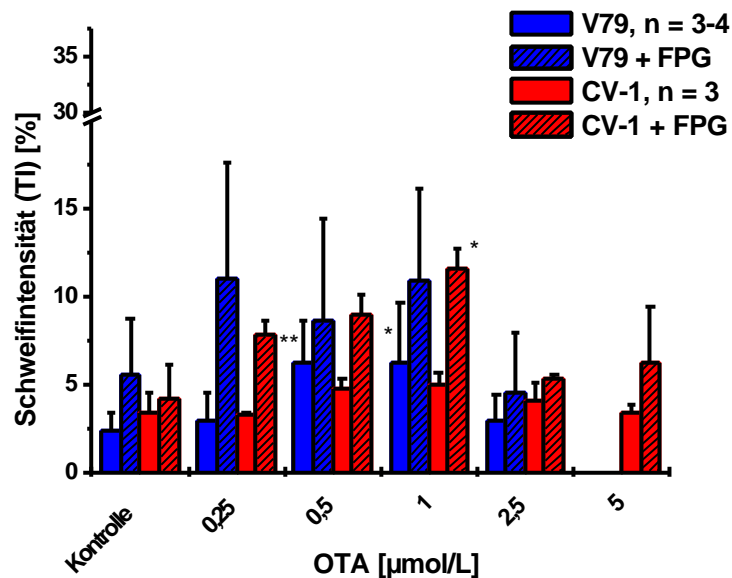


Abbildung 48: Schweifintensitäten in Zelllinien (Comet-Assay) nach 24 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$

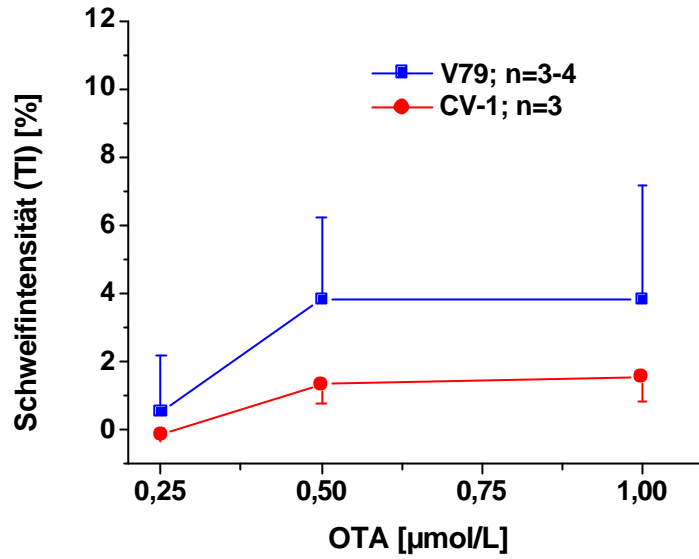


Abbildung 49: Zunahme der Basisschäden in Zelllinien (Comet-Assay) nach 24 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW ± SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Differenz der Basisschäden zwischen Kontrolle und Substanzkonzentrationen.

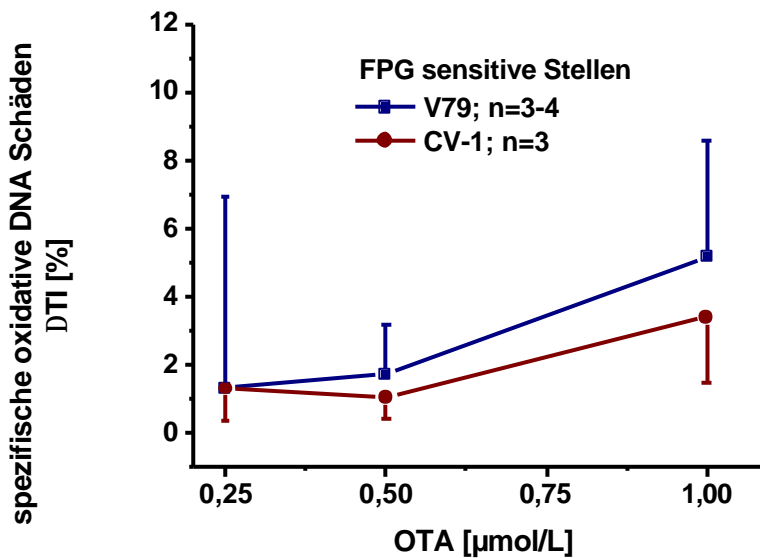


Abbildung 50: Zunahme der spezifischen oxidativen DNA-Schäden in Zelllinien (Comet-Assay) nach 24 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW ± SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Differenz der Schäden zwischen Kontrolle und Substanzkonzentrationen.

5.3.2.3 Diskussion der DNA-Schäden in Zelllinien

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde waren die Basisschäden in V79- und CV-1-Zellen konzentrationsabhängig ab 500 µmol/L OTA erhöht. Die Inkubation mit OTA ab 0,25 µmol/L über 24 h führte in V79-Zellen zu einer vergleichbaren Basisschädigung, bei CV-1-Zellen waren die Basisschäden im gleichen Konzentrationsbereich nicht erhöht.

In der Literatur gibt es wenige Arbeiten, die eine Induktion von DNA-Strangbrüchen (Basisschäden) durch OTA an Zelllinien untersuchten. In MDCK-Zellen (Niere, Kaninchen) wurde die Induktion von Strangbrüchen mit dem Comet-Assay nachgewiesen. Nach Inkubation von MDCK-Zellen mit 100 µmol/L fanden die Autoren eine maximale Schweiflänge nach 3 h, danach nahm die Schädigung wieder ab. Bereits nach Inkubation mit 0,1 µmol/L OTA über drei Stunden wurde eine schwache, aber signifikante Vergrößerung der Schweiflänge beobachtet [Lebrun & Föllmann, 2002]. Die Daten sind nicht direkt mit denen aus dieser Arbeit vergleichbar, da in der zitierten Studie die Elektrophorese über 30 min statt wie in dieser Arbeit über 20 min durchgeführt wurde. Arbeiten in unserer Gruppe zeigten allerdings, dass eine Verlängerung der Elektrophoresezeit zu einer überproportionalen Zunahme der Schweifintensitäten führt [Müller, 2003]. Eigene Vorversuche mit CV-1-Zellen erbrachten keine Hinweise auf die Induktion von Strangbrüchen nach vierstündiger Inkubation mit OTA-Konzentrationen bis zu 100 µmol/L.

Nach zweistündiger Inkubation von CHO-Zellen mit 125 µmol/L OTA wurde eine leicht erhöhte Rate an Schwesterchromatid-Austauschen beobachtet [Boorman et al., 1989].

Die Induktion oxidativer DNA-Schädigungen durch OTA war nach 1 h in V79-Zellen erst bei Inkubation mit 2000 µmol/L OTA detektierbar, in CV-1-Zellen schon ab einer Konzentration von 500 µmol/L. Nach 24stündiger Inkubation führten in beiden untersuchten Zelllinien Konzentrationen von 0,5 und 1 µmol/L OTA zu einer erhöhten Rate oxidativer DNA-Schäden.

In nur einer publizierten Arbeit wurde die Induktion oxidativer DNA-Schäden in LLC-PK1-Zellen untersucht. Eine Inkubation mit 15 µmol/L OTA für 24 h führte dabei zu einer Bildung von 8-OH-dG, das mit einer qualitativen Methode (Biotrin OxyDNA assay, Biotrin, Dublin, Ireland) bestimmt wurde [Schaaf et al., 2002]. Die Autoren machten keine Angaben darüber, ob die Inkubation serumfrei erfolgte, so dass ein direkter Vergleich der verwendeten OTA-Konzentrationen nicht möglich ist.

5.3.3 DNA-Schädigung in primären Nierenzellen

5.3.3.1 Primäre Nierenzellen nach 1 h Inkubation

PNZ, die eine Stunde mit 0,1 % DMSO behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen ohne Lösungsmittelinkubation eine vergleichbare Induktion von oxidativen DNA-Schäden (Abbildung 51). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in der Basisschädigung dürften als Ursache die geringe Zahl unabhängiger Versuche bei der Inkubation ohne Lösungsmittel haben. In beiden Populationen zeigten sich mehr Endo III-sensitive Stellen als FPG-sensitive Stellen. Wie Abbildung 52 zeigt, führte die Inkubation mit OTA nicht zu einer Zunahme der Basisschäden. Im Vergleich zur Kontrolle zeigen die beiden niedrigen Substanzkonzentrationen (5 und 10 $\mu\text{mol/L}$) allerdings weniger Strangbrüche (Abbildung 51). Dieser Effekt dürfte auf die Schwankungen der Einzelwerte zurückzuführen sein, die zu einem höheren Mittelwert mit großer Streuung bei den Kontrollzellen führte. Auch die oxidativen DNA-Schäden stiegen mit zunehmender OTA-Konzentration ab 25 $\mu\text{mol/L}$ OTA an (Abbildung 53). Obwohl der absolute Anteil an Endo III-sensitiven Stellen höher ist, als der an FPG-sensitiven Stellen, zeigte sich ein stärkerer Anstieg der spezifischen oxidativen DNA-Schäden, die durch FPG-Behandlung detektiert wurden.

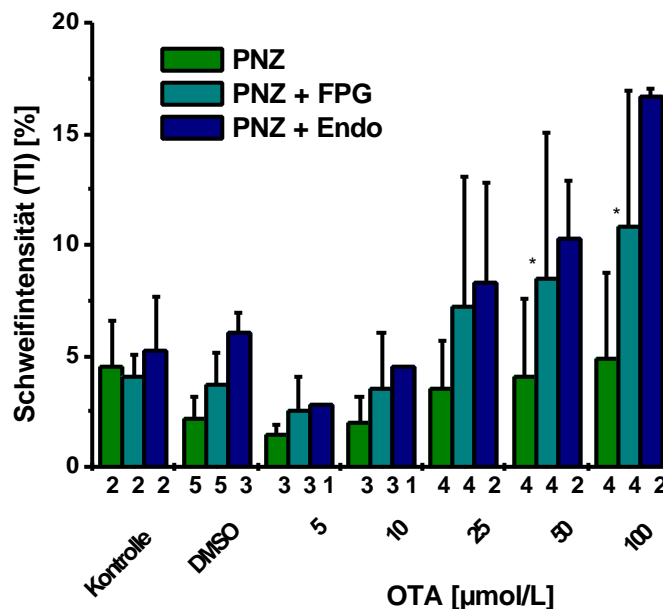


Abbildung 51: Schweifintensitäten in PNZ (Comet-Assay) nach 1 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, $\text{MW} \pm \text{SA}$, außer bei $n = 2$: $\text{MW} \pm$ Mittelwertabweichung). Die Ziffern unter der x-Achse geben die Anzahl unabhängiger Versuche an (n). *: $p < 0,05$

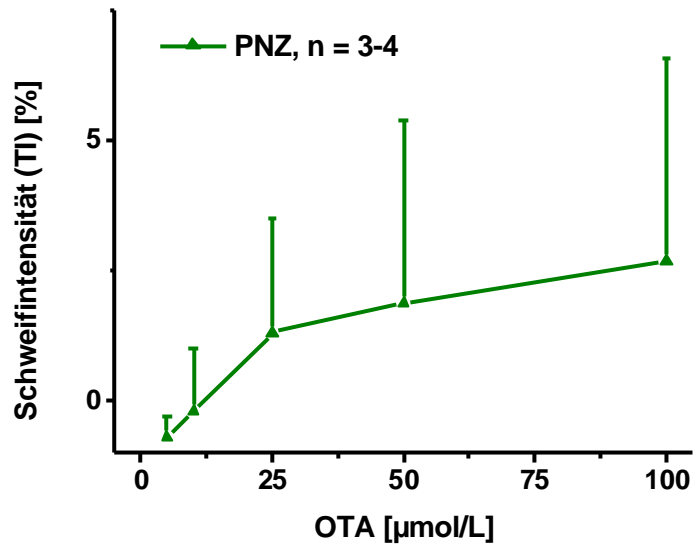


Abbildung 52: Zunahme der Basisschäden in PNZ (Comet-Assay) nach 1 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Differenz der Basisschäden zwischen Kontrolle und Substanzkonzentrationen.

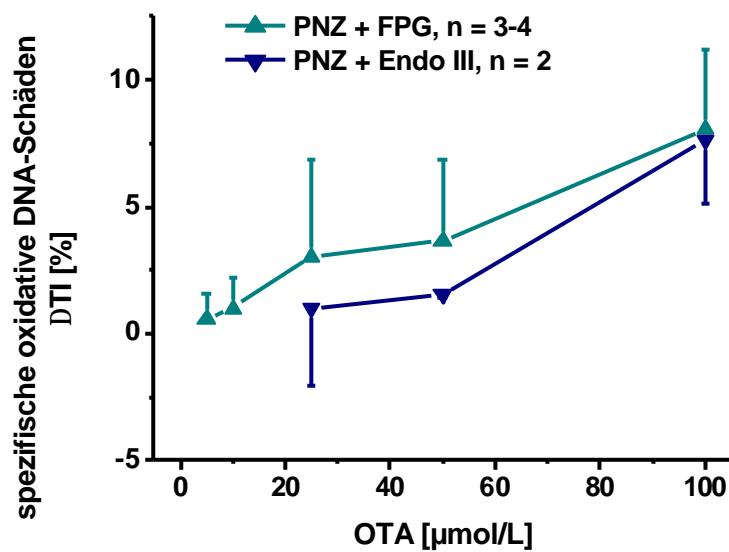


Abbildung 53: Zunahme der spezifischen oxidativen DNA-Schäden in PNZ (Comet-Assay) nach 1 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, außer bei n = 2: MW \pm Mittelwertabweichung, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Differenz der Schäden zwischen Kontrolle und Substanzkonzentrationen.

5.3.3.2 Primäre Nierenzellen nach 24 h Inkubation

Abbildung 54 zeigt die Schweifintensitäten bei PNZ nach 24stündiger Inkubation mit OTA. Die Basisschäden der Kontrolle liegen mit $2,9 \pm 1,3$ % TI im Bereich der Kontrollzellen aus den Versuchen mit Zelllinien und PNZ nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde. Auch das Maß der FPG-sensitiven Stellen in der DNA von Kontrollzellen ist vergleichbar (24h: $5,6 \pm 4,8$ %, 1h: $4,0 \pm 1,1$), die Schwankungen sind allerdings deutlich höher. Ein Einfluss von OTA auf die Basisschäden wurde nicht detektiert (Abbildung 55). Die spezifisch oxidativen DNA-Schäden hingegen nahmen deutlich zu und erreichten nach Inkubation mit $3 \mu\text{mol/L}$ OTA Werte von $5,3 \pm 5,2$ % TI (Abbildung 56). Die anscheinend starke Zunahme der FPG-sensitiven Stellen nach Einwirken von $0,03 \mu\text{mol/L}$ OTA sind aufgrund der niedrigen Zahl an Wiederholungen auf die Schwankungen bei der Untersuchung der PNZ in der Langzeitkultur zurückzuführen (s.a. 5.2.1.4 und 5.2.2.2).

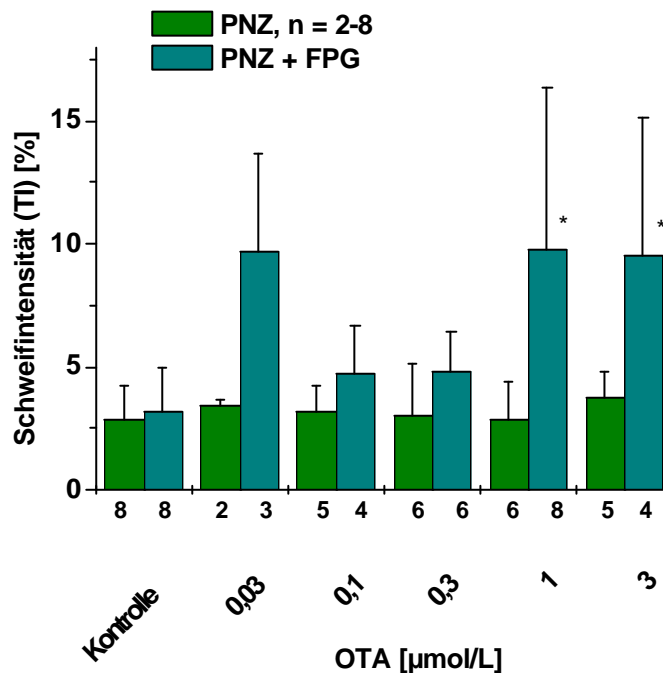


Abbildung 54: Schweifintensitäten in PNZ (Comet-Assay) nach 24 h Inkubation mit OTA ($0,1$ % DMSO, MW \pm SA, außer bei n = 2: MW \pm Mittelwertabweichung). Die Ziffern unter der x-Achse geben die Anzahl unabhängiger Versuche an (n). *: $p < 0,05$

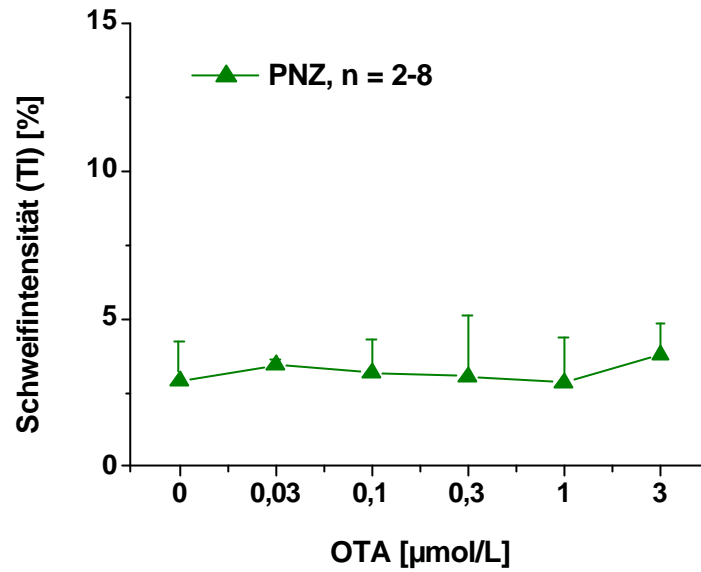


Abbildung 55: Entwicklung der Basisschäden in PNZ (Comet-Assay) nach 24 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Differenz der Basisschäden zwischen Kontrolle und Substanzkonzentrationen.

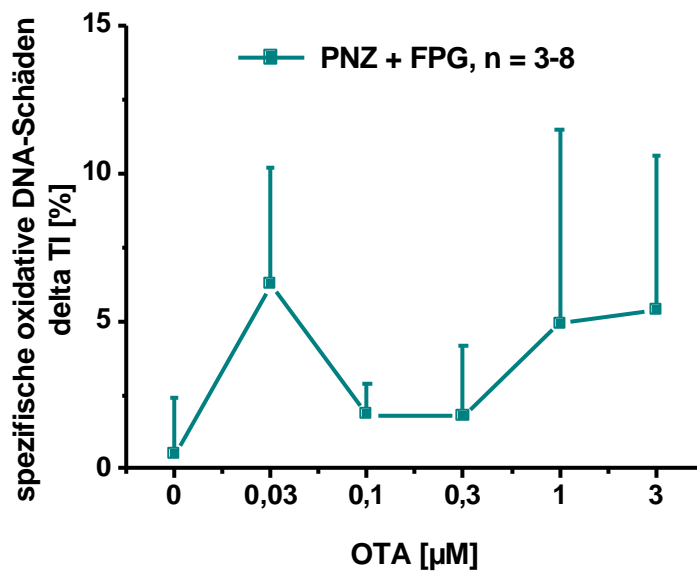


Abbildung 56: Zunahme der spezifischen oxidativen DNA-Schäden in PNZ (Comet-Assay) nach 24 h Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). Differenz der Schäden zwischen Kontrolle und Substanzkonzentrationen.

5.3.3.3 Diskussion der DNA-Schädigung in primären Nierenzellen

In PNZ wurden nach einstündiger und 24stündiger Inkubation keine erhöhten Basisschäden detektiert. In einer publizierten Arbeit wurde die Induktion von Strangbrüchen (Basisschäden) durch OTA an primären Milzzellen aus der Maus untersucht. Mittels alkalischer Filterelution wurden DNA-Strangbrüche nach Inkubation mit 25 µmol/L OTA über 48 h detektiert [Creppy et al., 1985a]. Aufgrund der hohen Konzentration und der langen Inkubationszeit ist wahrscheinlich, dass die Inkubation in Gegenwart von Serum erfolgte. Des Weiteren wurde nach Inkubation von kultivierten humanen Lymphozyten mit 15 nmol/L OTA über 48 h die Induktion von Schwesterchromatid-Austauschen beobachtet [Manolova et al., 1991].

Ab einer Konzentration von 25 µmol/L OTA (1 h) wurden oxidative DNA-Schäden in den PNZ gemessen. Dabei wurde mit zwei Reparaturenzyme (FPG und Endo III) die vorhandenen oxidierten DNA-Basen quantifiziert. Das Maß der oxidativen DNA-Schäden ist dabei mit dem in Zelllinien vergleichbar (8 % Δ TI). Im Gegensatz zu der beobachteten Toleranz bezüglich der Zytotoxizität, reagieren die frisch isolierten PNZ damit deutlich sensitiver auf das DNA-schädigende Potenzial von OTA (Faktor 20). Nach 24stündiger Inkubation wurden in PNZ oxidative DNA-Schäden ab einer Konzentration von 1 µmol/L OTA detektiert, die Zellen reagierten also ähnlich empfindlich, wie die verwendeten Zelllinien. Da die PNZ insgesamt 48 h kultiviert wurden, bis die DNA im Comet-Assay untersucht wurde, war möglicherweise der Stoffwechsel soweit umgestellt, dass die PNZ sich in ihren Eigenschaften, den Zelllinien angenähert hatten.

Zur Induktion oxidativer DNA-Schäden durch OTA in primären Zellen gibt es bisher keine Literaturdaten.

5.3.4 DNA-Schädigung in vivo (Ratte)

In Kooperation mit Dr. R. Turesky (National Center for Toxicology Research, Jefferson, AR, USA) wurde ein Tierversuch an Ratten durchgeführt, um die Induktion (oxidativer) DNA-Schädigung durch OTA zu untersuchen. Dazu wurden Gruppen von je fünf männlichen F344-Ratten über vier Wochen per gavage mit 0; 0,03; 0,1; 0,3 mg/kg KG/d OTA behandelt. Die Stabilität der verwendete OTA-Lösung wurde durch begleitende Analytik sichergestellt. Als Positivkontrolle für Nierenschädigung wurden die Tiere 4 bzw. 24 h mit Eisen(III)nitrilotriacetat (Fe-NTA) behandelt. Die Tiere wurden getötet, Leber und Niere präpariert und aus dem Organewebe Einzelzellen isoliert. Mit den Zellen wurden pro Tier und Organ 4 Objektträger mit je zwei Gelen für den Comet-Assay hergestellt. Die Objektträger wurden zur Auswertung codiert.

5.3.4.1 Leber in vivo (Ratte)

Die vierwöchige Behandlung von männlichen F344-Ratten mit OTA führte nicht zu einer Zunahme der DNA-Basisschäden in der Leber der Tiere (Abbildung 57).

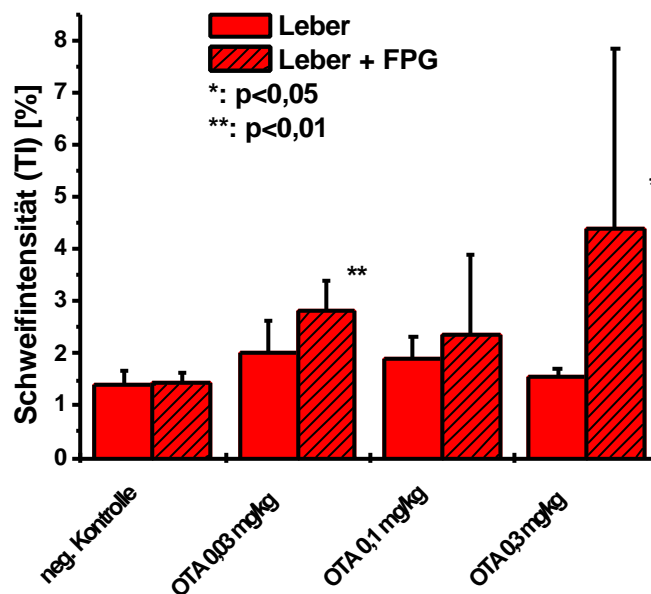


Abbildung 57: Schweifintensitäten in Zellen aus Rattenleber nach in vivo Behandlung mit OTA (4w, gavage), Comet-Assay (MW \pm SA, n = 5, Anzahl Tiere). *: p < 0,05; **: p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle

Eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante ($p < 0,01$) Zunahme der FPG-sensitiven Stellen wurde nach Gabe von 0,03 mg/kg KG/d und nach Gabe von 0,3 mg/kg KG/d OTA ($p < 0,05$) detektiert (0,3 mg/kg KG/d: 3 % Δ TI). Eine Induktion spezifisch oxidativer DNA-Schäden nach Gabe von 0,1 mg/kg KG/d wurde nicht gemessen.

Abbildung 58 zeigt, dass die Erhöhung der oxidativen DNA-Schäden durch OTA im Wesentlichen durch die sehr hohe oxidative Schädigung eines Tieres (Nr. 18) zustande kommt. Es bleibt offen, inwieweit OTA in der Lage ist, bei dieser Dosierung tatsächlich oxidative DNA-Schäden in der Leber zu induzieren.

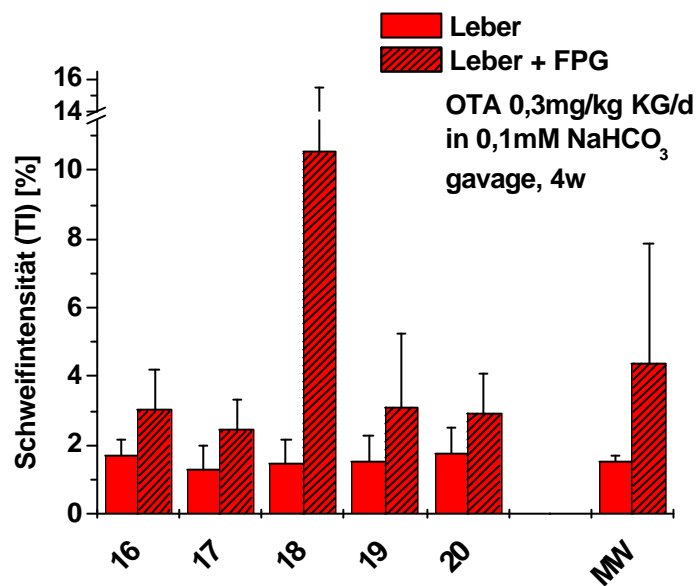


Abbildung 58: Schwefelintensitäten in Zellen aus Rattenleber nach in vivo Behandlung mit 0,3 mg/kg KG OTA (4w, gavage), Comet-Assay (MW \pm SA, n = 5, Anzahl Tiere). Die Ziffer unter der x-Achse gibt die Käfignummer des Tieres an.

Das als Positivkontrolle eingesetzte Fe-NTA (15 mg/kg KG, berechnet als Eisen) bewirkte 4 h nach der intraperitonealen Injektion einen deutlichen Anstieg ($p < 0,05$) der Basisschäden ($4,3 \pm 2,4$ %) und DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG ($5,3 \pm 2,0$ %). Eine verstärkte Bildung spezifisch oxidativer DNA-Schäden wurde allerdings nicht beobachtet (Abbildung 59). 24 h nach der Injektion zeigten sich weder erhöhte Strangbruchraten, noch erhöhte oxidative DNA-Schäden. Dies könnte auf eine schnelle Entgiftung von Fe-NTA und Reparatur der entstandenen Schäden zurückzuführen sein.

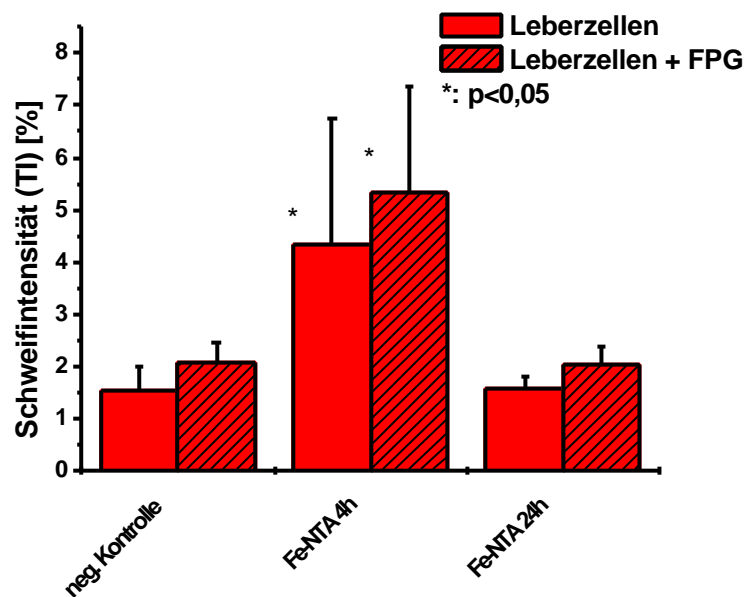


Abbildung 59: Schweifintensitäten in Zellen aus Rattenleber nach in vivo Behandlung mit Fe-NTA (i.p.), Comet-Assay (MW \pm SA, n = 5, Anzahl Tiere) *: $p < 0,05$.

5.3.4.2 Niere in vivo (Ratte)

Die Basisschäden in der Niere von Tieren, die vier Wochen mit dem Vehikel behandelt wurden, liegen mit $2,2 \pm 1,1$ % TI etwas höher als in der DNA aus Leberzellen. Auch die oxidativen DNA-Schäden in der Kontrolle sind im Vergleich zur Leber mit $3,0 \pm 1,1$ % TI erhöht. Durch die Behandlung der Tiere mit OTA kommt es zu keinem signifikanten Anstieg der Basisschäden, wohl aber im Vergleich zu der Kontrolle zu einer signifikanten Zunahme der FPG-sensitiven Stellen in der Niedrigdosisgruppe ($p < 0,05$) und in der Hochdosisgruppe ($p < 0,01$, 3 % Δ TI, Abbildung 60). Mit einem p-Wert von 0,242 ist der Betrag der Schweifintensität nach FPG-Behandlung der Nierenzellen aus den Tieren der mittleren Dosisgruppe (0,1 mg/kg KG) nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle.

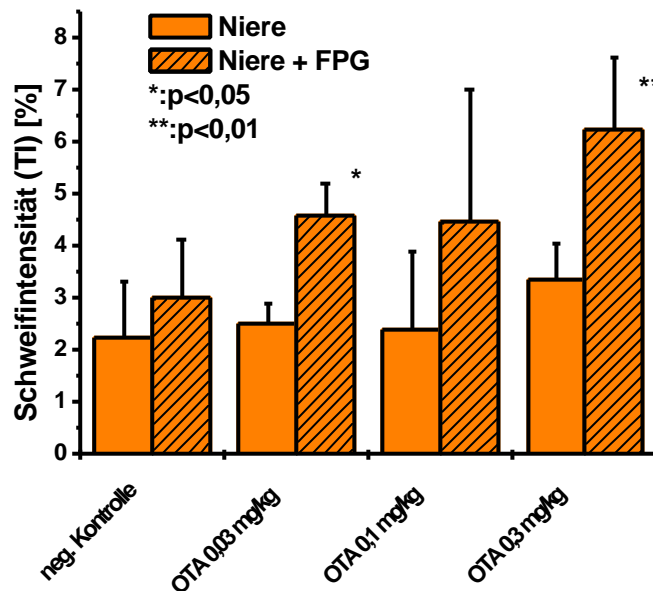


Abbildung 60: Schweifintensitäten in Zellen aus Rattenniere nach in vivo Behandlung mit OTA (4w, gavage), Comet-Assay (MW \pm SA, n = 5, Anzahl Tiere). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Die Injektion von Fe-NTA führte in der Niere der behandelten Tiere weder zu einer signifikanten Induktion der Basisschäden, noch zu einer Induktion der oxidativen DNA-Schäden (Abbildung 61). Die Tiere, die 24 h nach der Injektion untersucht wurden, zeigten sogar eine Schädigung die geringer war, als die der Kontrolltiere, obwohl die Nieren der Tiere sich optisch deutlich von den Nieren der Kontrollgruppe unterschieden (fleckig, gräuliche Farbe), das Fe-NTA also offensichtlich einen Effekt hervorgerufen hatte.

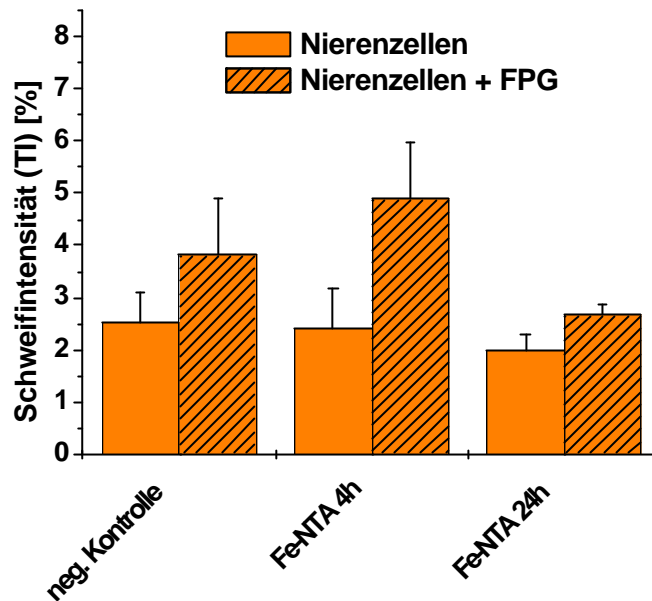


Abbildung 61: Schweifintensitäten in Zellen aus Rattenniere nach in vivo Behandlung mit Fe-NTA (i.p.), Comet-Assay (MW \pm SA, n = 5, Anzahl Tiere).

5.3.4.3 Diskussion des Tierversuchs

Im Rahmen des Tierversuchs wurden Zellen aus Leber und Niere von F344-Ratten auf Strangbrüche und oxidative DNA-Schäden untersucht. Vier Dosisgruppen wurden zuvor mit 0, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG/d OTA in 0,1 mmol/L NaHCO_3 -Lösung über vier Wochen behandelt (Gavage, 5d/Woche oder 7d/Woche?). Weitere zwei Dosisgruppen wurden einmalig i.p. mit 15 mg/kg KG Fe-NTA in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung behandelt und die Tiere nach 4 h oder 24 h getötet und Zellen für den Comet-Assay isoliert. Des Weiteren wurde eine siebte Gruppe von Tieren als Kontrolle i.p. mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung behandelt und nach 24 h zur Isolierung von Leber- und Nierenzellen getötet.

In beiden Kontrollgruppen wurden in der Leber wie auch in der Niere vergleichbare, niedrige Basisschäden und FPG-sensitive Stellen gefunden, allerdings war die DNA aus Nierenzellen stärker geschädigt als die der Leberzellen (Leber: 1,5 % TI bzw. 2 % TI, Niere: 2,5 % TI bzw. 3,0 % TI). Die Schweifintensitäten aus Nierenzellen von Kontrolltieren wiesen zudem größere Schwankungen auf.

Die Behandlung der Tiere mit Fe-NTA führte nach vier Stunden zu einer signifikant erhöhten Rate von Basisschäden im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,011$) und oxidativen DNA-Schäden ($p=0,024$) in Leberzellen. Obwohl Fe-NTA ein ausgeprägtes Nierenkanzerogen ist, dass nach langfristiger Gabe über oxidative Schädigung zu

Tumoren in der Niere führt, wurde in der DNA aus Nierenzellen der untersuchten Tiere keine Erhöhung der Strangbruchrate oder der oxidativen Schäden ($p=0,200$) beobachtet. 24 h nach der Applikation von Fe-NTA waren weder DNA aus der Leber noch der Niere geschädigt, obwohl die Nieren augenscheinlich verändert schienen (gräuliche Farbe). Möglicherweise wird Fe-NTA schnell ausgeschieden und die induzierten Schäden können effektiv repariert werden. Eine ähnliche Beobachtung machten die Kooperationspartner bei der Untersuchung der oxidativen Proteinschäden [Turesky, 2003].

Die Behandlung der Ratten mit OTA für vier Wochen führte nicht zu einer Induktion von DNA-Basisschäden in Leberzellen, wohl aber zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikanten Erhöhung oxidativer DNA-Schäden bei Gabe von 30 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ ($p=0,001$) und 300 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ ($p=0,022$). In der mittleren Dosisgruppe zeigten die Schäden stärkere Schwankungen, so dass keine signifikante Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen bestimmbar war. In Zellen aus den Nieren der behandelten Tiere waren ebenfalls keine erhöhten DNA-Schäden detektierbar. Oxidative DNA-Schäden wurden signifikant in der niedrigen und der hohen Dosisgruppe induziert (30 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$: $p=0,020$ und 300 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$: $p=0,004$). Aufgrund der hohen Schwankungen waren in der mittleren Dosisgruppe (100 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) erhöhte oxidative Schäden nicht signifikant nachweisbar.

In einer Zweijahresstudie mit F344-Ratten führte die orale Gabe von 70 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ (5d/w) zu einer erhöhten Rate an Nierentumoren in den männlichen Tieren, während die Inzidenz für Nierentumoren bei Gabe von 21 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrollpopulation war [Boorman, 1989]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, führte die orale Gabe von 30 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ für vier Wochen signifikant zu einer Induktion von oxidativen DNA-Schäden in Leber und Niere. Die im Comet-Assay erstmals gefundenen oxidativen DNA-Schäden stehen also möglicherweise in einem ursächlichen Zusammenhang mit der nierenkanzerogenen Wirkung von OTA.

Die Organspezifität der Kanzerogenität von OTA in der Ratte könnte darauf zurückzuführen sein, dass Leberzellen in der Ratte nach Behandlung der Tiere mit OTA nicht mit ausgeprägter Zytotoxizität reagieren. Eine regenerative Proliferation im Gewebe bleibt aus und es kommt so nicht zu der Ausbildung von Tumoren. In Nieren OTA-behandelter Ratten hingegen wurden nach zweijähriger Gabe erhöhte Proliferation und Karyomegalien im Tubulusepithel beobachtet [Boorman, 1989; Gekle et al., 1995]. Eine erhöhte Proliferation, zusammen mit erhöhtem oxidativen Stress, der sich im oben vorgestellten Tierversuch in oxidativen DNA-Schäden äußert,

kann zu Tumoren in der Niere führen, wie für Fe-NTA und Kaliumbromat gezeigt wurde [Dietrich & Swenberg, 1993; Hard, 1998; Li et al., 1987; Wolf et al., 1998].

In einer Studie an Balb/c-Mäusen, die einmalig mit 2,5 mg/kg KG OTA behandelt wurden, detektierten Creppy und Mitarbeiter 24 h nach der Applikation DNA-Strangbrüche (Basisschäden) in Milz, Leber und Niere unter Verwendung der alkalischen Filterelution) [Creppy et al., 1985b].

5.3.5 Diskussion der Induktion von DNA-Schädigung

In den verwendeten Zellsystemen war die DNA-Basisschädigung nur nach Kurzzeitinkubation mit sehr hohen OTA-Konzentrationen ($\geq 500 \mu\text{mol/L}$) in den Zelllinien bzw. nach 24 h in den empfindlicheren V79-Zellen erhöht. Die Nierenzelllinie CV-1 (nach 24 h Inkubation), die primären Zellen aus der Rattenniere und Leber- und Nierenzellen aus Ratten, die über vier Wochen mit OTA behandelt wurden, zeigten keine Erhöhung der Basisschäden. In einer Studie mit primären Zellen wurde das Potenzial von OTA, DNA-Strangbrüche zu induzieren, mit der Alkalischen Filterelution untersucht. Dabei wurden primäre Milzzellen (Maus) 48 h mit $25 \mu\text{mol/L}$ OTA inkubiert und anschließend DNA-Schäden beobachtet. Des Weiteren wurde Balb/c-Mäusen einmalig 2,5 mg/kg KG OTA oral gegeben und nach 24 h die Induktion von DNA-Strangbrüchen in Leber, Niere und Milz gemessen [Creppy et al., 1985a]. Da die in dieser Arbeit gewählten Konzentrationen und Inkubationszeiten bzw. Dosen im Tierversuch niedriger angesetzt waren als in der zitierten Studie, steht die unbeeinflusste Basisschädigung in Nierenzellen nicht im Gegensatz zu den Literaturdaten. Die beobachtete Induktion oxidativer DNA-Schäden unter den hier gewählten Bedingungen zeigt, dass die oxidativen Schäden möglicherweise von höherer Relevanz für die Toxizität sind, als die direkten Strangbrüche. In MDCK-Zellen wurde die Induktion von Strangbrüchen nach Inkubation mit dem Comet-Assay nachgewiesen. Die verwendeten Konzentrationen waren niedriger, als in dieser Arbeit, die Elektrophoresezeit aber um 50 % verlängert im Vergleich zu dieser Arbeit [Lebrun & Föllmann, 2002]. Die Verlängerung der Elektrophoresezeit führt zu einer überproportionalen Zunahme der Schweifintensität [Müller, 2003], weshalb die Ergebnisse nicht im Widerspruch zu dieser Arbeit stehen. In verschiedenen Systemen wurde zudem die Induktion von Schwesterchromatid-Austauschen gezeigt.

FPG-sensitive Stellen in der DNA wurden in allen verwendeten in vitro-Testsystemen und in vivo beobachtet. Die Induktion der oxidativen DNA-Schäden

war nicht stark ausgeprägt, wurde aber in PNZ nach einstündiger Inkubation mit zwei unterschiedlichen Reparaturenzymen nachgewiesen (FPG und Endo III). Nach einstündiger Inkubation waren sehr hohe Konzentrationen zur Induktion der Schäden in Zelllinien notwendig, in PNZ waren diese Konzentrationen um den Faktor 20 niedriger. Dies deutet darauf hin, dass die PNZ im Vergleich zu den Zelllinien stoffwechselbedingte Besonderheiten aufweisen (z.B. metabolische Kompetenz), die die erhöhte Sensitivität bedingen. Nach 24stündiger Inkubation mit OTA lagen die Konzentrationen, die oxidative DNA-Schäden induzierten in einem vergleichbaren $\mu\text{molaren}$ Bereich. Hier waren die PNZ sogar geringfügig weniger sensitiv als die verwendeten Zelllinien. Aufgrund der insgesamt 48stündigen Kultur der PNZ, bis zur Untersuchung der DNA im Comet-Assay, hatten sich die PNZ in ihren Eigenschaften möglicherweise soweit den Zelllinien angenähert hatten, dass eine erhöhte Empfindlichkeit nicht mehr gegeben war. In nur einer publizierten Studie wurde die Induktion oxidativer DNA-Schäden in LLC-PK1-Zellen gezeigt. 8-OH-dG wurde mit einem qualitativen Färbetest nach einer Inkubation mit $15 \mu\text{mol/L}$ OTA für 24 h bestimmt [Schaaf et al., 2002]. Eine direkter Vergleich der Ergebnisse ist vermutlich nicht möglich, da in dieser Studie wahrscheinlich serumhaltiges Inkubationsmedium verwendet wurde, die Schlussfolgerung der Autoren stützt aber die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate. In Ratten, die über vier Wochen mit OTA-Dosen behandelt wurden, die im Bereich der Dosen liegen, die in einer Zweijahresstudie gerade signifikant Tumoren in der Niere von Versuchstieren induzierten, wurde in der DNA aus Leber und Niere ebenfalls eine Induktion von oxidativen DNA-Schäden gemessen.

Eine Induktion oxidativer DNA-Schäden ist grundsätzlich als prämutagenes Ereignis anzusehen (Verweis Theorie ROS) und insbesondere im Zusammenhang mit der Nephrotoxizität *in vivo* als relevant für die Tumorentstehung in der Niere von Ratten anzusehen. Die der Zytotoxizität folgende, erhöhte Proliferation wurde im Tubulusepithel von Ratten beobachtet [Boorman, 1989] und könnte so zur Tumorigenese in der Niere beitragen. Die im Comet-Assay gefundenen oxidativen DNA-Schäden geben somit einen ersten Hinweis auf den Mechanismus der nierenkanzerogenen Wirkung von OTA.

Die *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass die Konzentrationen, die in den Zellen oxidative DNA-Schäden verursachen, etwas niedriger sind (Faktor 5), als die Konzentrationen, die zytotoxische Effekte induzieren. Beide Wirkungen sind für die Tumorentstehung durch OTA relevant, möglicherweise führen die oxidativen Schäden aber nicht nur zu initiiierenden Ereignissen (Mutationen), sondern auch zum Zelltod und zur Proliferation *in vivo*.

5.4 Beeinflussung des Glutathionspiegels in CV-1-Zellen

5.4.1 1 h Inkubation

Die Inkubation von CV-1-Zellen mit OTA über eine Stunde führte mit Konzentrationen $>250 \mu\text{mol/L}$ zu einer Abnahme des Gesamtglutathiongehaltes in den Zellen (Abbildung 62). Der GSH-Gehalt liegt nach Inkubation mit $1000 \mu\text{mol/L}$ bei $67 \pm 8 \%$ bezogen auf die Kontrolle. Da die Viabilität bis $1000 \mu\text{mol/L}$ OTA $>90 \%$ war, ist davon auszugehen, dass die Depletion nicht durch eine erhöhte Membrandurchlässigkeit zustande kommt. Bei der höchsten eingesetzten OTA-Konzentration liegt der GSH-Gehalt bei $50 \pm 6 \%$ bezogen auf die Kontrolle. Allerdings ist hier die Membranintegrität schon leicht beeinflusst (Viabilität $>80 \%$), so dass ein Austreten von GSH aus der Zelle nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

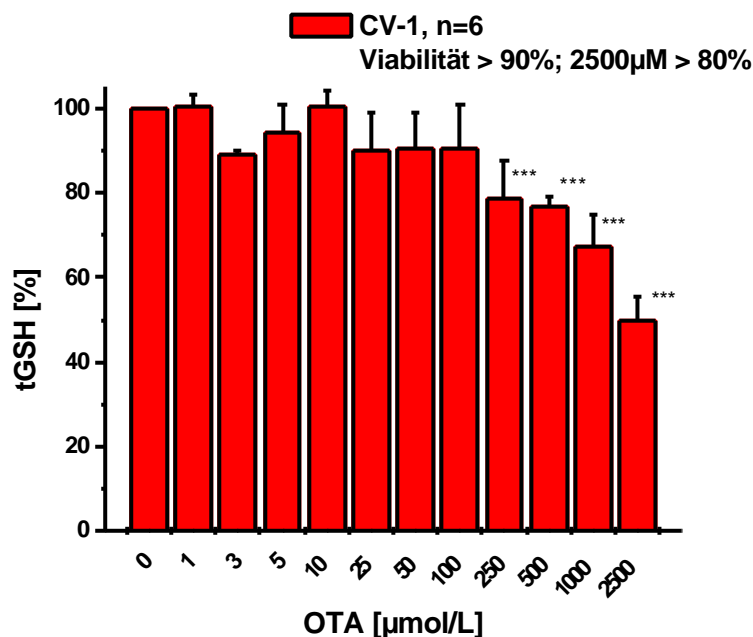


Abbildung 62: Gesamtglutathion-Gehalt in CV-1-Zellen nach einstündiger Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). ***: $p < 0,001$

5.4.2 24 h Inkubation

Nach 24stündiger Inkubation mit OTA war in CV-1-Zellen keine Abnahme des Glutathiongehaltes mit Konzentrationen bis einschließlich $5 \mu\text{mol/L}$ messbar (Abbildung 63). Es zeigte sich im Gegenteil eine leichte Zunahme des GSH-

Gehaltes bei 1 (136 ± 35 %) und 2,5 $\mu\text{mol/L}$ (149 ± 10 %), die bei Inkubation mit 5 $\mu\text{mol/L}$ nicht mehr messbar ist. Letzteres könnte mit der beginnenden Zytotoxizität, gekennzeichnet durch nachlassende Membranintegrität (73,5 %), bei dieser Konzentration in Zusammenhang stehen.

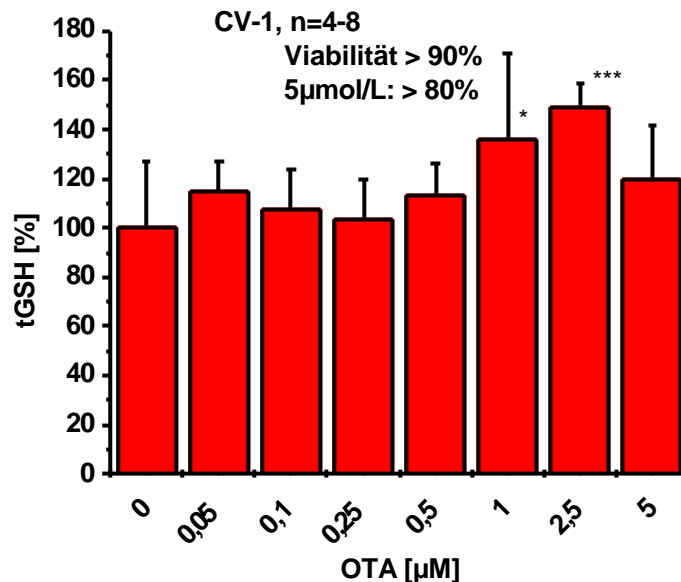


Abbildung 63: Gesamtglutathion-Gehalt in CV-1-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit OTA (0,1 % DMSO, MW \pm SA, n entspricht der Anzahl unabhängiger Versuche). *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$

5.4.3 Diskussion der Beeinflussung des Glutathionspiegels

Oxidativer Stress kann in einer Zelle zu einer Verschiebung des Glutathionstatus führen. Durch das Abfangen von ROS nimmt die Konzentration an GSH in der Zelle ab, die Konzentration an GSSG und somit das Verhältnis GSSG/GSH zu. [Halliwell et al., 1999]. Unter den gewählten Versuchsbedingungen in CV-1-Zellen wurde ein erhöhter Gehalt an GSSG auch nach Inkubation mit hohen OTA-Konzentrationen nicht beobachtet. Die nach einstündiger Inkubation beobachtete Abnahme des tGSH-Gehaltes kann aber durch eine Depletion von LPO-Produkten wie z.B. Alkenale verursacht sein. Möglicherweise induziert OTA in diesem Zellsystem eine LPO, deren Folgeprodukte dann mit GSH konjugiert werden. Eine schnelle Depletion von GSH durch Alkenale konnte u.a. in V79-Zellen gezeigt werden [Glaab et al., 2002]. Eine Bindung von OTA an GSH ist vor dem Hintergrund der Literaturdaten unwahrscheinlich. Es gibt nur schwache Hinweise auf eine toxische Wirkung von OTA, an der GSH beteiligt ist. Die Bildung eines OTA-GSH-Konjugates wurde zwar postuliert und konnte auf Basis des OTA-Hydrochinons in zellfreien Systemen ge-

zeigt werden, das Konjugat wurde aber weder in vitro noch in vivo nachgewiesen [Dai et al., 2003; Gautier et al., 2001a]

Nach 24stündiger Inkubation war keine GSH-Depletion mehr messbar, es kam im Gegenteil zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes in den inkubierten CV-1-Zellen. Das Enzym, das den ersten Schritt der GSH-Biosynthese katalysiert (γ -Glutamylcystein-Synthetase), wird über Rückkopplungsmechanismen durch GSH gehemmt [Halliwell et al., 1999]. Deshalb kann eine schnelle Depletion an GSH zu einer Neusynthese in der Zelle führen, was die Effekte nach 24stündiger Inkubation erklären könnte.

5.5 Genmutationen in V79-Zellen (HPRT)

Ein Test zur Untersuchung der Mutagenität in V79-Zellen (HPRT-Test) wurde mit OTA einmal durchgeführt. Dabei wurden V79-Zellen ohne metabolische Aktivierung 1 h mit OTA inkubiert. Wie Abbildung 64 verdeutlicht, wurden keine Hinweise auf Mutagenität in V79-Zellen gefunden, die Anzahl der gefundenen Klone lag für alle OTA-Konzentrationen bis 500 $\mu\text{mol/L}$ mit 10-25 Mutanten im Bereich der Kontrolle (17 Mutanten). Eine Substanz zeigt mutagenes Potenzial, wenn sie dreimal mehr mutierte Klone erzeugt, als die Lösungsmittelkontrolle. Durch die Positivkontrolle MNNG (10 $\mu\text{mol/L}$), einem alkylierenden Agens, wurde eine hohe Zahl an Mutanten erhalten (233). Durch Inkubation mit OTA wurde eine leichte Reduktion der Wachstumseffizienz („cloning efficiency“) auf 75 % bei Inkubation mit 500 $\mu\text{mol/L}$ OTA beobachtet, die auf beginnende Zytotoxizität zurückzuführen ist. Das hier beobachtete fehlende mutagene Potenzial wird durch die Arbeit von Föllmann et al., [2003] bestätigt, die im HPRT-Test an V79-Zellen ebenfalls auch nach 24stündiger Inkubation mit oder ohne metabolischer Aktivierung keine Mutagenität von OTA finden konnten.

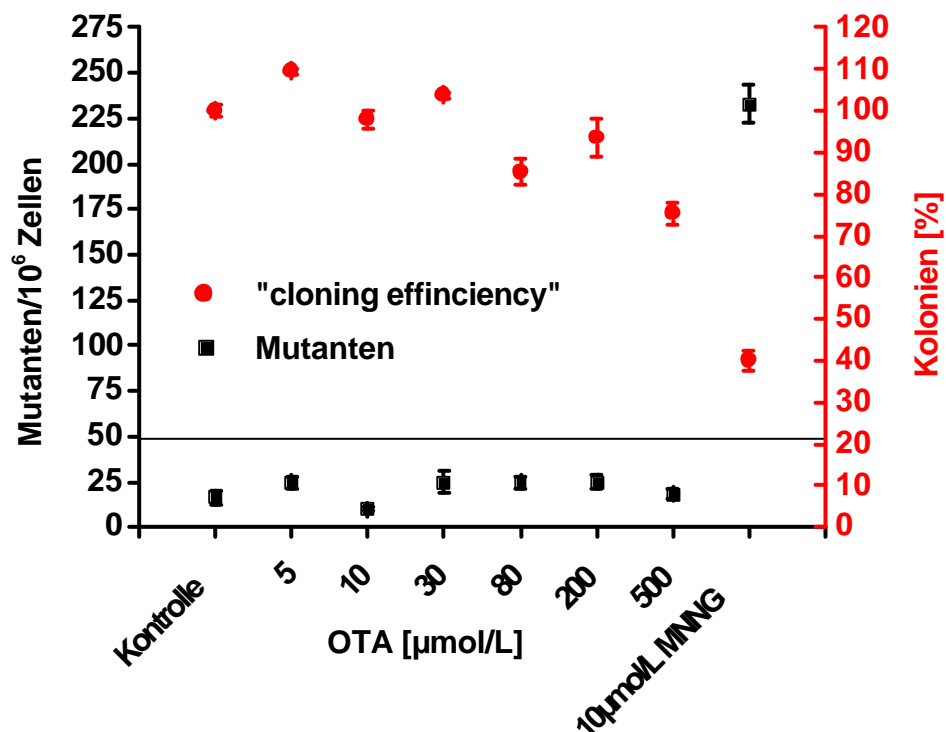


Abbildung 64: Mutationsrate in V79-Zellen (HPRT-Test) nach 1 h Inkubation mit OTA (1 % DMSO, MW \pm SA).

5.6 Ochratoxin A-Aufnahme in CV-1-Zellen

5.6.1 Analytik von OTA

Mit der HPLC-Anlage wurden verschiedene Standardreihen vermessen, um zu prüfen, ob eine quantitative Auswertung sinnvoll möglich ist. Dafür wurden Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 1,0 µmol/L sowie im Bereich von 2,5 bis 100 nmol/L in Laufmittel hergestellt. Die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängig hergestellten Verdünnungsreihen (0,2-1,0 µmol/L) sind in Abbildung 65 dargestellt. Um die Messwerte direkt aufeinander beziehen zu können, wurde sie auf die höchste Konzentration von 1 µmol/L normiert. Ausreißer nach Nalimov wurden nicht berücksichtigt.

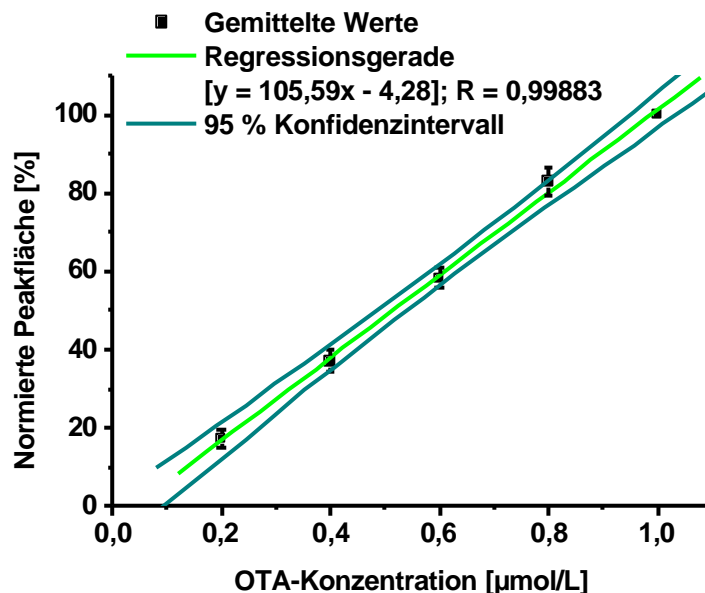


Abbildung 65: Messung von vier OTA-Standardreihen (0,2-1,0 µmol/L) mittels HPLC, auf 1 µmol/L normierte Messwerte (MW ± SA).

Die Regressionsgerade hat ein Bestimmtheitsmaß von 99,88 % liegt. Die beiden cyanblauen Linien grenzen das 95 % Konfidenzintervall der Werte ein. Sowohl die geringe Standardabweichung wie auch das schmale Konfidenzintervall zeigen, dass die quantitative Bestimmung von OTA möglich ist. Auch das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression zeigt, dass Untersuchungen an OTA-Proben quantitative Aussagen zulassen und eine ausreichende Linearität der Methode gewährleistet ist.

Des Weiteren wurden zwei verschiedene Verdünnungsreihen der Konzentrationen 2,5, 5, 10, 25, 50 und 100 nmol/L und 2,5, 5, 10, 20, 25, 40, 50 und 80 nmol/L vermessen. Die Messwerte wurden auf 50 nmol/L normiert, Lösungen der Konzentrationen 100, 80, 40 und 20 nmol/L wurden zweimal vermessen, von allen übrigen Konzentrationen liegen vier Messergebnisse vor (Abbildung 66).

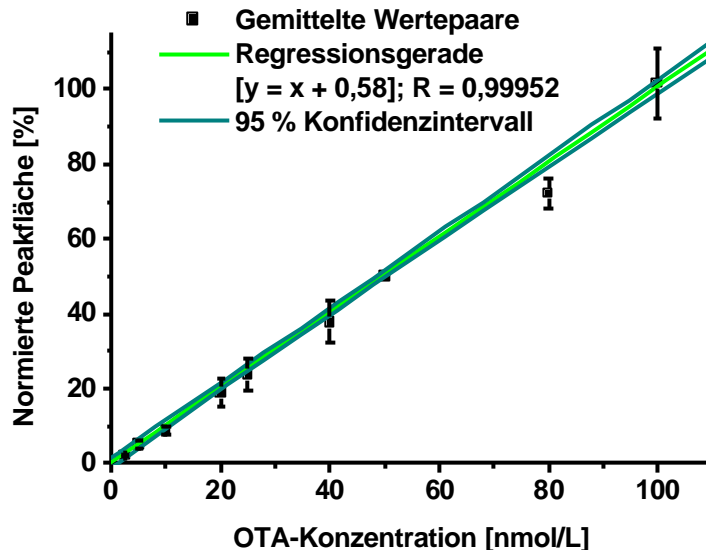


Abbildung 66: Messung von zwei OTA-Standardreihen (2,5-100 nmol/L) mittels HPLC, auf 50 nmol/L normierte Messwerte (MW \pm SA, außer 20, 40, 80, 100nmol/L: MW \pm Mittelwertabweichung).

Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden liegt bei 99,95 %. Dieses Ergebnis genau so wie das schmale Konfidenzintervall zeigen auch hier, dass eine zuverlässige quantitative Bestimmung von OTA-Proben im Konzentrationsbereich unter 100 nmol/L möglich ist. Die Peakflächen von OTA-Peaks geringer konzentrierter Lösungen als 2,5 nmol/L konnten nicht mehr registriert werden, die Bestimmungsgrenze liegt hier also bei 2,5 nmol/L.

5.6.1.1 Einfluss von Nährmedium und Zellbestandteilen

Untersucht wurde der Einfluss von Nährmedium und Zellbestandteilen auf die Analyse von OTA-Proben. Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich 0,02 bis 1,0 μ mol/L wurden im Verhältnis 1:1 mit Nährmedium verdünnt. Abbildung 67 zeigt die Messwerte der Lösungen von 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 μ mol/L OTA (grüne

Balken). Nach 1:1-Verdünnung der Lösungen mit Zellkulturmedium (CV-1-Zellen) liegen die Messwerte (blaue Balken) mit den Messwerten der ursprünglichen Verdünnungsreihe auf einer Geraden. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden über alle Werte beträgt 99,4 %. Das Medium in den Proben hatte also keinen Einfluss auf das Messergebnis.

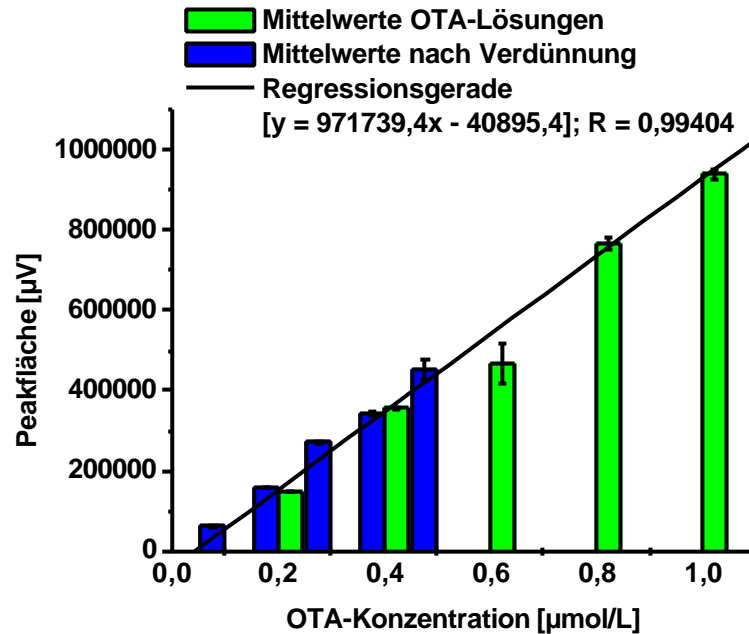


Abbildung 67: Messung von OTA-Lösungen von 0,2-1,0 µmol/L vor und nach Verdünnung (1:1) mit Zellkulturmedium (CV-1), Doppelbestimmung (MW ± Mittelwertabweichung)

Zudem wurden OTA-Lösungen so mit Kulturmedium verdünnt, dass eine Verdünnungsreihe mit OTA-Konzentrationen von 10 bis 500 nmol/L vermessen wurden. Die Regressionsgerade hat ein Bestimmtheitsmaß von 99,67 % (Abbildung 68), so dass OTA-Proben verschiedener Konzentrationen, die Nährmedium enthielten, quantitativ untersucht werden konnten.

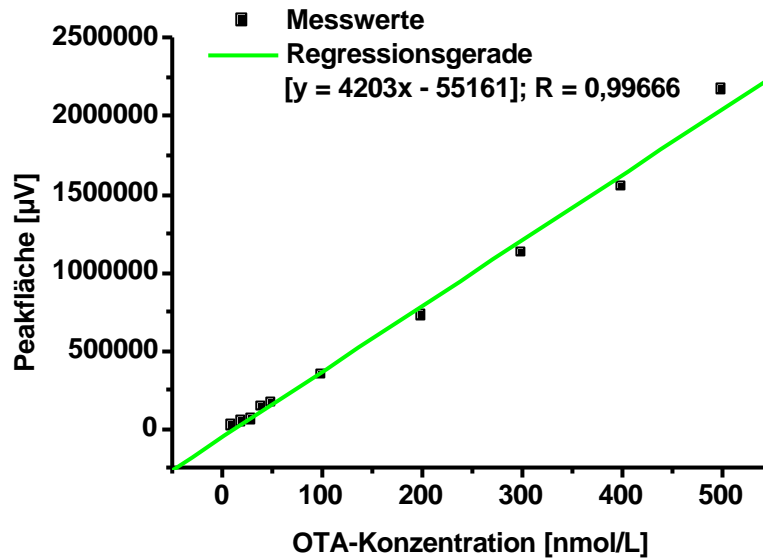


Abbildung 68: Messung von OTA-Lösungen nach Verdünnung (1:1) mit Zellkulturmedium (10-500 nmol/L) mit der HPLC, Doppelbestimmung (MW \pm Mittelwertabweichung).

5.6.1.2 Messungen aus Mediumproben

CV-1-Zellen wurden 24 h mit OTA-Konzentrationen von 0,25, 0,5 und 2,5 $\mu\text{mol/L}$ inkubiert. Der OTA-Gehalt im Inkubationsmedium wurde dann dreimal analysiert. Abbildung 69 zeigt die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichung. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden ist 99,999%. Weder das Medium in hoher Konzentration, noch die Zellbestandteile haben Einfluss auf die OTA-Analyse.

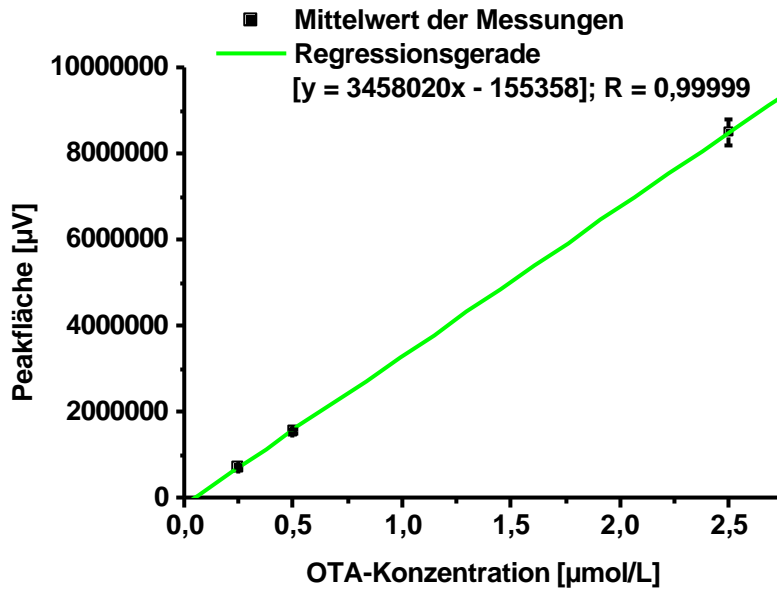


Abbildung 69: Messung von Inkubationsmedium nach 24stündiger Inkubation von CV-1-Zellen mit 0,25, 0,5 und 2,5 µmol/L OTA (MW ± SA).

5.6.1.3 Reproduzierbarkeit

Durch Mehrfach-Messung wurde untersucht, ob die Peakflächen einer definierten OTA-Lösung reproduzierbar quantifiziert werden können. Dazu wurden zwei verschiedene OTA-Lösungen (1 µmol/L) jeweils achtmal hintereinander an unterschiedlichen Tagen vermessen (Abbildung 70).

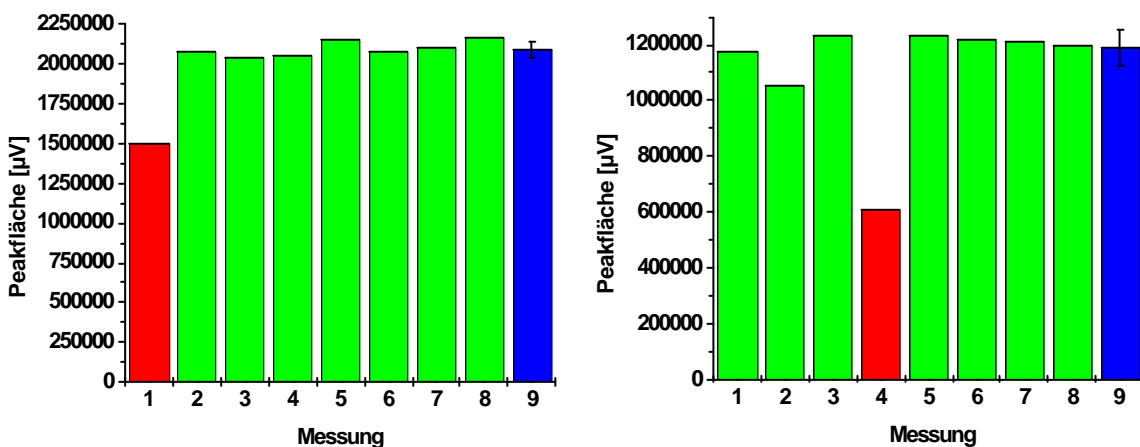


Abbildung 70: Achtfache Messungen zweier unterschiedlicher OTA-Lösungen der Konzentration 1 µmol/L, Ausreißer nach Nalimov sind rot, der Mittelwert der übrigen Messwerte mit Standardabweichung ist blau angegeben.

Rot gefärbte Säulen geben Ausreißer nach Nalimov, blaue Säulen die Mittelwerte jeder Messreihe mit Standardabweichung an. Die Messwerte innerhalb einer Reihe variieren nur wenig. Dieses Ergebnis zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Analytik an.

5.6.1.4 Diskussion der OTA-Analytik

Analysen von OTA-Lösungen mit gleichen Konzentrationen ergaben an verschiedenen Tagen deutlich unterschiedliche Peakflächen. Das lag an äußeren Einflüssen wie der Raumtemperatur. Um an unterschiedlichen Tagen vermessene Standardreihen vergleichen zu können, wurden Normierungen auf ausgesuchte Konzentrationen durchgeführt. Lösungen mit Konzentrationen unterhalb 2,5 nmol/L resultierten in Peaks, die nicht eindeutig vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden waren. Oberhalb dieser Nachweisgrenze konnten alle Peaks quantitativ ausgewertet werden. In der Literatur angegebene Nachweisgrenzen zur Analyse von OTA mittels HPLC-Fluoreszenz liegen im pikomolaren Bereich, z.B. bei 250 pmol/L [Gareis et al., 1988], 25 pmol/L [Kawamura et al., 1993] oder 5 pmol/L [Zimmerli et al., 1995].

5.6.2 Aufnahme von OTA

Vorversuche mit CV-1-Zellen, die mit OTA für 24 h inkubiert wurden zeigten, dass das Mykotoxin in die Zellen gelangt und dort nachweisbar ist. Die gemessenen Konzentrationen waren aber sehr gering. Die Zellen wurden im Folgenden nach der Inkubation mit OTA geerntet, homogenisiert, durch Zentrifugation in die Zellbestandteile fraktioniert und die Fraktionen auf OTA untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die OTA-Konzentrationen nach Aufarbeitung nur sehr klein waren. Durch Zugabe definierter OTA-Mengen (0,1-100 µmol/L) während der Fraktionierung sollte geklärt werden, in welchen Zellkompartimenten das Mykotoxin gebunden wird. In keinem der Experimente konnte die zugegebene OTA-Menge vollständig nachgewiesen werden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Wiederfindung von OTA nach Zugabe während der Zellfraktionierung (MW SA, n = 4-10).

Zugabe von OTA	Wiederfindung [%]	
	MW	SA
vor Potttern	20	23
vor 600xg Zentrifugation	28	15
vor 15.000xg Zentrifugation	31	4
vor 100.000xg Zentrifugation	23	17
vor Proteinfällung	38	28

Da OTA unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe während der Fraktionierung immer in Mengen vergleichbarer Größenordnung detektiert wurde, ist am ehesten davon auszugehen, dass OTA während der Proteinfällung mit dem Protein aus dem System entfernt wird. Ein Zusammenhang mit der zugegebenen OTA-Menge konnte nicht beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Mit-Fällung in jedem Falle nur zum Teil erfolgt und immer ein Teil OTA in Lösung bleibt.

Die gemessenen Konzentrationen Homogenat OTA-inkubierter Zellen lagen unter $0,01\mu\text{mol/L}$, entsprechend einem Gehalt von $<1\text{nmol/mg}$ Protein. Die Wiederfindungen im Inkubationsmedium lagen zwischen 85 und 95 %.

5.6.3 Diskussion der Aufnahmemessung

Die Daten zeigen, dass OTA in die Zelle gelangt. In der Literatur ist beschrieben, dass OTA an zytosolische Proteine bindet [Heussner et al., 2002], diese Bindung scheint durch die Proteinfällung während der Aufarbeitung nicht oder nur zum Teil gespalten zu werden, so dass OTA nicht frei im Zytosol vorliegt. Aufgrund der Bindung an Zellbestandteile war eine Quantifizierung von OTA in der Zelle nicht möglich. Die Aufarbeitung der Zentrifugationsrückstände führte nicht zu einer Freisetzung von OTA. Diese Aufarbeitung sollte zur Quantifizierung von OTA modifiziert werden, um Aussagen über die Verteilung in den Zellkompartimenten treffen zu können.

6 Diskussion und Ausblick

Die Induktion von Zytotoxizität durch OTA wurde über die Bestimmung von Membranintegrität, Wachstumshemmung und Apoptose untersucht. OTA zeigte außer nach 24stündiger Inkubation von V79-Zellen kein Potenzial, die Viabilität (Membranintegrität, Trypanblauausschluss) von Zelllinien nach Inkubationszeiten von 1 bzw. 24 h zu verringern (≤ 2000 bzw. ≤ 50 $\mu\text{mol/L}$). Mittels der Durchflusszytometrie nach Propidiumiodidfärbung wurde in CV-1-Zellen für 10 $\mu\text{mol/L}$ OTA eine Induktion von Nekrose gemessen. Dieser Befund könnte auf Unterschiede in den Testmethoden zurückzuführen sein, da für die Diskriminierung der Zellen anhand der Kontrollzellen manuell sog. Gates festgelegt und dadurch bei zu enger Festlegung viable Zellen nach Substanzinkubation fälschlicherweise als nekrotisch klassifiziert werden. Nach 24stündiger Inkubation wurde in beiden Zelllinien (V79 und CV-1) eine starke Wachstumshemmung mit IC_{50} -Werten um 2 $\mu\text{mol/L}$ gemessen. Da die Wachstumskurven und IC_{50} -Werte für beide Messmethoden (Proteinfärbung und Zellzahlbestimmung) gleich verlaufen, kann gefolgert werden, dass die in der Literatur beschriebene Proteinbiosynthesehemmung zu einer Reduktion der Zellzahlen bei etwa gleichbleibendem Proteingehalt der Zellen führt. Die Literaturdaten zeigen deutlich unterschiedliche IC_{50} -Werte (<1 – >80 $\mu\text{mol/L}$) für die Zytotoxizität in Abhängigkeit vom verwendeten Endpunkt und Testsystem. Teilweise sind höhere IC_{50} -Werte in der Literatur auf die Inkubationsbedingungen zurückzuführen, wenn in Gegenwart von FKS inkubiert wurde. Die gewonnenen Daten, wie auch die Literaturdaten zeigen, dass Nierenzellen bzw. Nierenzelllinien nicht per se aufgrund ihrer organspezifischen Herkunft sensitiver gegenüber OTA-induzierter Zytotoxizität sind, obwohl die Niere in vivo ein Hauptzielorgan für OTA-Toxizität ist.

Bei Konzentrationen über 1 $\mu\text{mol/L}$ OTA wurde nach einer Inkubationszeit von 24 h mittels eines immunchemischen Tests die Induktion von Apoptose beobachtet, die mit der Durchflusszytometrie nach Färbung der Zellen mit Annexin V/FITC bestätigt wurde. Auch in der Literatur ist die OTA-abhängige Induktion von Apoptose mit unterschiedlichen Testsystemen gezeigt worden.

Die zytotoxischen Effekte in CV-1-Zellen (Nekrose, Apoptose, Wachstumshemmung) sind in einem relativ eng begrenzten Konzentrationsbereich zu beobachten, treten also parallel auf. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass OTA in diesem Testsystem nicht spezifisch Apoptose oder Nekrose auslöst. In der Literatur gibt es keine vergleichenden Untersuchungen von Apoptose und Nekrose unter identischen Versuchsbedingungen. In einer Studie, in der die DNA-Fragmentierung (Pa-

parameter für Apoptose) mit der LDH-Freisetzung (Parameter für Membranintegrität) korreliert wurden, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Fragmentierung infolge von Apoptose zustande kam [Gekle et al., 2000]. Ein paralleles Auftreten von Nekrose und Apoptose ist aber aufgrund der Darstellung dieser Ergebnisse nicht auszuschließen.

Für das OTA-abhängige Auftreten von Nekrose oder Apoptose können als Mechanismen auch oxidativer Stress und DNA-Schädigung ursächlich sein. In der Literatur finden sich Hinweise auf die Induktion von oxidativem Stress durch OTA. Die Bildung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde ebenso beobachtet, wie eine erhöhte Lipidperoxidation (LPO) *in vitro* und *in vivo*. In zahlreichen Untersuchungen zur Toxizität von OTA wurden diese Effekte zudem durch Gabe von Antioxidantien oder antioxidativ wirksamen Enzymen verringert (s. Kap. 3.1.7.10).

Oxidativer Stress kann in einer Zelle zu einer Erniedrigung des Glutathionstatus (Verhältnis GSH/GSSG) führen. Die Bildung von GSSG wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Die nach einstündiger Inkubation beobachtete Abnahme des GSH-Gehaltes kann auf eine Depletion durch LPO-Produkte, z.B. Alkenale zurückgeführt werden, die OTA-abhängig gebildet wurden. Das Enzym, das den ersten Schritt der GSH-Biosynthese katalysiert (γ -Glutamylcystein-Synthetase), wird über Rückkopplungsmechanismen durch freies GSH in der Zelle gehemmt. Eine GSH-Depletion würde zu einer Neusynthese von GSH führen. Dies kann die Erhöhung des GSH-Gehaltes nach 24stündiger Inkubation erklären.

Eine erhöhte Rate an DNA-Strangbrüchen wurde in den verwendeten *in vitro*-Systemen nach Inkubation mit OTA nur in CV-1-Zellen nach einstündiger Inkubation mit hohen OTA-Konzentrationen und in der Fibroblastenzelllinie (V79) beobachtet. In MDCK-Zellen wurde die Induktion von Strangbrüchen nach Inkubation mit OTA mit dem Comet-Assay nachgewiesen [Lebrun & Föllmann, 2002], in primären Milzzellen und in DNA aus Leber, Niere und Milz von Mäusen wurden nach Behandlung mit OTA ebenfalls Strangbrüche mittels der alkalischen Filterelution detektiert [Creppy et al., 1985a]. Die im Rahmen dieser Studie gewählten Konzentrationen lagen aber deutlich höher als die in dieser Arbeit verwendeten. Lebrun und Föllmann wählten für den Comet-Assay eine verlängerte Elektrophoresezeit. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen also im Einklang mit den vorhandenen Literaturdaten.

Oxidative DNA-Schäden (FPG-sensitive Stellen) wurden in allen verwendeten *in vitro*-Testsystemen beobachtet, nach 24stündiger Inkubation wurden durch nied-

rige μmolare OTA-Konzentrationen eine deutliche oxidative DNA-Schädigung induziert. Die Induktion der oxidativen DNA-Schäden war mäßig stark ausgeprägt. Eine in der Literatur beschriebene Studie zeigt die Induktion oxidativer DNA-Schäden in LLC-PK1-Zellen. 8-OH-dG wurde mit einem qualitativen Färbetest nach einer Inkubation mit $15 \mu\text{mol/L}$ OTA für 24 h nachgewiesen [Schaaf et al., 2002]. Die Schlussfolgerung der Autoren stützt die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate.

OTA zeigte nach Inkubationszeiten von 1 bzw. 24 h kein Potenzial, die Membranintegrität primärer proximaler Tubuluszellen der Ratte (PNZ) zu verringern. Dies bestätigt die These, dass Nierenzellen nicht sensitiver gegenüber der OTA-vermittelten Toxizität sind als andere Zellen. Möglicherweise könnte dieser Effekt auf das Fehlen spezifischer Transporter für OTA in Nierenzelllinien zurückzuführen sein. Eine Erhöhung der DNA-Basisschäden durch OTA konnte in PNZ weder nach kurzer (1 h) noch längerer (24 h) Inkubation detektiert werden. Oxidative DNA-Schäden hingegen wurde nach beiden Inkubationszeiten nachgewiesen, in den Kurzzeitinkubationsexperimenten mit zwei unterschiedlichen Reparaturenzymen (FPG und Endo III). Nach einstündiger Inkubation waren in PNZ um den Faktor 20 niedrigere OTA-Konzentrationen ausreichend, um oxidative Schäden in der Größenordnung wie in Zelllinien zu induzieren. Dies zeigt eine wesentlich höhere Sensitivität der primären Nierenzellen. Nach 24stündiger Inkubation war keine erhöhte Sensitivität der PNZ im Vergleich zu den Zelllinien mehr feststellbar. Da die PNZ insgesamt 48 h kultiviert wurden, bis die DNA im Comet-Assay untersucht wurde, war möglicherweise der Stoffwechsel der Zellen soweit umgestellt, dass die PNZ sich in ihren Eigenschaften den Zelllinien angenähert hatten.

Aufgrund der in vitro-Ergebnisse ist davon auszugehen, dass OTA das Potenzial besitzt, neben der Generierung von ROS und der Induktion von LPO auch oxidative DNA-Schäden zu verursachen. Diese Schlussfolgerung wird bestätigt durch die Resultate des in Kooperation mit Dr. Turesky durchgeführten Tierversuchs. In der Leber und Niere von Ratten, die über vier Wochen mit OTA $0,03\text{-}0,3 \text{ mg/kg KG/d}$ behandelt wurden, zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Erhöhung FPG-sensitiver Stellen. Eine erhöhte Rate von direkten DNA-Strangbrüchen (Basisschäden) wurde unter diesen Bedingungen nicht induziert. In Mäusen, die einmalig $2,5 \text{ mg/kg KG}$ OTA erhielten, wurde 24 h nach der Gabe die Induktion von direkten DNA-Strangbrüchen in Leber, Niere und Milz gemessen [Creppy et al., 1985a]. Diese sind vermutlich auf die höhere Konzentration an OTA zurückzuführen.

Die beobachtete Induktion oxidativer DNA-Schäden unter den hier gewählten Bedingungen legt nahe, dass die oxidativen Schäden und deren Reparatur von höhe-

rer Relevanz für die Toxizität sind, als die direkten Strangbrüche. Eine Induktion oxidativer DNA-Schäden ist grundsätzlich als prämutagenes Ereignis und insbesondere im Zusammenhang mit der Nephrotoxizität *in vivo* als relevant für die Tumorentstehung anzusehen. Die Induktion von oxidativem Stress, Nierentoxizität und Zellproliferation könnten evtl. einen alternativen Mechanismus der Nierenkanzerogenität von OTA darstellen. Verschiedene nicht-genotoxische Substanzen (z.B. Eisen(III)nitrilotriacetat und Kaliumbromat), die keiner Biotransformierung unterliegen, induzieren renale Tumoren unter Beteiligung von oxidativem Stress und Zytotoxizität. Es zeigen sich dabei Parallelen im Phänotyp der Tumoren, die in der Ratte durch OTA ausgelöst werden [Dietrich & Swenberg, 1993; Hard, 1998; Kurokawa et al., 1983, 1990; Li et al., 1987; Umemura et al. 1998; Wolf et al, 1998]. Die der Zytotoxizität folgende, erhöhte Proliferation wurde im Tubulusepithel von Ratten beobachtet [Boorman, 1989] und könnte so zur Tumorigenese in der Niere beitragen. Die in der vorliegenden Arbeit im Comet-Assay gefundenen oxidativen DNA-Schäden geben also möglicherweise einen ersten mechanistischen Hinweis auf die nierenkanzerogene Wirkung von OTA. Die *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass die Konzentrationen, die in den Zellen oxidative DNA-Schäden verursachen, etwas niedriger sind (Faktor 5), als die Konzentrationen, die zytotoxische Effekte induzieren. Beide Wirkungen sind für die Tumorentstehung durch OTA relevant, die oxidativen Schäden führen möglicherweise nicht nur zu initiiierenden Ereignissen (Mutationen), sondern auch zum Zelltod und somit zur Proliferation *in vivo*.

Die humane Belastung lässt sich über Plasmakonzentrationen messen, die im unteren nanomolaren Bereich liegen. 2,5 nmol/L OTA entspricht einer Blutkonzentration von 1 ng/mL Serum, die in Menschen gefunden wurde. Da beim Menschen aber aufgrund der stetigen Aufnahme und der langen biologischen Halbwertszeit von OTA von einer Dauerbelastung ausgegangen werden muss, könnten schon diese sehr viel niedrigeren Konzentrationen eine Rolle für die Tumorentstehung im Menschen spielen. Epidemiologische Studien ergaben Hinweise, dass OTA eine wichtige von mehreren Ursachen für die endemische Balkannephropathie ist. Unklar ist aber, ob OTA aufgrund genotoxischer Effekte eine obligate Rolle in der Genese dieser Krankheit spielt.

Da die in dieser Arbeit vorgestellten oxidativen DNA-Schäden aber *in vitro* schon bei niedrigeren Konzentrationen detektierbar sind, als die zytotoxischen Effekte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass OTA auch initiiierende Eigenschaften besitzt, also über oxidative Schädigung Mutationen auslösen kann. Da jede Zelle umfangreiche Schutz- und Reparaturmechanismen gegen oxidative DNA-Schädigung besitzt, kann eine Beeinträchtigung dieser Mechanismen im Zusammenhang mit

OTA-induzierten DNA-Schäden zu Mutationen führen. Eine Ursache für eine OTA-abhängige Beeinträchtigung dieser Schutzmechanismen könnte in der in zahlreichen Studien gezeigten Hemmung der Proteinbiosynthese liegen. Obwohl die Ergebnisse zur Zytotoxizität in dieser Arbeit keinen Schluss auf einen erniedrigten Proteingehalt der Zellen nach OTA-Inkubation zulassen, sollte in weiterführenden Studien der Einfluss der Proteinsynthesehemmung durch OTA auf die antioxidative Abwehr von Zellen untersucht werden, um Klarheit zu gewinnen, ob die Kanzerogenität von OTA über die Induktion oxidativer (DNA-) Schäden im Zusammenwirken mit der Proteinsynthesehemmung zustande kommt.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur DNA-schädigenden Wirkung und Zytotoxizität von OTA stützen die These, dass OTA nicht über einen spezifischen genotoxischen Mechanismus seine Wirkung entfaltet, sondern dass die OTA-Toxizität und -Kanzerogenität ein multifaktorielles Geschehen ist. Ob dies dazu führen könnte, eine Schwellenkonzentration zu bestimmen, unter der keine nachteilige Wirkung durch OTA zu erwarten ist, ist gegenwärtig offen. Auf Basis solcher nicht-wirksamen Dosen (NOEL) im Tierversuch wurden akzeptierbare Aufnahmemengen und nachfolgend Grenzwerte für OTA in Lebensmitteln berechnet. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Dosen, die im Tierversuch eine Wirkung entfalteten, liegen oberhalb der niedrigsten NOEL, die in der Literatur beschrieben sind. Allerdings wurden oxidative DNA-Schäden schon in der niedrigsten eingesetzten Dosis detektiert, so dass ein NOEL für die Induktion von oxidativen DNA-Schäden in dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnte.

7 Zusammenfassung

Ochratoxin A (OTA) ist ein nierentoxisches und nierenkanzerogenes Schimmelpilzgift, das von verschiedenen *Aspergillus*- und *Penicillium*-Stämmen, vor allem *A. ochraceus* und *P. verrucosum*, gebildet wird. Kontaminationen mit OTA sind vor allem in pflanzlichen Produkten wie Getreide und Getreideprodukte, Kaffee, Traubensaft und Wein, Bier, Nüsse, Gewürze aber auch in Fleisch nachweisbar. Verbraucher nehmen in Deutschland wöchentlich ca. 5 ng/kg KG OTA auf. Die toxischen Wirkungen von OTA sind stark spezies- und geschlechtsabhängig, so wurden für die akute Toxizität LD₅₀-Werte von 0,2 bis 60 mg/kg KG gefunden. In subakuten und subchronischen Studien wurde ausgeprägte Nierentoxizität gezeigt, in Langzeitstudien erwies sich OTA als eines der potentesten Nierenkanzerogene in der männlichen Ratte. Des Weiteren ist OTA als immunsuppressiv, teratogen, neurotoxisch und hepatokanzerogen beschrieben. Eine Beteiligung von OTA an der beim Menschen auftretenden endemischen Balkannephropathie (BEN) wird diskutiert. Der Mechanismus der kanzerogenen Wirkung von OTA ist noch immer unklar. Die in Studien zur Genotoxizität erhaltenen, widersprüchliche Resultate könnten möglicherweise auf sekundäre Mechanismen wie oxidativem Stress zurückzuführen sein. Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und die Induktion von Lipidperoxidation wurde beobachtet, eine Reihe toxischer Effekte in vitro und in vivo war durch Gabe von Antioxidantien abgeschwächt.

Ziel dieser Arbeit war, in einem Zellsystem unter identischen Bedingungen verschiedene Parameter für Zytotoxizität vergleichend zu untersuchen. Durch die vergleichende Untersuchung der verschiedenen Endpunkte im gleichen Zellsystem unter identischen Versuchsbedingungen sollte die Bedeutung der einzelnen Prozesse für die Toxizität beurteilt werden. Zudem sollte in verschiedenen Zellsystemen das Potenzial von OTA zur Induktion von (oxidativen) DNA-Schäden untersucht werden. In einem Tierversuch sollte überprüft werden, ob OTA auch in Ratten die DNA in Leber und Niere (oxidativ) schädigt.

Mit verschiedenen Endpunkten (Nekrose, Wachstumshemmung, Apoptose) wurde in Zelllinien (V79: Hamsterlungenfibroblasten, CV-1) und in primären proximalen Tubuluszellen der Ratte (PNZ), die durch Nierenperfusion gewonnen wurden, die Induktion von Zytotoxizität durch OTA untersucht. OTA zeigte in Kurzzeitinkubations-Experimenten (1 h) kein Potenzial, die Viabilität von Zelllinien und PNZ zu verringern. Nach 24stündiger Inkubation war nur in V79-Zellen die Membranintegrität (Trypanblauausschluss) beeinträchtigt. Eine starke Wachstumshemmung mit IC₅₀-Werten um 2 µmol/L wurde in beiden verwendeten Zelllinien gemessen. Mittels

eines immunchemischen Tests wurde bei Konzentrationen über 1 $\mu\text{mol/L}$ OTA (24 h) die Induktion von Apoptose beobachtet, die mit der Durchflusszytometrie nach Färbung der Zellen mit Annexin V/FITC bestätigt wurde. Die in CV-1-Zellen beobachteten Parameter für Zytotoxizität, insbesondere die durchflusszytometrischen Untersuchungen, zeigten, dass die Effekte in einem relativ eng begrenzten, $\mu\text{molaren}$ Konzentrationsbereich zu beobachten sind. Sie treten parallel auf, woraus gefolgert werden kann, dass OTA nicht spezifisch Nekrose oder Apoptose auslöst. Zu den Mechanismen, über die unspezifisch Nekrose und Apoptose in Zellen induziert werden kann, gehören z.B. oxidativer Stress und DNA-Schädigung.

Mit Hilfe des Comet-Assays wurde in den Zelllinien und PNZ die Induktion von (oxidativen) DNA-Schäden durch OTA untersucht. Die DNA-Basischädigung war nur nach Kurzzeitinkubation (1h) mit sehr hohen OTA-Konzentrationen ($\geq 500 \mu\text{mol/L}$) in den Zelllinien bzw. nach 24 h in V79-Zellen erhöht. In PNZ und in vivo zeigte sich keine Erhöhung der Basischäden. FPG-sensitive Stellen in der DNA wurden in allen verwendeten in vitro-Testsystemen nachgewiesen, in PNZ nach einstündiger Inkubation mit zwei unterschiedlichen Reparaturenzymen (FPG und Endo III). Nach einstündiger Inkubation waren PNZ deutlich sensitiver gegenüber der Induktion von oxidativen DNA-Schäden (ca. Faktor 20) als die Zelllinien. Dies deutet darauf hin, dass die PNZ im Vergleich zu den Zelllinien stoffwechselbedingte Besonderheiten aufweisen (z.B. metabolische Kompetenz), die die erhöhte Sensitivität bedingen. Nach 24stündiger Inkubation mit OTA lagen die Konzentrationen, die in den Zelllinien und den PNZ oxidative DNA-Schäden induzierten in einem vergleichbaren $\mu\text{molaren}$ Bereich. Der Verlust der erhöhten Sensitivität der PNZ könnte auf die insgesamt 48stündige Kultivierung, mit der eine Umstellung des Stoffwechsels einhergeht, zurückzuführen sein.

Das gemeinsame Auftreten von oxidativem Stress, Nierentoxizität und Zellproliferation könnten evtl. einen alternativen Mechanismus der Nierenkanzerogenität von OTA bilden. In Kooperation mit Dr. Turesky (NCTR, Jefferson, USA) wurde ein Tierversuch durchgeführt, in dem das DNA-schädigende Potenzial von OTA in Leber und Niere von Ratten, die über vier Wochen mit OTA behandelt worden waren, untersucht wurde. Die mit dem Comet-Assay in den Organen dieser Tiere gefundenen oxidativen DNA-Schäden, die grundsätzlich als prämutagenes Ereignis angesehen werden können, geben also möglicherweise einen ersten mechanistischen Hinweis auf die nierenkanzerogene Wirkung von OTA. Untermauert wird dies durch die beobachtete Abnahme des GSH-Gehaltes, die evtl. auf eine Depletion durch LPO-Produkte zurückzuführen ist. Nach 24stündiger Inkubation wurde eine Erhöhung des GSH-Gehaltes in den inkubierten CV-1-Zellen gemessen, die

mit einer GSH-Neusynthese als Gegenreaktion zum oxidativen Stress begründet werden kann.

Die in vitro Untersuchungen zeigen, dass die Konzentrationen, die in den Zellen oxidative DNA-Schäden verursachen, etwas niedriger sind (Faktor 5), als die Konzentrationen, die zytotoxische Effekte induzieren. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass OTA über die Bildung oxidativer DNA-Schäden auch initiierendes Potenzial besitzt. In diesem Zusammenhang wäre zu klären, ob die in der Literatur beschriebene Proteinbiosynthesehemmung sich auf die antioxidative Abwehr in Zellen und Organismen auswirkt, so dass induzierte oxidative DNA-Schäden möglicherweise nicht mehr ausreichend repariert werden können und es so zur Tumorentstehung in vivo kommt.

Zwar konnte im Rahmen des in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuchs kein NOEL bestimmt werden, dennoch liegen die verwendeten Dosen ($> 30 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) über den niedrigsten NOEL ($8 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$), die in der Literatur beschrieben sind. Eine Neubewertung der auf der Basis der NOEL bestimmten ADI- und Grenzwerte erscheint also nicht notwendig. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass OTA nicht direkt genotoxisch wirkt, da in diesem Fall ein Minimierungsansatz zum Schutz des Verbrauchers gewählt werden müsste. Die hier vorgestellten Ergebnisse stützen die Hypothese, dass es sich bei der OTA-Kanzerogenese um ein multifaktorielles Geschehen handelt, obwohl mögliche initierende Eigenschaften nicht sicher ausgeschlossen werden können.

8 Literatur

Abdel-Wahhab M.A.; Nada S.A.; Arbid M.S. (1999) Ochratoxicosis: Prevention of developmental toxicity by L-methionine in Rats. *Journal of Applied Toxicology* **19**: 7-12

Aced G., Möckel H.J. (1991) *Liquidchromatographie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1. Auflage

Adlouni C.: s. El Adlouni

Achour A.; El-May M.; Bacha H.; Hamammi M.; Maaroufi K.; Creppy E.E. (1993) Néphropathies interstitielles chroniques. Approches cliniques et étiologiques: ochratoxine A. In: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque N-SERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 227-234

Akerboom T.P.M.; Sies H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology* **77**: 373-382

Albassam M.A.; Yong S.I.; Bhatnagar R.; Sharma A.K.; Prior M.G. (1987) Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats. *Veterinary Pathology* **24/5**: 427-435

Aleo M.D.; Wyatt R.D.; Schnellmann R.G. (1991) Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules. *Toxicology and Applied Pharmacology* **107/1**: 73-80

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (1999a, b) Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Ochratoxin A in Getreide und Getreideprodukten. DIN EN ISO 15141 Teile 1 und 2: 15.00

Appelgren L.E.; Arora R.G. (1983) Distribution of ¹⁴C-labelled ochratoxin A in pregnant mice. *Food and Chemical Toxicology* **21/5**: 563-568

Apostolov K.; Spasic P.; Bojanic N. (1975) Evidence of a viral aetiology in endemic (Balkan) nephropathy. *The Lancet*: 1271-1273

Ardus J.A.; Gillman I.G.; Manderville R.A. (1998) On the role of copper and iron in DNA cleavage by ochratoxin A. Structure-activity relationships in metal binding and copper-mediated DNA cleavage. *Can. J. Chem.* **76**: 907-918

Arora R.G.; Frölen H. (1981) Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. *Acta Veterinaria Scandinavica* **22**: 535-552

Atroshi F.; Biese I.; Saloniemi H.; Ali-Vehmas T.; Saari S.; Rizzo A.; Veijalainen P. (2000) Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Science* **3/3**: 281-291

Auffray Y.; Boutibonnes P. (1986) Evaluation of the genotoxic activity of some mycotoxins using *Escherichia coli* in the SOS spot test. *Mutation Research* **171**: 79-82

Azémar B.; Pinelli E.; Escourrou G.; Plante P.; Pfohl-Leszkovicz A. (1997) Evidence that DNA adducts in some human kidney tumours in France are related to ochratoxin A. *Mutation Research* **379/Suppl.1**: PXVI A.13

Bacha H.; Maaroufi K.; Achour A.; Hamammi M.; Ellouz F.; Creppy E.E. (1993) Ochratoxines et ochratoxicoses humaines en Tunisie. In: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, ed. By Creppy

E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 111-121

Bacon C.W.; Robbins J.D.; Burdick D. (1975) Metabolism of glutamic acid in *Aspergillus ochraceus* during the biosynthesis of ochratoxin A. *Applied Microbiology* **29/3**: 317-322

Bailey C.A.; Gibson R.M. (1989) Ochratoxin A and dietary protein. 2. Effects on hematology and various clinical chemistry measurements. *Poultry Science*: 1664-1671

Barnikol H.; Thalmann A. (1988) Clinical Observations in the pig in relation to the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Tierärztliche Umschau* **43**: 74-82. Aus: IPCS (2001)

Bartsch H.; Malaveille C.; Camus A.-M.; Martel-Planche G.; Brun G.; Hautefeuille A.; Sabadie N.; Barbin A.; Kuroki T.; Drevon C.; Piccoli C.; Montesano R. (1980) Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. typhimurium* strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. *Mutation Research* **76**: 1-50

Baudrimont I.; Betbeder A.-M.; Gharbi A.; Pfohl-Leszkowicz A.; Dirheimer G.; Creppy E.E. (1993) Influence de la superoxyde dismutase associée à la catalyse sur la néphrotoxicité induite par l'ochratoxin A chez le rat. In: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 189-198

Baudrimont I.; Betbeder A.-M.; Gharbi A.; Pfohl-Leszkowicz A.; Dirheimer G.; Creppy E.E. (1994) Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* **89**: 101-111

Baudrimont I.; Ahouandjivo R.; Creppy E.E. (1997a) Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents. *Chemico-Biological Interactions* **104**: 29-40

Baudrimont I.; Betbeder A.-M.; Creppy E.E. (1997b) Reduction of the ochratoxin A-induced cytotoxicity in Vero-cells by aspartame. *Archives of Toxicology*, **71**: 290-298

Baudrimont I.; Portilla I.; Creppy E.E. (2000) Involvement of the p53 tumour-suppressor gene

Baudrimont I.; Sostaric B.; Yenot C.; Betbeder A.-M.; Dano-Djedje S.; Sanni A.; Steyn P.S.; Creppy E.E. (2001) Aspartame prevents the karyomegaly induced by ochratoxin A in rat kidney. *Archives of Toxicology*, **75/3**: 176-183

Bauer J.; Gareis M. (1987) Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *Journal of Veterinary Medicine B*, **34**: 613-627

Becker B. F. (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology & Medicine* **14**: 615-631

Belicza M.; Radonic M.; Radosevic Z (1979) Pathoanatomical findings in kidneys of persons who died from endemic nephropathy. In: Danilovic V. (ed.) *Proceedings of the 2nd Symposium on Endemic Nephropathy*, Belgrad: Serbian Academy of Science and Arts: 103-108. Aus: IPCS (2001)

Belitz H.-D.; Grosch W.; Schieberle P. (2001) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Belmadani A.; Tramu G.; Betbeder A.M.; Steyn P.S.; Creppy E.E. (1998a) Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain. *Archives of Toxicology* **72/10**: 656-662

- Belmadani A.**; Tramu G.; Betbeder A.M.; Creppy E.E. **(1998b)** Subchronic effects of ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by aspartam, a sweetener. *Human Experimental Toxicology* **17/7**: 380-386
- Belmadani A.**; Steyn P.S.; Tramu G.; Betbeder A.-M.; Baudrimont I.; Creppy E.E. **(1999)** Selective toxicity of ochratoxin A in primary cultures from different brain regions. *Arch. Toxicol.* **73**: 108-114
- Benamira M.**, Johnson K., Chaudhary A., Bruner K., Tibbetts C., Marnett L. J. **(1995)** Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: Determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* **16/1**: 93-99
- Bendele A.M.**; Carlton W.W.; Krogh P. Lillehoj E.B. **(1985a)** Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J × C3H)F₁ mouse. *Journal of the National Cancer Institute of America* **75, 4**: 733-742
- Bendele A.M.** **(1985b)** Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. *Food and Chemical Toxicology* **23/10**: 911-918
- Benesic A.**; Mildenerger S.; Gekle M. **(2000)** Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflügers Arch - Eur. J. Physiol.* **439**: 278-287
- Berg J.M.**; Tymoczko J.L.; Stryer L. **(2001)** *Biochemistry*. W.H. Freeman & Co., New York
- Berndt W.O.**; Hayes A.W. **(1979)** In vivo and in vitro changes in renal function caused by ochratoxin A in the rat. *Toxicology* **12**: 5-17
- Besten s. den Besten**
- Blanc M.**; Pittet A.; Munoz-Box R.; Viani R. **(1998)** Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46/2**: 673-675
- Blüthgen A.** **(1998)** Mykotoxine in Lebensmitteln. *Umweltmedi. Forsch. Prax.* **3b**: 331-340
- Boorman G.A.**; Hong H.L.; Dieter M.P.; Hayes H.T.; Pohland A.E.; Stack M.; Luster M.I. **(1984)** Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicology and Applied Pharmacology* **72/2**: 304-312
- Boorman G.A.** **(1989)** Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. NTP Technical Report 358, NIH Publication No. 89-2813
- Boorman G.A.**; McDonald M.R.; Imoto S.; Persing R. **(1992)** Renal lesions induced by Ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicologic Pathology* **20, 2**: 236-245
- Borso G.** **(1996)** Characteristics of clinical data on endemic nephropathy. In: Cvorisec D.; Ceovic S.; Stavljenic-Rukavina A. (eds.) *Endemic Nephropathy in Croatia*, Zagreb: Academia Croatica Scientiarum Medicarum: 73-75. Aus: IPCS (2001)
- Bose S.**; Sinha S.P. **(1994)** Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C. *Food and Chemical Toxicology* **32, 6**: 533-537
- Boudra H.**; Le Bars P.; Le Bars J. **(1995)** Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **61/3**: 1156-1158

- Braunberg** R.C.; Gantt O.; Barton C.; Friedman L. (1992) In vitro effects of the Nephrotoxins Ochratoxin A and Citrinin upon biochemical function of porcine kidney. Arch. Environm. Contam. Toxikol. **22**: 464-470
- Braunberg** R.C.; Barton C.N.; Gantt O.O.; Friedman L. (1994) Interaction of citrinin and ochratoxin A. Natural Toxins **2/3**: 124-131
- Breitholtz-Emanuelsson** A.; Fuchs R.; Hult K.; Appelgren L.E. (1992) Synthesis of 14C-ochratoxin A and 14C-ochratoxin B and a comparative study of their distribution in rats using whole body autoradiography. Pharmacol. Toxicol. **70/4**: 255-261
- Breitholtz-Emanuelsson** A.; Palminger-Hallen I.; Wohlin P.O.; Oskarsson A.; Hult K.; Olsen M. (1993a) Transfer of ochratoxin A from lactating rats to their offspring: a short-term study. Natural Toxins **1/6**: 347-352
- Breitholtz-Emanuelsson** A.; Olsen M.; Oskarsson A.; Palminger I.; Hult K. (1993b) Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. Journal of the Association of Analytical Communities **76/4**: 842-846
- Breitholtz-Emanuelsson** A.; Minervini F.; Hult K.; Visconti A. (1994) Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. Natural Toxins **2/6**: 366-370
- Breitholtz-Emanuelsson** A.; Fuchs R.; Hult K. (1995) Toxicokinetics of ochratoxin A in rat following intratracheal administration. Natural Toxins **3**: 101-103
- Brendler-Schwaab** S.; Schmezer P.; Liegibel U.; Weber S.; Michalek K.; Tompa A.; Pool-Zobel B.L. (1994) Cells of different tissues for in vitro and in vivo studies of isolation methods. Toxicology in Vitro **8**, 6: 1285-1302
- Brendler-Schwaab** S.; Herbold B.A. (1997) A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the comet assay. Mutation Research **393**: 175-178
- Bresch** H.; Urbanek M.; Hel K. (2000) Ochratoxin A in Kaffee, Tee und Bier. Archiv für Lebensmittelhygiene **51**: 89-94
- Brian** P.W.; Dawkins A.W.; Grove J.F.; Hemming H.G.; Lowe D.; Norris G.L.F. (1961) Phytotoxic compounds produced by fusarium equiseti. Journal of Experimental Botany **12/34**: 1-12
- Brown** T.P.; Manning R.O.; Fletcher O.J.; Wyatt R.D. (1986) The individual and combined effects of citrinin and ochratoxin A on renal ultrastructure in layer chicks. Avian Diseases **30/1**: 191-198
- Bruinink** A.; Sidler C. (1997a) The neurotoxic effects of ochratoxin A are reduced by protein binding but are not effected by L-phenylalanine. Toxicology and Applied Pharmacology **146**: 173-179
- Bruinink** A.; Rasonyi T.; Sidler C. (1997b) Reduction of ochratoxin A toxicity by heat-induced epimerization. In vitro effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell cultures. Toxicology **118/2-3**: 205-210
- Bruinink** A.; Rasonyi T.; Sidler C. (1998) Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-alpha in vitro. Natural Toxins **6/5**: 173-177

- Bunge I.**; Dirheimer G.; Rösenthaller R. (1978) In vivo and in vitro inhibition of protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **83/2**: 398-405
- Calcutt M.W.**; Gillman I.G.; Nofle R.E.; Manderville R.A. (2001) Electrochemical oxidation of ochratoxin A: Correlation with 4-chlorophenol. *Chemical Research on Toxicology* **14**: 1266-1272
- Campbell M.L. Jr.**; May J.D.; Huff W.E.; Doerr J.A. (1983) Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poultry Science* **62/11**: 2138-2144
- Castegnaro M.**; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (1991) Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon
- Castegnaro M.**; Mohr U.; Pfohl-Leszkowicz A.; Estève J.; Steinmann J.; Tillmann T.; Michelon J.; Bartsch H. (1998) Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *International Journal of Cancer* **77**: 70-75
- Ceovic S.**; Hrabar A.; Radonic M. (1985) An etiological approach to Balkan Endemic Nephropathy based on the investigation of two genetically different populations. *Nephron* **40**: 175-179
- Ceovic S.**; Hrabar A.; Saric M. (1992) Epidemiology of balkan endemic nephropathy. *Food and Chemical Toxicology* **30, 3**: 183-188
- Ceovic S.**; Mitelic-Medev M. (1996) Epidemiological features of endemic nephropathy in the focal area of Brodska Posovina, Croatia. In: Cvorisec D.; Ceovic S.; Stavljenic-Rukavina A. (eds.) Endemic nephropathy in Croatia. *Academia Croatica Scientiarum Medicarum*, Zagreb: 7-21, aus Pfohl-Leszkowicz (2002b)
- Chakor K.**; Creppy E.E.; Dirheimer G. (1988) In vivo studies on the relationship between hepatic metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Archives of Toxicology* **Suppl.12**: 201-204
- Charoenpornsook K.**; Fitzpatrick J.L.; Smith J.E. (1998) The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mycopathologia* **143/2**: 105-111
- Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe** (2000) Ochratoxin A. In: Jahresbericht 2000: **3.2**
- Chen X.**; Ding Y.W.; Yang G.; Bondoc F.; Lee M.-J.; Yang C.S. (2000) Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* **21, 2**: 257-263
- Chernozemsky I.N.**; Stoyanov I.S.; Petkova-Bocharova T.K.; Nicolov I.G.; Draganov I.V.; Stoichev I.I.; Tanchev Y.; Naidenov D.; Kalcheva N.D. (1977) Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district, Bulgaria. *International Journal of Cancer* **19**: 1-11
- Chernozemsky I.N.**; Petkova-Bocharova T.; Nikolov I.G.; Stoyanov I.S. (1978a) Familial aggregation of urinary system tumors in a region with endemic nephropathy. *Cancer Research* **38/4**: 965-968
- Chernozemsky I.N.**; Petkova-Bocharova T.; Stoyanov I.S.; Nikolov I.G. (1978b) Epidemiological data for environmental determination of urinary system tumours and nephropathy in an endemic region. *Archiv für Geschwulstforschung* **48/8**: 756-760

- Choisy-Rossi C.**; Yonish-Rouach E. (1998) Apoptosis and the cell cycle: the p53 connection. *Cell Death and Differentiation* **5/2**: 129-131
- Cholmakov-Bodechtel C.**; Wolff J.; Gareis M.; Bresch H.; Engel G.; Majerus P.; Rosner H.; Schneider R. (2000) Ochratoxin A: Representative food consumption survey and epidemiological analysis. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **51/4-5**: 111-115
- Chu F.S.** (1974) Comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum albumin. *Chemical Pharmacology*, **23**: 1105-1113
- Collins A.R.**; Dušinská M.; Gedik C.M.; Štetina R. (1996) Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives* **104**: 465-469
- Cooray R.** (1984) Effects of some mycotoxins on mitogen-induced blastogenesis and SCE frequency in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* **22/7**: 529-534
- Creppy E.E.**; Lugnier A.A.J.; Beck G.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1979a) Action of ochratoxin A on cultured hepatoma cells – reversion of inhibition by phenylalanine. *FEBS Letters* **104/2**: 287-290
- Creppy E.E.**; Schlegel M.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1979b) Preventive action of phenylalanine on acute intoxication of ochratoxin A. *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences* **289/13**: 915-918
- Creppy E.E.**; Lugnier A.A.J.; Fasiolo F.; Heller K.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1979c) In vitro inhibition of yeast phenylalanine-tRNA synthetase by ochratoxin A. *Chemico-Biological Interactions* **24**: 257-261
- Creppy E.E.**; Lorkowski G.; Beck G.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1980a) Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells. *Toxicology Letters* **5/6**: 375-380
- Creppy E.E.**; Schlegel M.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1980b) Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin A in mice. *Toxicology Letters* **6/2**: 77-80
- Creppy E.E.**; Stoermer F.C.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1983a) Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin α , on immune response in mice. *Infection and Immunity* **39/3**: 1015-1018
- Creppy E.E.**; Stoermer F.C.; Kern D.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1983b) Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions* **47/2**: 239-247
- Creppy E.E.**; Kern D.; Steyn P.S.; Vlegaar R.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1983c) Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicology Letters* **19/3**: 217-224
- Creppy E.E.**; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1984) Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food and Chemical Toxicology* **22, 11**: 883-886
- Creppy E.E.**; Kane A.; Dirheimer G.; Lafarge-Frayssinet C.; Mousset S.; Frayssinet C. (1985a) Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicology Letters* **28**: 29-35

- Creppy E.E.; Kane A.; Dirheimer G.; Lafarge-Frayssinet C.; Mousset S.; Frayssinet C. (1985b)** DNA damage in the spleen, liver and kidneys of mice treated with ochratoxin A. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **179/5**: 688-695
- Creppy E.E.; Kane A.; Giessen-Crouse E.; Roth A.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1986)** Effect of ochratoxin A on enzyme activities and macromolecules synthesis in MDCK cells. *Archives of Toxicology* **9 (Suppl.)**: 310-314
- Creppy E.E.; Chakor K.; Fisher M.J.; Dirheimer G. (1990)** The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo. *Archives of Toxicology* **64**: 279-284
- Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993a)** Human ochratoxicosis and its pathologies. *Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.* **231**
- Creppy E.E.; Castegnaro M.; Grosse Y.; Mériaux J.; Manier C.; Moncharmont P.; Waller C. et al. (1993b)** Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France: Alsace, Aquitaine et région Rhône-Alpes. In: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) *Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.* **231**: 147-158
- Creppy E.E.; Baudrimont I.; Betbeder A.-M. (1995)** Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant. *Toxicology Letters* **82-83**: 869-877
- Creppy E.E.; Baudrimont I.; Betbeder A.-M. (1998)** How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A. *Journal of Toxicological Sciences*, **23, II**: 165-172
- CVUA (2000)**: s. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe
- Dai J.; Park G.; Wright M.W.; Adams M.; Akman S.A.; Manderville R.A. (2002)** Detection and Characterization of a glutathione conjugate of ochratoxin A. *Chemical Research in Toxicology* **15**: 1581-1588
- Dai J.; Wright M.W.; Manderville R.A. (2003a)** Ochratoxin A forms a carbon-bonded C8-deoxyguanosine nucleoside adduct: Implications for C8 reactivity by a phenolic radical. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 3716-3717
- Dai J.; Wright M.W.; Manderville R.A. (2003b)** An oxygen-bonded C8-deoxyguanosine nucleoside adduct of pentachlorophenol by peroxidase activation: Evidence for ambident c(reactivity by phenoxyradicals. *Chemical Research in Toxicology* **16**: 817-821
- Danilovic V.; Djuricic M.; Mokranjac M.; Stojimirovic B.; Zivojinovic J.; Stojakovic P. (1957)** Néphrites chroniques provoquées par l'intoxication au plomb par voie digestive (farine). *La Presse Medical* **65**: 2039-2040
- Darzynkiewicz Z.; Bruno S.; Del Bino G.; Gorczyca W.; Hotz M.A.; Lassota P.; Traganos F. (1992)** Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **13**: 795-808
- Darzynkiewicz Z.; Juan G.; Li X.; Gorczyca W.; Murakami T.; Traganos F. (1997)** Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27**: 1-20
- de Groene E.M.; Hasing I.G.A.M.; Blom M.J.; Seinen W.; Fink-Gremmels J.; Horbach G.J. (1996a)** Development of human cytochrome P450-expressing cell lines: Application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Research* **56**: 299-304

- de Groene** E.M.; Jahn A.; Horbach G.J.; Fink-Gremmels J. (1996b) Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **1**: 21-26
- Deberghes** P.; Deffieux G.; Gharbi A.; Betbeder A.M.; Boisard F.; Blanc R.; Delaby J.F.; Creppy E.E. (1993) Détoxification de l'ochratoxin A par des moyens physiques, chimiques et enzymatiques. In: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G.. INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 75-82
- Dedon** P.C., Plastaras J.P., Rouzer C.A., Marnett L.J. (1998) Indirect mutagenesis by oxydative DNA damage: Formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 11113-11116
- Degen** G.H.; Gerber M.M.; Obrecht-Pflumio S.; Dirheimer G. (1997) Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Archives of Toxicology* **71**: 365-371
- Delves** P. J., Roitt I. M. (2000): *Advances in Immunology, The immune system*. New England Journal of Medicine **343** (1): 37-49
- den Besten** C.; Smink M.C.C.; de Vries E.J.; van Bladeren P.J. (1991) Metabolic activation of 1,2,4-trichlorobenzene and pentachlorobenzene by rat liver microsomes: A major role for quinone metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* **108**: 223-233
- Deutsche** Forschungsgemeinschaft (DFG) (1990) Ochratoxin A – Vorkommen und toxikologische Bedeutung. In: *Lebensmittel und Gesundheit, Mitteilung 3 der Senatskommission zur Prüfung von Lebensmittelzusatz- und Inhaltsstoffen*, Wiley-VCH
- Deutsche** Forschungsgemeinschaft (DFG) (1998) Mykotoxine. Mitteilung 12 der SKLM, Wiley-VCH
- Deutsche** Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) (1996) Ernährungsbericht 1996.
- Di Paolo** N.; Guarnieri A.; Loi F.; Sacchi G.; Mangiarotti A.M.; Di Paolo M. (1993) Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. *Nephron* **64**: 621-625
- Dieber** F.; Köfer J. (1999) Ochratoxin A-Nachweis im Serum steirischer Schlachtschweine. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **95/8**: 327-329
- Dietrich** D.R.; Swenberg J.A. (1991) Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by non-genotoxic agents: predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens. *Mutation Research* **248/2**: 239-260
- Dietrich** D.R.; Rasonyi T. (1995) Preneoplastic lesions in kidney and carcinogenesis by non-genotoxic compounds. In: Degen G.H.; Seiler J.P.; Bentley P. (eds.) *Toxicology in Transition*. *Archives of Toxicology, Suppl.* **17**: 536-546
- Dietrich** D.R.; O'Brien E.; Stack M.E.; Heussner A.H. (2001) Species- and sex-specific renal cytotoxicity of ochratoxin A and B in vitro. *Experimental a Toxicology and Pathology* **53**: 215-225
- Dirheimer** G.; Creppy E.E. (1991) Mechanism of action of ochratoxin A. In: Castegnaro M.; Plesztina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky IN.; Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 171-186
- Dirheimer** G. (1996) Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. *Food Additives and Contaminants* **13/Suppl.**: 45-48

- Dirheimer G. (1998)** Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Revue Méd. Vét.* **149**, 6: 605-616
- Dive C.; Gregory C.D.; Phipps D.J.; Evans D.L.; Milner A.E.; Wyllie A.H. (1992)** Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta* **1133**: 275-285
- Djokic M.; Hadzi-Djokic J.; Nikolic J.; Dragicevic D.; Radivojevic D. (1999)** Progress in Urology **9/1**: 61-68
- Dörrenhaus A.; Föllmann W. (1997)** Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. *Archives of Toxicology* **71**: 709-713
- Dörrenhaus A.; Flieger A.; Golka K.; Schulze H.; Albrecht M.; Degen G.H.; Föllmann W. (2000)** Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A. *Toxicological Sciences* **53**: 271-277
- Dopp. E.; Müller J.; Hahnel C.; Schiffmann D. (1999)** Induction of genotoxic effects and Modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblasts caused by ochratoxin A. *Food and Chemical Toxicology* **37**: 713-721
- Dortant P.M.; Peters-Volleberg G.W.M.; Van Loveren H.; Marquardt R.R.; Speijers G.J.A. (2001)** Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. *Food and Chemical Toxicology* **39**: 55-65
- Draganescu N.; Antipa C.; Girjabu E.; Melencu M. (1983)** Endemic Balkan nephropathy, a slow virus disease? *Rev. Roum. Med. – Virol.* **34**: 3-6
- Duke R.C.; Ojcius D.M.; Ding-E Young J. (1997)** Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft* **2**: 26-35
- Dwivedi P.; Burns R.B. (1984a)** Pathology of ochratoxicosis A in young broiler chicks. *Research in Veterinary Science* **36**: 92-103
- Dwivedi P.; Burns R.B. (1984b)** Effects of ochratoxin A on immunoglobulins in broiler chicks. *Research in Veterinary Science* **36**: 117-121
- Eder S.; Benesic A.; Freudinger R.; Engert J.; Schwerdt G.; Drumm K.; Gekle M. (2000)** Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells. *European Journal of Physiology* **440/4**: 521-529
- Edrington T.S.; Harvey R.B.; Kubena L.F. (1995)** Toxic effects of aflatoxin B₁ and ochratoxin A, alone and in combination, on chicken embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **54**: 331-336
- Ehrlich K.C.; Lee L.S. (1984)** Mycotoxins in grain dust: method for analysis of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, vomitoxin, and secalonic acid D. *Journal – Association of Official Analytical Chemists* **67/5**: 963-967
- Ehrlich V.; Darroudi F.; Uhl M.; Steinkellner H.; Gann M.; Majer B.J.; Eisenbauer M.; Knasmüller S. (2002)** Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology* **40**: 1085-1090
- Eisenbrand G.; Schreier P. (1995)** Römpp Lexikon Lebensmittelchemie. Thieme Verlag Stuttgart, New York

- Eisenbrand** G.; Metzler M. (2002) Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Wiley VCH, Weinheim
- El Adlouni** C.; Pinelli E.; Azémar B.; Zaoui D.; Beaune P.; Pfohl-Leskowicz A. (2000) Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: Role of CYP 2C9 and microsomal glutathion-S-transferase. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **35**: 123-131
- Elling** F. (1979) Ochratoxin A-induced mycotoxic porcine nephropathy: alterations in enzyme activity in tubular cells. *Acta Pathologica et Microbiologia Scandinavica A* **87/4**: 237-243
- Elling** F. (1983) Feeding experiments with ochratoxin A-contaminated barley to bacon pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica* **33**: 153-159
- Elling** F.; Nielsen J.P.; Lillehoj E.B.; Thomassen M.S.; Störmer F.C. (1985) Ochratoxin A-induced porcine nephropathy: enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. *Toxicon* **23**: 247-254
- Endou** H.; Koseki C.; Yamada H.; Obara T. (1986) Evaluation of nephrotoxicity using isolated nephron segments. In: Tanabe T.; Hook J.B.; Endou H. (eds.) *Nephrotoxicity of Antibiotics and Immunosuppressants*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
- Endou** H. (1998) Recent advances in molecular mechanism of nephrotoxicity. *Toxicology Letters* **102-103**: 29-33
- Engel** G. (2000) Ochratoxin A in Süßwaren, Ölsaaten und Milcherzeugnissen. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **51/4-5**: 98-101
- Entwistle** A.C.; Williams A.C.; Mann P.J.; Stack P.T.; Gilbert J. (2000) Liquid chromatographic method with immunoaffinity column clean up for determination of ochratoxin A in barley: Collaborative study. *Journal of the Association of Analytical Communities* **83/6**: 1377-1383
- Entwistle** A.C.; Williams A.C.; Mann P.J.; Russell J.; Stack P.T.; Gilbert J. (2001) Combined phenyl silane and immunoaffinity column clean up with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: Collaborative study. *Journal of the Association of Analytical Communities* **84/2**: 444-450
- Esterbauer** H., Schaur R.J., Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* **11**: 81-128
- Europäische** Kommission (2002) Verordnung (EG) Nr. 472/2002 der Kommission vom 12. März 2002 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* **L75**: 18-20
- Fairbairn** D.W.; Olive P.L.; O'Neil K.L. (1995) The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research* **339**: 37-59
- Feder** G.L.; Radovanovic Z.; Finkelman R.B. (1991) Relationship between weathered coal deposits and the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Kidney International* **40/Suppl. 34**: 9-11
- Fenske** M.; Fink-Gremmels J. (1990) Effects of fungal metabolites on testosterone secretion in vitro. *Archives of Toxicology* **64/1**: 72-75
- Ferreira** N.P. (1967) Recent advances in research on ochratoxin. *Microbiological aspects* (Part 2) siehe Purchase (1967)

- Ferruffino-Guardia** E.V.; Tangni E.K.; La rondelle Y.; Ponchaut S. (2000) Transfer of ochratoxin A during lactation: exposure of suckling via the milk of rabbit does fed a naturally-contaminated feed. *Food Additives and Contaminants* **17/2**: 167-175
- Filali** A.; Ouammi L.; Betbeder A.-M.; Baudrimont I.; Soulaymani R.; Benayad A.; Creppy E.E. (2001) Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Additives and Contaminants* **18/6**: 565-568
- Filali** A.; Betbeder A.-M.; Baudrimont I.; Benayad A.; Soulaymani R.; Creppy E.E. (2002) Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Human Exp. Toxicology* **21/5**: 241-245
- Fink-Gremmels** J.; Blom M.; Woutersen van Nijanten F (1993a) In vitro investigations on ochratoxin A metabolism. In: Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (Eds.) (1993) Human ochratoxigenesis and its pathologies, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 67-74
- Fink-Gremmels** J.; Blom M.; Woutersen van Nijanten F (1993b) Comparative aspects of ochratoxin A metabolism. In: Proceedings of the UK Workshop on occurrence and significance of mycotoxins, ed. by Scudamore K.A. Brunel, UK: Maff, Inc.: 124-130
- Fink-Gremmels** J.; Jahn A.; Blom M.J. (1995) Toxicity and metabolism of ochratoxin A. *Natural Toxins* **3/4**: 214-220
- Föllmann** W.; Hillebrand I.E.; Creppy E.E.; Bolt H.M. (1995) Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Archives of Toxicology* **69, 4**: 280-286
- Föllmann** W.; Lucas S. (2003) Effects of the mycotoxin ochratoxin A in a bacteria and a mammalian in vitro mutagenicity test system. *Archives of Toxicology* **77/5**: 298-304
- Friis** C.; Brinn R.; Hald B. (1988) Uptake of ochratoxin A by slices of pig kidney cortex. *Toxicology* **52**: 209-217
- Frisvad** J.C. (1989) The connection between the Penicillia and Aspergilli and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Archives of Environmental and Contaminant Toxicology* **18/3**: 452-467
- Fuchs** R.; Radic B.; Ceovic S.; Sostaric B.; Hult K. (1991) Human exposure to ochratoxin A. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 131-135
- Fuchs** R.; Hult K. (1992) Ochratoxin A in blood and its pharmacokinetic properties. *Food and Chemical Toxicology* **30/3**: 201-204
- Fukui** Y.; Hoshino K.; Kameyama Y.; Yasui T.; Toda C.; Nagano H. (1987) Food and Chemical Toxicology **25/1**: 17-24
- Fukui** Y.; Hayasaka S.; Itoh M.; Takeuchi Y. (1992) Development of neurons and synapses in ochratoxin A-induced microcephalic mice: a quantitative assessment of somatosensory cortex. *Neurotoxicology and Teratology* **14/3**: 191-196
- Gallagher** E.P.; Kavanagh T.J.; Eaton D.L. (1994) Glutathione, oxidized Glutathione, and Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Toxicology* **1b**: 349-366

- Galtier P.**; Charpentreau J.L.; Alvinerie M.; Labouche C. **(1979)** The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metabolism Dispos.* **7/6**: 429-434
- Galtier P.**; Alvinerie M.; Charpentreau J.L. **(1981)** The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetic Toxicology* **19**: 735-738. Aus: IPCS (2001)
- Galtier P.** **(1991)** Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 187-200
- Galtier P.**; Larrieu G.; Alvinerie M. **(1993)** Influence de l'ochratoxine A sur le devenir des xénobiotiques. In: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 59-65
- Gareis M.**; Märtlbauer E.; Bauer J.; Gedek B. **(1988)** Bestimmung von Ochratoxin A in Muttermilch. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **186**: 114-117
- Gareis M.**; Scheuer R. **(2000a)** Ochratoxin A in Fleisch und Fleischerzeugnissen. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **51/4-5**: 102-103
- Gareis M.**; Rosner H.; Ehrhardt S. **(2000b)** Blood serum levels of ochratoxin A and nutrition habits. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **51/4-5**: 108-110
- Gauchi J.-P.**; Leblanc J.-C. **(2002)** Quantitative Risk assessment of exposure to the mycotoxin ochratoxin A in food. *Risk Analysis* **22/2**: 219-234
- Gautier J.C.**; Richoz J.; Markovic J.; Gremaud E.; Guengerich F.P.; Turesky R.J. **(1999)** Metabolism and mechanism of ochratoxin A toxicity: Absence of genotoxic metabolites. *ISSX-Proceedings* **14**: 82
- Gautier J.-C.**; Richoz J.; Welti D.H.; Markovic J.; Gremaud E.; Guengerich F.P.; Turesky R.J. **(2001a)** Metabolism of ochratoxin A: Absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chemical Research in Toxicology* **14**: 34-45
- Gautier J.-C.**; Holzhaeuser D.; Markovic J.; Gremaud E.; Schilter B.; Turesky R.J. **(2001b)** Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radical Biology and Medicine* **30/10**: 1089-1098
- Gekle M.**; Pollock C.A.; Silbernagl S. **(1995)** Time- and concentration-dependent biphasic effect of ochratoxin A on growth of proximal tubular cells in primary culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **275**: 397-404
- Gekle M.**; Schwerdt G.; Freudinger R.; Mildenerger S.; Wilfingseder D.; Pollack V.; Dander M.; Schramek H. **(2000)** Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **293**: 837-844
- Gentles A.**; Smith E.E.; Kubena L.F.; Duffus E.; Johnson P.; Thompson J.; Harvey R.B.; Edrington T.S. **(1999)** Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poultry Science* **78/10**: 1380-1384
- Georgescu L.**; Diosi P. **(1981)** Virus-like particles in the kidneys of three patients with endemic Balkan nephropathy. *Rev. Roum. Med. - Virol.* **32/4**: 305-306

- Gharbi** A.; Trillon O.; Betbeder A.M.; Counord J.; Gauret M.F.; Pfohl-Leszkowicz A.; Dirheimer G.; Creppy E.E. (1993) Some effects of ochratoxin A, a macotoxin contaminating feeds and food, on rat testis. *Toxicology* **83/1-3**: 9-18
- Gibson** R.M.; Bailey C.A. (1989) Ochratoxin A and dietary protein. 1. Effects on body weight, feed conversion, relative organ weight, and mortality in three-week-old broilers. *Poultry Science* **68**: 1658-1663
- Gibson** R.M.; Bailey C.A. (1990) Impact of L-phenylalanine supplementation on the performance of three-week-old broilers fed diets containing ochratoxin A. 1. Effects on body weight, feed conversion, relative organ weight, and mortality. *Poultry Science* **69**: 414-419
- Gillman** I.G.; Yezek J.M.; Manderville R.A. (1998a) Ochratoxin A acts as a photoactivatable DNA cleaving agent. *Chem. Commun.*: 647-648
- Gillman** I.G.; Day C.S.; Manderville R.A. (1998b) Stepwise formation of a nonsymmetric dinuclear copper complex of ochratoxin A. *Inorg. Chem.* **37**: 6385-6388
- Gillman** I.G.; Clark T.N.; Manderville R.A. (1999) Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 1066-1076
- Glaab** V., Eisenbrand G., Collins A. R., Janzowski C. (2001) DNA damaging potential, mutagenicity and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals. *Mutation Research* **497**: 185-197
- Glawtschew** P. (1975) Die Balkan-Nephropathie, eine Sonderform der interstitiellen Nephritis. *Medizinische Klinik* **70/8**: 328-331
- Goldberg** M.C.; Feder G.L.; Radovanovic Z. (1994) Correlation of Balkan endemic nephropathy with fluorescent organic compounds in shallow ground water. *Applied Hydrogeology* **2/4**: 15-22
- Groene**: s. de Groene
- Gross** M. (1998) Tubulinstruktur aufgeklärt. *Spektrum der Wissenschaft*, April 1998: 22-24
- Gross-Steinmeyer** K.; Weymann J.; Hege H.-G.; Metzler M. (2002) Metabolism and Lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 938-945
- Grosse** Y.; Pfeifer A.; Macé K; Harris C.C.; Dirheimer G.; Pfohl-Leszkowicz A. (1994) Biotransformation of ochratoxin A by human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) expressing human cytochrome P450s and implication of glutathione conjugation. *Toxicology Letters* **74**: 33
- Grosse** Y.; Baudrimont I.; Castegnaro M.; Betbeder A.-M.; Creppy E.E.; Dirheimer G.; Pfohl-Leszkowicz A. (1995a) Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. *Chemico-Biological Interactions* **95**, 175-187
- Grosse** Y.; Castegnaro M.; Macé K.; Bartsch H.; Mohr U.; Dirheimer G.; Pinelli E.; Pfeifer A.; Pfohl-Leszkowicz A. (1995b) Cytochrome P450 isoforms implicated in ochratoxin A genotoxicity determined by DNA adduct formation. *Clinical Chemistry* **41/12**: 1927-1929
- Grosse** Y.; Monje M.C.; Macé K.; Pfeifer A.; Pfohl-Leszkowicz A. (1997a) Use of bronchial epithelial cells expressing human cytochrome P450 for study on metabolism and genotoxicity of ochratoxin A. *In Vitro Toxicology* **10/1**: 93-102

- Grosse** Y.; Castegnaro M.; Macé K.; Bartsch H.; Mohr U.; Dirheimer G.; Pinelli E.; Pfeifer A.; Pfohl-Leskowicz A. **(1995b)** Cytochrome P450 isoforms implicated in ochratoxin A genotoxicity determined by DNA adduct formation. *Clinical Chemistry* **41/12**: 1927-1929
- Grosse** Y.; Chekir-Ghedira L.; Huc A.; Obrecht-Pflumio S.; Dirheimer G.; Bacha H.; Pfohl-Leskowicz A. **(1997c)** Retinol, ascorbic acid and α -tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Letters* **114**: 225-229
- Grosso** F.; Said S.; Mabrouk I.; Fremy J.M.; Castegnaro M.; Jemmali M.; Dragacci S. **(2003)** New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* **41**: 1133-1140
- Groves** C.E.; Morales M.; Wright S.H. **(1998)** Peritubular transport of ochratoxin A in rabbit renal proximal tubules. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **284/3**: 943-948
- Groves** C.E.; Nowak G.; Morales M. **(1999)** Ochratoxin A secretion in primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology* **10**: 13-20
- Guerrero** A.; Arias J.M. **(1998)** Apoptosis. *Cell Physiology Source Book*, Second Edition, Academic Press, 1031-1043
- Haazele** F.M.; Guenter W.; Marquardt R.R.; Fröhlich A.A. **(1993)** Beneficial effects of dietary ascorbic acid supplement on hens subjected to ochratoxin A toxicosis under normal and high ambient temperatures. *Canadian Journal of Animal Science* **73**: 149-157
- Hagelberg** S.; Hult K.; Fuchs R. **(1989)** Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology* **9/2**: 91-96
- Hall** P.W.; Vasiljevic M. **(1973)** Beta₂-microglobulin excretion as an index of renal tubular disorders with special reference to endemic Balkan nephropathy. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **81/6**: 897-904
- Hallen** I.P.; Breitholtz-Emanuelsson A.; Hult K.; Olsen M.; Oskarsson A. **(1998)** Placental and lactational transfer of ochratoxin A to rats. *Natural Toxins* **6/1**: 43-49
- Halliwell** B., Gutteridge J. M. C. **(1999)** *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition, Oxford University Press
- Hansen** C.E.; Dueland S.; Drevon C.A.; Stormer F.C. **(1982)** Metabolism of ochratoxin A by primary cultures of rat hepatocytes. *Applied and Environmental Microbiology* **43/6**: 1267-1271
- Hard** G.C. **(1998)** Mechanisms of chemically induced renal carcinogenesis in the laboratory rodent. *Toxicologic Pathology* **26/1**: 104-112
- Hard** G.C. **(2000)** Histopathologic evaluation of rat kidney from toxicity and carcinogenicity studies with ochratoxin A. Expert report submitted by the International Life Sciences Institute, Washington DC, USA. Aus: IPCS (2001)
- Hartley** R.D.; O'Kelly J. **(1966)** Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*: 1101
- Haschek** W.M.; Rousseaux C.G. **(1998)** The Kidney, in: *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, Academic Press: 153-191

- Hasinoff** B.B.; Rahimtula A.D.; Omar R.F. (1990) NADPH-cytochrome-P-450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron(III)-ochratoxin A complex. *Biochimica et Biophysica Acta* **1036**, **ISS1**: 78-81
- Haubeck** H.-D.; Lorkowski G.; Kölsch E.; Rösenthaller R. (1981) Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Applied and Environmental Microbiology* **41/4**: 1040-1042
- Heilmann** W.; Rehfeldt A.G.; Rotzoll F. (1999) Behaviour and reduction of Ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *European Food Research and Technology* **209**: 297-300
- Heller** K.; Rösenthaller R. (1978) Inhibition of protein synthesis in *Streptococcus faecalis* by ochratoxin A. *Canadian Journal of microbiology* **24/4**: 467-472
- Hennig** A.; Fink-Gremmels J.; Leistner L. (1991) Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 255-260
- Heussner** A.H.; O'Brien E.; Dietrich D.R. (2002) Species- and sex-specific variations in binding of ochratoxin A by renal proteins in vitro. *Experimental Toxicology and Pathology* **54**: 151-159
- Hoehler** D.; Marquardt R.R.; McIntosh A.R.; Xiao H. (1996a) Free radical generation as induced by ochratoxin A and its analogs in bacteria (*Bacillus brevis*). *Journal of Biological Chemistry* **274**, 44: 27388-27394
- Hoehler** D.; Marquardt R.R. (1996b) Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks. *Poultry Science* **75**: 1508-1515
- Hoehler** D.; Marquardt R.R.; McIntosh A.R.; Hatch G.M. (1997) Induction of free radicals in hepatocytes, mitochondria and microsomes of rats by ochratoxin A and its analogs. *Biochimica et Biophysica Acta* **1357**: 225-233
- Hoeijmakers** J.H.J. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374
- Hollmann** P.C.H., Katan M.B. (1999) Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **37**:937-942
- Holmberg** T.; Hagelberg S.; Lundeheim N.; Thafvelin B.; Hult K. (1990) Ochratoxin A in swine blood used for evaluation of cereal handling procedures. *Zentralblatt der Veterinärmedizin B* **37/2**: 97-105
- Hong** H.H.; Jameson C.W.; Boorman G.A. (1988) Residual hematopoietic effects in mice exposed to ochratoxin A prior to irradiation. *Toxicology* **53/1**: 57-67 (Erratum in *Toxicology* **54/2**: 227)
- Horvath** A.; Upham B.L.; Ganey V.; Trosko J.E. (2002) Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and rat liver epithelial cell line. *Toxicol* **40**: 273-282
- Horváthová** E.; Slamenová D.; Hlinciková L.; Mandal T.K.; Gábelová A.; Collins A.R. (1998) The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research* **409**: 163-171

- Huff** W.E.; Doerr J.A.; Hamilton P.B.; Hamann D.D.; Peterson R.E.; Ciegler A. **(1980)** Evaluation of bone strength during aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Applied and Environmental Microbiology* **40/1**: 102-107
- Hult** K.; Teiling A.; Gatenbeck S. **(1976)** Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Applied and Environmental Microbiology* **33/3**: 443-444
- Hult** K.; Plestina R.; Habazin-Novak V.; Radic B.; Ceovic S. **(1982)** Ochratoxin A in human blood and balkan endemic nephropathy. *Archives of Toxicology* **51**: 313-321
- Hult** K.; Rutquist L.; Holmberg T.; Thafvelin B.; Gatenbeck S. **(1984)** Ochratoxin A in blood of slaughter pigs. *Nord. Vet.-Med.* **36**: 314-316
- Hult** K.; Fuchs R. **(1986)** Analysis and dynamics of ochratoxin A in biological systems. In: Steyn P.S.; Vlegaar R. (eds.) *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam: 365-376. Aus: IPCS (2001)
- Iavicoli** I.; Brera C.; Carelli G.; Caputi R.; Marinaccio A.; Miraglia M. **(2002)** External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **75**: 381-386
- Il'ichev** Y.V.; Perry J.L.; Manderville R.A.; Chignell C.F.; Simon J.D. **(2001)** The pH-dependent primary photoreactions of ochratoxin A. *Journal of Physical Chemistry* **105**: 11369-11376
- International** programme on chemical safety (IPCS) **(1990)** Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. *Environmental Health Criteria* **105**, World Health Organization, Geneva
- International** programme on chemical safety (IPCS) **(2001)** Safety evaluation of certain Mycotoxins in food. *WHO Food Additives Series* **47**, World Health Organization, Geneva
- Isaacson** C. **(1966)** The aetiology of cirrhosis and hepatoma in the Banthu – an appraisal. *South African Medical Journal* **40**: 11-13
- Jäckel** M.C. **(1998)** Die genetische Kontrolle des programmierten Zelltods (Apoptose). *HNO* **46**: 614-625
- Janero** D.R. **(1990)** Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine* **9**: 515-540
- Janzowski** C.; Glaab G.; Müller C.; Strässer U.; Kamp H.G.; Collins A.R.; Eisenbrand G. **(2003)** α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds: Induction of oxidative DNA-Damage in mammalian Cells. *Mutagenesis* **18**: 465-470
- Jaruga** P., Dizdaroglu M. **(1996)** Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acid Research* **24/8**: 1389-1394
- JECFA**: s. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
- Jeffery** F.H.; Morton J.G.; Miller J.K. **(1984)** Effects of some clinically significant mycotoxins on the incorporation of DNA, RNA and protein precursors in cultured mammalian cells. *Research in Veterinary Science* **37/1**: 30-38
- Jiao** Y.; Blaas W.; Rühl C.; Weber R. **(1992)** Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **595**: 364-367

- Jiao** Y.; Blaas W.; Rühl C.; Weber R. (1994) Ochratoxin A in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. Deutsche Lebensmittelrundschau, **10**, 1994: 318-321
- Joint** FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (1991) Ochratoxin A. In: Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series **859**: 35-36
- Joint** FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (1995) Ochratoxin A. In: Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series **806**: 29-31
- Jonsyn** F.E.; Maxwell S.M.; Hendrickse R.G. (1995) Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. Mycopathologia **131/2**: 121-126
- Jorgensen** K.; Rasmussen G.; Thorup I. (1996) Ochratoxin A in danish cereals 1986-1992 and daily intake by the danish population. Food Additives and Contaminants **13/1**: 95-104
- Jung** K.Y.; Endou H. (1989) Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity. Toxicology and Applied Pharmacology **100**: 383-390
- Kane** A.; Creppy E.E.; Roth A.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1986a) Distribution of the [³H]-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-Strand breaks caused in liver and kidneys. Archives of Toxicology **58**: 219-224
- Kane** A.; Creppy E.E.; Rösenthaller R.; Dirheimer G. (1986b) Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of ochratoxin A in rats. Toxicology **42**: 233-243
- Kanisawa** M.; Suzuki S.; Kozuka Y.; Yamazaki M. (1977) Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology **42**: 52-64
- Kanisawa** M.; Suzuki S. (1978) Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. Gann **69**: 599-600
- Kanisawa** M. (1984a) Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. In: Kurata H.; Ueno Y. (eds.) Toxigenic fungi – their toxins and health hazard, Elsevier Tokyo, Amsterdam: 245-254
- Kanisawa** M. (1984b) Pathogenesis of human cancer development due to environmental factors. Japan journal of cancer clinics **30/12 Suppl.**: 1445-1456
- Kassie** F.; Parzefall W.; Knasmüller S. (2000) Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies. Mutation Research **463**: 13-31
- Kawamura** O.; Maki S.; Sato S.; Ueno Y. (1993) Ochratoxin A in livestock and human sera in Japan quantified by a sensitive ELISA. In: Human ochratoxicosis and its pathologies, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque NSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 159-165
- Keane** W.F.; Gekker G.; Schlievert P.M.; Peterson P.K. (1986) Enhancement of endotoxin-induced isolated renal tubular cell injury by toxic shock syndrome Toxin 1. AJP **122**, 1: 169-176
- Kelly** S. A., Havrilla C. M., Brady T. C., Abramo K. H., Levin E. D. (1998) Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. Environmental Health Perspectives **106/7**: 375-384

- Kerkadi A.**; Barriault C.; Tuchweber B.; Fröhlich A.A.; Marquardt R.R.; Bouchard G.; Yousef I.M. (1998) Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin. *Journal of Environmental Health* **53/3**: 231-250
- Kerkadi A.**; Barriault C.; Marquardt R.R.; Fröhlich A.A.; Yousef I.M.; Zhu X.X.; Tuchweber B. (1999) Cholestyramine protection against ochratoxin A toxicity: role of ochratoxin A sorption by the resin and bile acid enterohepatic circulation. *Journal of Food Protection* **62/12**: 1461-1465
- Kerr J.F.R.**; Whyllie A.H.; Curie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**: 239-257
- Kiessling K.H.**; Pettersson H.; Sandholm K.; Olsen M. (1984) Metabolism of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **47/5**: 1070-1073
- Kitchen D.N.**; Carlton W.W.; Tuite J. (1977a) Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. *Veterinary Pathology* **14**: 154-172
- Kitchen D.N.**; Carlton W.W.; Tuite J. (1977b) Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. II. Pathology. *Veterinary Pathology* **14**: 261-272
- Kitchen D.N.**; Carlton W.W.; Tuite J. (1977c) Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. III. Terminal renal ultrastructural alterations. *Veterinary Pathology* **14**: 392-406
- Klaunig J.E.**, Xu Y., Isenberg J.S., Bachowski S., Kolaja K.L., Jiang J., Stevenson D.E. Walborg E. Jr. (1998) The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* **106/Suppl. 1**: 289-295
- Konrad I.**; Röschenthaier R. (1977) Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Letters* **83/2**: 341-347
- Koopman G.**; Reutelingsperger C.P.M.; Kuijten G.A.M.; Keehnen R.M.J.; Pals S.T.; van Oers M.H.J. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84/5**: 1415-1420
- Kostecki M.**; Golinski P.; Uchman W.; Grabarkiewicz-Szczesna J. (1991) Decomposition of ochratoxin A by heat and γ -irradiation. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 109-111
- Kraus G.A.** (1981) A Facile synthesis of ochratoxin A. *Journal of Organic Chemistry* **46**: 201-202
- Krogh P.**; Elling F.; Hald B.; Jylling B.; Petersen V.E.; Skadhauge E.; Svendsen C.K. (1976a) Experimental avian nephropathy: Changes of renal function and structure induced ochratoxin A-contaminated feed. *Acta Pathologica et Microbiologia Scandinavica A* **84/2**: 215-221
- Krogh P.** (1976b) Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nordic Veterinary Medicine* **28/9**: 452-458
- Krogh P.**; Elling F.; Gyrd-Hansen N.; Hald B.; Larsen A.E.; Lillehoj E.B.; Madsen A.; Mortensen H.P.; Ravnskov U. (1976c) Experimental porcine nephropathy: Changes of renal function and structure perorally induced by crystalline ochratoxin A. *Acta Pathologica et Microbiologia Scandinavica A* **84/5**: 429-434

- Krogh P.**; Hald B.; Plestina R.; Ceovic S. **(1977)** Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Sectio B* **85**: 238-240
- Krogh P.** (ed.) **(1987)** Ochratoxins in food. In *Mycotoxins in food*. Academic Press, London (ISBN 0-12-426670-3): 97-121
- Krogh P.**; Gyrd-Hansen N.; Hald B.; Larsen S.; Nielsen J.P.; Smith M.; Ivanoff C.; Meisner H. **(1988)** Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **23**: 1-14
- Krogh P.** **(1992)** Role of ochratoxin in disease causation. *Food and Chemical Toxicology* **30, 3**: 213-224
- Kuczuk M.H.**; Benson P.M.; Heath H.; Hayes A.W. **(1978)** Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* **53**: 11-20
- Kuiper-Goodman T.**; Scott P.M. **(1989)** Risk assessment of the mycotoxin Ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences* **2**: 179-248
- Kuiper-Goodman T.**; Ominski K.; Marquardt R.R.; Malcolm S.; McMullen E.; Lombaert G.A.; Morton T. **(1993)** Estimating human exposure to ochratoxin A in Canada. In: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 167-174
- Kuiper-Goodman T.** **(1996)** Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Additives and Contaminants* **13, Suppl.**: 53-57
- Kumagai S.**; Aibara K. **(1982)** Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **64**: 94-102
- Kumagai S.** **(1985)** Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food Chemistry and Toxicology* **23/10**: 941-943
- Kumagai S.** **(1988)** Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food Chemistry and Toxicology* **26/9**: 753-758
- Kumari D.**; Sinha S.P. **(1994)** Effect of retinol on ochratoxin-produced genotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* **32, 5**: 471-475
- Kuramochi G.**; Gekle M.; Silbernagl S. **(1997a)** Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney: increases in pH and HCO₃⁻ in the tubules and vasa recta. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **434**: 392-397
- Kuramochi G.**; Gekle M.; Silbernagl S. **(1997b)** Derangement of pH homeostasis in the renal papilla: ochratoxin A increases pH in vasa recta blood. *Nephron* **76/4**: 472-476
- Kurokawa Y.**; Hayashi Y.; Maekawa A.; Takahashi M.; Kokubo T.; Odashima S. **(1983)** Carcinogenicity of potassium bromate administered orally to F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute* **71/5**: 965-972

- Larsson** K.; Moller T. **(1996)** Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in barley, wheat bran, and rye by the AOAC/IUPAC/NMKL method: NMKL collaborative study. *Journal of the Association of Analytical Communities* **79**: 1102-1105
- Lau** S.S.; Peters M.M.C.G.; Kleiner H.E.; Canales P.L.; Monks T.J. **(1996)** Linking the metabolism of hydroquinone to its nephrotoxicity and nephrocarcinogenicity. *Exp Med Biol* **387**: 267-73
- Lea** T.; Steien K.; Stoemer F.C. **(1989)** Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* **107**: 153-159
- Lebrun** S.; Föllmann W. **(2002)** Detection of Ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Archives of Toxicology* **75**: 734-741
- Lee** S.C.; Beery J.T.; Chu F.S. **(1984a)** Immunohistochemical fate of ochratoxin A in mice. *Toxicology and applied Pharmacology* **72/2**: 218-227
- Lee** S.C.; Chu F.S. **(1984b)** Enzyme-Linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat. *Journal – Association of Official Analytical Chemists* **67/1**: 45-49
- Li** J.L.; Okada S.; Hamazaki S.; Ebina Y.; Midorikawa O. **(1987)** Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Cancer Research* **47/7**: 1867-1869
- Li** S.; Marquardt R.R.; Frohlich A.A.; Vitti T.G.; Crow G. **(1997)** Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145**: 82-90
- Li** S.; Marquardt R.R.; Frohlich A.A. **(2000)** Identification of ochratoxins and source of their metabolites in bile and urine of rats. *Food and Chemical Toxicology* **38**: 141-152
- Lillehoj** E.B.; Elling F. **(1983)** Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agriculturae Scandinavica* **33**: 113-128
- Lindl** T. **(2000)** Zell- und Gewebekultur; 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Liu** Z.; Minkler P.E.; Sayre L.M. **(2003)** Mass spectroscopic characterization of protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-(E)-nonenal. *Chemical Research in Toxicology* **16**: 901-911
- LMBG**: s. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG
- Loft** S., Poulsen H.E. **(1996)** Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* **74**: 297-312
- Lühe** A.; Hildebrand H.; Bach U.; Dingermann T.; Ahr H.J. **(2003)** A new approach to studying ochratoxin (OTA)-induced nephrotoxicity: expression and profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicological Sciences* **73/2**: 315-328
- Luster** M.I.; Germolec D.R.; Bureson G.R.; Jameson C.W.; Ackermann M.F.; Lamm K.R.; Hayes H.T. **(1987)** Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Research* **47**: 2259-2263
- Maaroufi** K.; Achour A.; Betbeder A.M.; Hammami M.; Ellouz F.; Creppy E.E.; Bacha H. **(1995)** Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Archives of Toxicology*, **69**: 552-558

- Maaroufi** K.; Zakhama A.; Baudrimont I.; Achour A.; Ellouz F.; Dhouib S.; Creppy E.E.; Bacha H. (1999) Karyomegaly of tubular cells as early stage marker of the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Human & Experimental Toxicology* **18**: 410-415
- MacDonald** S.; Wilson P.; Barnes K.; Damant A.; Massey R.; Mortby E.; Shepherd M.J. (1999) Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Additives and Contaminants* **16/6**: 253-260
- Madhyastha** M.S.; Fröhlich A.A.; Marquardt R.R. (1992) Effect of dietary cholestyramine on the elimination pattern of ochratoxin A in rats. *Food Chemistry and Toxicology* **30/8**: 709-714
- Madsen** A.; Mortensen H.P.; Hald B. (1982) Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I. Influence on pig performance and residues. *Acta Agriculturae Scandinavica* **32**: 225-239
- Märtlbauer** E.; Stolle A. (2000) Zusammenstellung der Ergebnisse einer von Bundesministerium für Gesundheit in Auftrag gegebenen Ochratoxin A-Studie (Arbeitstitel). *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **51/4-5**: 81-128
- Majerus** P.; Cutka I.; Dreyer A.; El-Dessouki S.; Eyrich W.; Reusch H.; Schurer B.; Waiblinger H.U. (1993) Zur Belastungssituation von Ochratoxin A in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **89/4**: 112-114
- Majerus** P.; Otteneder H. (1996) Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A in Wein und Traubensaft. *Deutsche Lebensmittelrundschau*, **12**, 1996: 388-390
- Majerus** P.; Bresch H.; Otteneder H. (2000) Ochratoxin A in Wein, Fruchtsäften und Würzen. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **51/4-5**: 95-97
- Maksimovic** Z.J.; Djujic I. (1997) Selenium deficiency in Serbia and possible effects on health. *Biomedical and Environmental Sciences* **10/2-3**: 300-306
- Malaveille** C.; Brun G.; Bartsch H. (1991) Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in *Escherichia coli* strains: studies on their mode of action. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 261-266
- Malaveille** C.; Brun G.; Bartsch H. (1994) Structure-activity studies in *E. coli* strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and a cytotoxic thiol derivative as reactive metabolites. *Mutation Research* **307**: 141-147
- Manderville** R.A.; Gillman I.G.; Clarke T.N.; Calcutt W.; Noftle R.E. (xxxx) Electrochemical and Fe-porphyrin-mediated oxidation of ochratoxin A: model for DNA cleavage and bioactivation xxx
- Manolova** Y.; Manolov G.; Parvanova L.; Petkova-Bocharova T.; Castegnaro M.; Chernozemsky I.N. (1990) Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutation Research* **231**: 143-149
- Mantle** P.G.; McHugh K.M.; Adatia R.; Gray T.; Turner D.R. (1991) Persistent karyomegaly caused by penicillium nephrotoxins in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London* **246**: 251-259

- Mantle** P.G.; McHugh K.M. (1993) Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. *Mycology Research* **97/2**: 205-212
- Mantle** P.G.; Miljkovic A.; Udupa V.; Dobrota M. (1998) Does apoptosis cause renal atrophy in Balkan endemic nephropathy? *The Lancet* **352**: 1118-1119
- Markovic** B.; Lebedev S.; Djordjevic M.; Arambasic M. (1976) Endemic urinary tract cancer in Bulgaria, Yugoslavia and Roumania: Etiology and pathogenesis. *Mèdicine/Biologie/Environnement*: 1-2
- Marnett** L.J. (1999) Lipid peroxidation- DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* **424**: 83-95
- Marquardt** R.R.; Frohlich A.A. (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* **70**: 3968-3988
- Mayura** K.; Parker R.; Berndt W.O.; Phillips T.D. (1984) Ochratoxin A-induced teratogenesis in rats: partial prevention by phenylalanine. *Applied Environmental Microbiology* **48/6**: 1186-1188
- Mayura** K.; Edwards J.F.; Maull E.A.; Phillips T.D. (1989) The effects of ochratoxin A on postimplantation rat embryos in culture. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **18/3**: 411-415
- McKenzie** K.S.; Sarr A.B.; Mayura K.; Bailey R.H.; Miller D.R.; Rogers T.D.; Norred W.P.; Voss K.A.; Plattner R.D.; Kubena L.F.; Phillips T.D. (1997) Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology* **35**: 807-820
- McMasters** D.R.; Vedani A. (1999) Ochratoxin binding to phenylalanyl-tRNA synthetase: computational approach to the mechanism of ochratoxicosis and its antagonism. *Journal of Medicinal Chemistry* **42/16**: 3075-3086
- Meisner** H.; Polsinelli L. (1986a) Changes of renal mRNA species abundance by ochratoxin A. *Biochemical Pharmacology* **35/4**: 661-665
- Meisner** H.; Cimbala M. (1986b) Effect of ochratoxin A on gene expression in rat kidneys. In: Chambers P.L.; Gehring P.; Sakai F. (eds.) *New concepts and developments in toxicology*, Elsevier Science Publishers: 261-271
- Meisner** H.; Krogh P. (1986c) Phosphoenolpyruvate carboxykinase as a selective indicator of ochratoxin A induced nephropathy. In: Tanabe T., Hook J.B.; Endou H. (eds.) *Nephrotoxicity of antibiotics and immunosuppressants*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 199-206
- Meister** A.; Anderson M.E. (1983) Glutathione; *Annual Review of Biochemistry* **52**, 711-760
- Meki** A.R.; Hussein A.A. (2001) Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **130/3**: 305-313.
- Merwe** siehe van der Merwe
- Micco** C.; Grossi M.; Miraglia M.; Brera C. (1989) A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Additives and Contaminants* **6/3**: 333-339
- Micco** C.; Ambruzzi M.A.; Miraglia M.; Brera C.; Onori R.; Benelli L. (1991) Contamination of human milk with ochratoxin A. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.;

Bartsch H. (eds.) Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 105-108

Miljkovic A.; Pfohl-Leszkowicz A.; Dobrota M.; Mantle P.G. (2003) Comparative responses to mode of oral administration and dose of ochratoxin A or nephrotoxic extract of *Penicillium polonicum* in rats. *Experimental Toxicology and Pathology* **54/4**: 305-312

Miraglia M.; Brera C.; Corneli S.; De Dominicis R. (1993) Ochratoxin A in Italy: status of knowledge and perspectives. In: Human ochratoxicosis and its pathologies, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 129-139

Mironova L.L.; Khapchaev Y.K. (1982) Preparation of primary monkey kidney cell cultures. *Acta Virol.* **26**: 404

Monks T.J.; Lau S.S. (1997) Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. *Chemical Research in Toxicology* **10**: 1296-1313

Monnet-Tschudi F.; Sorg O.; Honegger P.; Zurich M.-G.; Huggett A.C.; Schilter B. (1997) Effects of the naturally occurring food mycotoxin ochratoxin A on brain cells in culture. *NeuroToxicology* **18**: 831-840

Moré J.; Galtier P. (1974) Toxicity of ochratoxin A. I. Embryotoxic and teratogenic effect in rats. *Ann. Réch. Vet.* **5**: 167-178 (französisch). Aus: (IPCS 2001)

Moré J.; Galtier P. (1975) Toxicity of ochratoxin A. II. Effects of treatment on the progeny (F1 and F2) of intoxicated rats. *Ann. Réch. Vet.* **6**: 379-389 (französisch). Aus: (IPCS 2001)

Mori H.; Kawai K.; Ohbayashi F.; Kuniyasu T.; Yamazaki M.; Hamasaki T.; Williams G.M. (1984) Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. *Cancer Research* **44**: 2918-2923

Moroi K.; Suzuki S.; Kuga T.; Yamazaki M.; Kanisawa M. (1985) Reduction of ochratoxin A toxicity in mice treated with phenylalanine and phenobarbital. *Toxicology Letters* **25**: 1-5

Mortensen H.P.; Hald B.; Madsen A. (1983a) Ochratoxin A contaminated barley for sows and piglets. Pig performance and residues in milk and pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica* **33**: 649-352. Aus: IPCS (2001)

Mortensen H.P.; Hald B.; Madsen A. (1983b) Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 5. Ochratoxin A in pig blood. *Acta Agriculturae Scandinavica* **33**: 235-239. Aus: IPCS (2001)

Müller C. (2003) Untersuchungen zum oxidativen Stress bei Hämodialysepatienten. Dissertation, Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie

Müller G.; Kielstein P.; Köhler H.; Berndt A.; Rosner H. (1995) Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in the mouse model. *Mycoses* **38/1-2**: 85-91

Müller G.; Kielstein P.; Rosner H.; Berndt A.; Heller M.; Köhler H. (1999) Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in weaners. *Mycoses* **42**: 495-505

Munro I.C.; Moodie C.A.; Kuiper-Goodman T.; Scott P.M.; Grice H.C. (1974) Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of ochratoxin A. *Toxicology and Applied Pharmacology* **28**: 180-188

Mussler B. (1999) Dissertation Universität Kaiserslautern

Nalwaya N.; Deen W.M. (2003) Analysis of cellular exposure to peroxyxynitrite in suspension cultures. *Chemical Research in Toxicology* **16**: 920-932

National Toxicology Program, National Institutes of Health (1991) Chemical Repository: Ochratoxin A, Homepage

Nel W.; Purchase I.F.H. (1968) The fate of ochratoxin A in rats. *Journal of the South African Chemical Society* **21**: 87-88

Nesheim S.; Stack M.E.; Trucksess W.; Eppley R.; Krogh P. (1992) Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of Ochratoxin A in corn, barley and kidney: Collaborative study. *Journal of the Association of Analytical Communities International* **75**: 481-487

Ngaha E.O. (1985) Biochemical changes in the rat during experimentally induced acute ochratoxicosis. *Enzyme* **33/1**: 1-8

Nichifor E.; Balea M.; Rusu G.; Melencu M.; Ghiordanescu N.; Cristescu I.; Dovlete C.; Sonoc S. (1985) Studies on the familial character of endemic nephropathy. Possible role of the toxic hydric factor in the determination of "familial agglomerations" in endemic Balkan nephropathy. *Medicine Interne* **23/3**: 229-237

Nikolov I.G.; Petkova-Bocharova D.; Castegnaro M.; Pfohl-Leskowicz A.; Gill C.; Day N.; Chernozemsky I.N. (1996) Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with balkan endemic nephropathy. *Journal of environmental pathology, Toxicology and Oncology* **15, 2-4**: 201-207

NTP s. National Toxicology Program

O'Brian E.; Heussner A.H.; Dietrich D.R. (2001) Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. *Toxicological Sciences* **63**: 256-264

Obrecht-Pflumio S.; Grosse Y.; Pfohl-Leszkowicz A.; Dirheimer G. (1996) Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. *Arch. Toxicol.* **70**: 244-248

Obrecht-Pflumio S.; Dirheimer G. (1997) In vitro DNA and nucleotides adducts formation caused by ochratoxin A. *Mutation Research* **379/Suppl.1**: PXVI A.7

Obrecht-Pflumio S.; Chassat T.; Dirheimer G.; Marzin D. (1999) Genotoxicity of ochratoxin A by Salmonella mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutation Research* **446**: 95-102

Obrecht-Pflumio S.; Dirheimer G. (2000) In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chemico-Biological Interactions* **127**: 29-44

Obrecht-Pflumio S.; Dirheimer G. (2001) Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A. *Archives of Toxicology* **75**: 583-590

Olsen J.H.; Hald B.; Thorup I.; Carstensen B. (1993) Distribution in Denmark of porcine nephropathy and chronic disorders of the urinary tract in humans. In: *Human ochratoxicosis and its pathologies*, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 209-215

Olsen P. (1996) Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. WHO Food Additives Series: **35**: 363-376

Omar R.F.; Hasinoff B.B.; Mejilla F.; Rahimtula A.D. (1990) Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* **40, 6**: 1183-1191

Omar R.F.; Randell E.; Rahimtula A.D. (1991a) In vitro inhibition of rat platelet aggregation by ochratoxin A. *Journal of Biochemical Toxicology*, **6, ISS 3**: 211-220

Omar R.F.; Rahimtula A.D.; Bartsch H. (1991b) Role of cytochrome P-450 in ochratoxin A-stimulated lipid peroxidation. *Journal of Biochemical Toxicology* **6/3**: 203-209

Omar R.F.; Gelboin H.V.; Rahimtula A.D. (1996) Effect of cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Biochemical Pharmacology* **51/3**: 207-216

Osborne B.G.; Ibe F.; Brown G.L.; Petagine F.; Scudamore K.A.; Banks J.N.; Hetmanski M.T.; Leonard C.T. (1996) The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* **13/2**: 141-153

Oster T.; Jayyosi Z.; Creppy E.E.; Souhaili El Amri H.; Batt A.-M. (1991) Characterization of pig liver purified cytochrome P-450 isoenzymes for ochratoxin A metabolism studies. *Toxicology Letters* **57**: 203-214

Ostling O.; Johanson K. J. (1984) Microelectrophoresis study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**: 291-298

Paolo s. Di Paolo

Pavlovic M.; Plestina R.; Krogh P. (1979) Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. *Acta Pathologica et Microbiologia Scandinavica B* **87/4**: 243-246

Peraica M.; Domijan A.-M.; Fuchs R.; Lucic A.; Radic B. (1999) The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicology Letters* **110**: 105-112

Petkova-Bocharova T.; Castegnaro M. (1985) Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan Endemic Nephropathy in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants* **2/4**: 267-270

Petkova-Bocharova T.; Chernozemsky I.N.; Castegnaro M. (1988) Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants* **5/3**: 299-301

Petkova-Bocharova T.; Castegnaro M. (1991) Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (1991) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 135-137

Petkova-Bocharova T.; Stoichev I.I.; Chernozemsky I.N.; Castegnaro M.; Pfohl-Leszkowicz A. (1998) Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **32/2**: 155-162

Petrik J.; Zanic-Grubisic T.; Barisic K.; Pepljinjak S.; Radic B.; Cepelak I. (2003) Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Archives of Toxicology* in press

- Pfohl-Leszkowicz A.**; Chakor K.; Creppy E.E.; Dirheimer G. **(1991)** DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 245-253
- Pfohl-Leszkowicz A.**; Grosse Y.; Obrecht S.; Kane A.; Castegnaro M.; Creppy E.E.; Dirheimer G. **(1993a)** Preponderance of DNA-adducts in kidney after ochratoxin A exposure. In: Human ochratoxicosis and its pathologies, ed. by Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G.. INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 199-207
- Pfohl-Leszkowicz A.**; Grosse Y.; Kane A.; Gharbi A.; Baudrimont I.; Obrecht S.; Creppy E.E.; Dirheimer G. **(1993b)** Is the oxidative pathway implicated in the genotoxicity of ochratoxin A? In: Human ochratoxicosis and its pathologies, ed. by Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G.. INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 177-187
- Pfohl-Leszkowicz A.**; Grosse Y.; Castegnaro M.; Nicolov I.G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H.; Betbeder A.M.; Creppy E.E.; Dirheimer G. **(1993c)** Ochratoxin A-related DNA adducts in urinary tract tumours of Bulgarian subjects. In: Postlabelling Methods for Detection of DNA adducts, ed. by Phillips D.H.; Castegnaro M.; Bartsch H.. International Agency for Research on Cancer **124** Lyon: 141-148
- Pfohl-Leszkowicz A.**; Grosse Y.; Kane A.; Creppy E.E.; Dirheimer G. **(1993d)** Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. Mutation Research **289**: 265-273
- Pfohl-Leszkowicz A.** **(1994a)** L'ochratoxin A, mycotoxine ubiquitaire contaminant l'alimentation humaine. C.R. Soc. Biol. **188**: 335-353
- Pfohl-Leszkowicz A.**; Obrecht S.; Grosse Y.; Dirheimer G. **(1994b)** Involvement of antioxidants and inhibitors of glutathione conjugation in ochratoxin A genotoxicity in mice liver and kidney. Toxicology Letters **74/Suppl.**: 64
- Pfohl-Leszkowicz A.**; Pinelli E.; Bartsch H.; Mohr U.; Castegnaro M. **(1998)** Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. Molecular Carcinogenesis **23/2**: 76-85
- Pfohl-Leszkowicz A.**; Bartsch H.; Azémar B.; Mohr U.; Estève J.; Castegnaro M **(2002a)** MESNA protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways. Medicine and Biology **9/1**: 57-63
- Pfohl-Leszkowicz A.**; Petkova-Bocharova T.; Chernozemsky I.N.; Castegnaro M. **(2002b)** Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. Food Additives and Contaminants **19/3**: 282-302
- Pinelli E.**; Adlouni C.E.; Pipy B.; Quartulli F.; Pfohl-Leszkowicz A. **(1999)** Roles of cyclooxygenase and lipoxygenases in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells. Environ. Toxicol. Pharmacol. **7**: 95-107
- Piskorska-Pliszczyńska J.**; Juszjiewicz T. **(1990)** Tissue deposition and passage into eggs of ochratoxin A in Japanese quail. Environmental Pathology, Toxicology and Oncology **10/1-2**: 8-10
- Pitout M.J.** **(1969)** The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. Biochem. Pharmacol. **18**:485-491. Aus: IPCS (2001)

- Pitt J.I. (1987)** *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied Environmental Microbiology* **53/2**: 266-269
- Plestina R. (1992)** Some features of Balkan endemic nephropathy. *Food and Chemical Toxicology* **30/3**: 177-181
- Pohland A.E.; Schuller P.L.; Steyn P.S.; van Egmond A.E. (1982)** Physicochemical data for some selected mycotoxins. *Pure and Applied Chemistry* **54/11**: 2219-2284
- Pollack M.; Oe T.; Lee S.H.; Elipe M.V.S.; Arison B.H.; Blair I.A. (2003)** Characterization of 2'-deoxycytidine adducts derived from 4oxo-2-nonenal, a novel lipid peroxidation product. *Chemical Research in Toxicology* **16**: 893-900
- Prior M.G. (1976a)** Mycotoxin determinations on animal feedstuff and tissues in Western Canada. *Canadian Journal of comparative medicine* **40/1**: 75-79
- Prior M.G.; Sisodia C.S.; O'Neill J.B. (1976b)** Acute oral ochratoxicosis in day-old white leghorns, turkeys and Japanese quail. *Poultry Science* **55/2**: 786-790
- Prior M.G.; Sisodia C.S. (1978)** Ochratoxicosis in white leghorn hens. *Poultry Science* **57/3**: 619-623
- Prior M.G.; O'Neill J.B.; Sisodia C.S. (1980)** Effects of ochratoxin A on growth response and residues in broilers. *Poultry Science* **59/6**: 1254-1257
- Prior M.G. (1981a)** Mycotoxins in animal feedstuffs and tissues in Western Canada 1975 to 1979. *Canadian Journal of comparative medicine* **45/2**: 116-119
- Prior M.G.; Sisodia C.S.; O'Neill J.B. (1981b)** Effects of ochratoxin A on egg production, body weight, and feed intake in white leghorn hens. *Poultry Science* **60/6**: 1145-1148
- Prior M.G.; Sisodia C.S. (1982)** The effects of ochratoxin A on the immune response of swiss mice. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **46**: 91-96
- Purchase I.F.H.; Nel W. (1967)** Recent advances in research on ochratoxin. In: Matelas R.I.; Wogan G.N. (eds.) *Biochemistry of some Foodborne Microbial Toxins*, The M.I.T. Press, Cambridge Mass, U.S.A.: 153-156 (Part 1); Ferreira N.P. (1967) *Microbiological Aspects*. Dito.: 157-168 (Part 2)
- Purchase I.F.H.; van der Watt J.J. (1971)** The long-term toxicity of ochratoxin A to rats. *Food and Cosmetics Toxicology* **9**: 681-682
- Radic B.; Fuchs R.; Peraica M.; Lucic A. (1997)** Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicology Letters* **91**: 105-109
- Radonic M.; Radosevic Z. (1992)** Clinical Features of Balkan endemic nephropathy. *Food and Chemical Toxicology* **30/3**: 189-192
- Radovanovic Z. (1987)** Epidemiological evidence on Balkan nephropathy as a viral disease. *Medical Hypotheses* **22/2**: 171-175
- Radovanovic Z. (1989)** Aetiology of Balkan nephropathy: a reappraisal after 30 years. *European Journal of Epidemiology* **5/3**: 372-377
- Radovanovic Z.; Markovic-Demic L.; Marinkovic J.; Jevremovic I.; Jankovic S. (1991)** Well water characteristics and the Balkan endemic nephropathy. *Nephron* **57/1**: 52-54

- Rahimtula** A.D.; Bereziat J.-C.; Bussacchini-Griot V.; Bartsch H. (1988) Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochemical Pharmacology*, **37**, **23**: 4469-4477
- Randerath** E.; Watson W.P.; Zhou G.D.; Chang J.; Randerath K. (1995) Intensification and depletion of specific bulky renal DNA adducts (I-compounds) following exposure of male F344 rats to the renal carcinogen ferric nitriloacetate (Fe-NTA). *Mutation Research* **341/4**: 265-279
- Randerath** E.; Randerath K.; Smith C.V.; Chang J. (1996) Structural origins of bulky oxidative DNA adducts (type II I-compounds) as deduced by oxidation of oligonucleotides of known sequence. *Chemical Research on Toxicology* **9/1**: 247-254
- Rásonyi** T.; Schlatter J.; Dietrich D.R. (1999) The role of α_2 -globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats. *Toxicol. Lett.* **104**: 83-92
- Raters** M.; Matissek R. (2002) Ringversuch zur Bestimmung von Ochratoxin A in Kakaopulver. *Lebensmittelchemie* **56**: 9
- Rice-Evans** C.A. (2000) Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Radical Research* **33**: 59-66
- Richard** J.L.; Plattner R.D.; May J.; Liska S.L. (1999) The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia* **146**: 99-103
- Rizzo** A.; Eskola M.; Atroshi F. (2002) Ochratoxin in cereals, foodstuffs and human plasma. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 631-637
- Roberts** J.C.; Woollven P. (1970) Studies in mycological chemistry. Part XXIV. Synthesis of ochratoxin A, a metabolite of *aspergillus ochraceus* Wilh.. *Journal of the Chemical Society* **C**: 278-281
- Roche** (2002) Cell Death Detection ELISA[®] plus. Instruction Manual.
- Roch-Ramel** F. (1998) Renal transport of organic anions. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **7**: 517-524
- Röschenthaler** R.; Creppy E.E.; Dreismann H.; Dirheimer G. (1984) Ochratoxin A – on the mechanism of action. In: Kurata H.; Ueno Y.; (Eds.) *Toxicogenic fungi – their toxins and health hazard*. Developments in food science **7**, Elsevier Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: 255-264
- Roob** J. M., Khoschorub G., Tiran A., Horina J. H., Holzer H, Winklhofer-Roob B. M. (2000) Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**: 539-549
- Rosner** H.; Rohrmann B.; Peiker G. (2000) Ochratoxin A in human serum. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **51**: 104-107
- Roth** A.; Chakor K.; Creppy E.E.; Kane A.; Röschenthaler R.; Dirheimer G. (1988) Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* **48**: 293-308
- Roth** A.; Creppy E.E.; Kane A.; Bacha H.; Steyn P.S.; Röschenthaler R.; Dirheimer G. (1989) Influence of ochratoxin B on the ochratoxin A inhibition of phenylalanyl-tRNA formation in vitro and protein synthesis in hepatoma tissue culture cells. *Toxicology Letters* **45/2-3**: 307-313

- Roth A.**; Eriani G.; Dirheimer G.; Gangloff J. **(1993)** Kinetic properties of pure overproduced *Bacillus subtilis* phenylalanin-tRNA synthetase do not favour its in vivo inhibition by ochratoxin A. *FEBS Letters* **326/1-3**: 87-91
- Roy S (2000)** Caspases at the heart of the apoptotic cell death pathway. *Chemical Research on Toxicology* **13**: 961-962
- Rupic V.**; Liker B.; Muzic S.; Bogdanic I.C.; Balzer I. **(1978)** The effects of ochratoxin A in feed on the blood content of lipids and proteins in chickens. *Arh. Hig. Rada. Toxikol.* **29**: 139-145 (serbo-kroatisch). Aus: IPCS (2001)
- Rydberg B.**; Johanson K.J. **(1978)**: Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, DNA Repair and Mechanisms. In: Hanawalt E.C.; Friedberg E.C.; Fox C.F. (eds.) Academic Press, New York, 465-468
- Sachs L. (1993)** Statistische Methoden: Planung und Auswertung. 7. überarbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin: 50-51; 74-79
- Sandhu B.S.**; Singh B.; Brar R.S. **(1998)** Haematological and biochemical studies in broiler chicks fed ochratoxin and inoculated with inclusion body hepatitis virus, singly and in concurrence. *Veterinary Research Communications* **22/5**: 335-346
- Sansing G.A.**; Lillehoj E.B.; Detroy R.W.; Miller M.A. **(1976)** Synergistic toxic effects of citrinin, ochratoxin A and penicillic acid in mice. *Toxicon* **14**: 213-220
- Sauvant C.**; Silbernagl S.; Gekle M. **(1998)** Exposure to ochratoxin A impairs organic anion transport in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **287/1**: 13-20
- Schaaf G.J.**; Nijmeijer S.M.; Maas R.F.M.; Roestenberg P.; de Groene E.M.; Fink-Gremmels J. **(2002)** The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1588**: 149-158
- Schlatter C.**; Studer-Rohr J.; Rásonyi T. **(1996)** Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* **13/Suppl.**: 43-44
- Schwerdt G.**; Freudinger R.; Silbernagl S.; Gekle M. **(1999a)** Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. *Toxicology* **135**: 1-10
- Schwerdt G.**; Freudinger R.; Mildenerger S.; Silbernagl S.; Gekle M. **(1999b)** The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biology and Toxicology* **15**: 405-415
- Schwerdt G.**; Freudinger R.; Schuster C.; Silbernagl S.; Gekle M. **(2003)** Inhibition of mitochondria prevents cell death in kidney epithelial cells by intra- and extracellular acidification. *Kidney International* **63/5**: 1725-1735
- Scibelli A.**; Tafuri S.; Ferrante M.C.; Alimenti E.; Naso B.; Lucidano A.; Staiano N.; Della Morte R. **(2003)** Ochratoxin A affects COS cell adhesion and signalling. *Toxicology and Applied Pharmacology* **192/3**: 222-230
- Scott D.B. (1965)** Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. *Mycopathologia et mycologia applicata* **25**: 213-222

- Scott** P.M.; Hand T.B. (1967) Method for the detection and estimation of ochratoxin A in some cereal products. *Journal of the A.O.A.C.* **50/2**: 366-371
- Scudamore** K.A.; MacDonald S.J. (1998) A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Additives and Contaminants* **15/4**: 401-410
- Seegers** J.C.; Böhmer L.H.; Kruger M.C.; Lottering M.-L.; De Kock M. (1994) A comparative study of ochratoxin A-induced apoptosis in hamster kidney and HeLa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **129**: 1-11
- Sies** H. (1991) Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Am. J. Med.* **91/3C**: 31S-38S
- Singer** U.; Röschenthaler R. (1978) Induction of autolysis in *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology* **24/5**: 563-568
- Singh** G.S.; Chauhan H.V.; Jha G.J.; Singh K.K. (1990) Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. *Journal of comparative Pathology* **103/4**: 399-410
- Singh** J.; Hood R.D. (1985) Maternal protein deprivation enhances the teratogenicity of ochratoxin A in mice. *Teratology* **32/3**: 381-388
- Singh** R.; Leuratti C.; Josyula S.; Sipowicz M. A.; Diwan B. A.; Kasprzak K. S.; Schut H. A. J.; Marnett L. J.; Anderson L. M.; Shuker D. E. G. (2001) Lobe-specific increases in Malondialdehyde DNA adduct formation in the livers of mice following infection with *Helicobacter hepaticus*. *Carcinogenesis* **22**: 1281-1287
- Siraj** M.Y.; Phillips T.D.; Hayes A.W. (1981) Effects of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A on hepatic mixed-function oxidase and adenosinetriphosphatase in neonatal rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **8/1-2**: 131-140
- Skaug** M.A. (1999) Analysis of norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* **16/2**: 75-78
- Skehan**, P. et. al. (1990) New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug. Screening, 7. *Nat. Cancer Inst.*
- Smith** P.K.; Krohn R.I.; Hermanson G.T.; Mallia A.K.; Gartner F.H.; Provenzano M.D.; Fujimoto E.K.; Goeke N.M.; Olson B.J.; Klenk D.C. (1985) Measurement of Protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85
- Smith** K.R.; Veranth J.M.; Hu A.A.; Lighty J.S.; Aust A.E. (2000) Interleukin-8 levels in human lung epithelial cells are increased in response to coal fly ash and vary with the bioavailability of iron, as a function of particle size and source of coal. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 118-125
- Sokol** P.P.; Ripich G.; Holohan P.D.; Ross C.R. (1988) Mechanism of ochratoxin A transport in kidney. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **246/2**: 460-465
- Solfrizzo** M.; Avantiaggiato G.; Visconti A. (1998) Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals. *Journal of Chromatography A* **815/1**: 67-73
- Solti** L.; Pecsí T.; Barna-Vetro I.; Szasz F.Jr.; Biro K.; Szabo E. (1999) Analysis of serum and seminal plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Animal Reproduct. Science* **56/2**: 123-132

Sostaric B.; Vukelic M. (1991) Characteristics of urinary tract tumours in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 29-35

Sreemannarayana O.; Frohlich A.A.; Vitti T.G.; Marquardt R.R.; Abramson D. (1988) Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. *Journal of Animal Science* **66/7**: 1703-1711

Stander M.A.; Steyn P.S.; van der Westhuizen F.H.; Payne B.E. (2001) A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chemical Research in Toxicology* **14**: 302-304

Steegen siehe V. d. Steege

Stennicke H.R.; Salvesen G.S. (2000) Caspases-controlling intracellular signals by protease α -mogen activation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**: 299-306

Stetina R.; Votava M. (1986) Induction of DNA single-strand breaks and DNA synthesis inhibition by patulin, ochratoxin A citrinin, and aflatoxin B1 in cell lines CHO and AWRF. *Folia Biologica* **32/2**: 128-144

Steyn P.S.; van der Merwe K.J. (1966) Detection and Estimation of ochratoxin A. *Nature* **XXX**: 418

Steyn P.S.; Holzapfel C.W. (1967) The synthesis of ochratoxins A and B. Metabolites of *Aspergillus Ochraceus* Wilh. *Tetrahedron* **23**: 4449-4461

Steyn P.S. (1984) Ochratoxins and related dihydroisocoumarines. In: Betina V. (ed.) Mycotoxins - production, isolation, separation and purification, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam: 183-217

Steyn P.S. (1993a) Mycotoxins of human health concern. In: Human ochratoxicosis and its pathologies, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G. (1993) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 3-31

Steyn P.S. (1993b) Ochratoxin A: Its chemistry, conformation and biosynthesis. In: Human ochratoxicosis and its pathologies, ed. By Creppy E.E.; Castegnaro M.; Dirheimer G.. INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **231**: 51-58

Stoev S.D.; Goundasheva D.; Mirtcheva T.; Mantle P.G. (2000) Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Experimental Toxicology and Pharmacology* **52**: 287-296

Stoev S.D.; Vitanov S.; Anguelov G.; Petkova-Bocharova T.; Creppy E.E. (2001) Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Veterinary Research Communications* **25/3**: 205-223

Stoian M.; Hozoc M.; Iosipenco M.; Nastac E.; Melencu M. (1983) Serum antibodies to papova viruses (BK and SV 40) in subjects from the area with Balkan endemic nephropathy. *Virology* **34/2**: 113-117

Stojkovic R.; Hult K.; Gamulin S.; Plestina R. (1984) High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. *Biochemical Interactions* **9/1**: 33-38

- Stonard** M.D.; Gore C.W.; Oliver G.J.; Smith I.K. (1987) Urinary enzymes and protein patterns as indicators of injury to different regions of the kidney. *Fundamental and Applied Toxicology* **9**: 339-351
- Storen** O.; Holm H.; Stormer F.C. (1982) Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied and Environmental Microbiology* **44/4**: 785-789
- Stormer** F.C.; Hansen C.E.; Pedersen J.I.; Hvistendahl G.; Aasen A.J. (1981) Formation of (4R)- and (4S)-4-Hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species. *Applied and Environmental Microbiology* **42/6**: 1051-1056
- Stormer** F.C.; Stoeren O.; Hansen C.E.; Pedersen J.I.; Aasen A.J. (1983) Formation of (4R)- and (4S)-4-Hydroxyochratoxin A and 10-Hydroxyochratoxin A from Ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Applied and Environmental Microbiology* **45/4**: 1183-1187
- Stormer** R.C.; Kolsaker P.; Holm H.; Rogstad S.; Elling F. (1985) Metabolism of ochratoxin B and its possible effects upon the metabolism and toxicity of ochratoxin A in rats. *Applied and Environmental Microbiology* **49/5**: 1108-1112
- Stormer** F.C.; Lea T. (1995) Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicology* **95/1-3**: 45-50
- Stormer** F.C.; Hoeiby E.A. (1996) Citrinin, ochratoxin A and iron. Possible implications for their biological function and induction of nephropathy. *Mycopathologia* **134**: 103-107
- Studer-Rohr** I.; Dietrich D.R.; Schlatter J.; Schlatter C. (1995a) The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem. Toxic.* **33**, 5: 341-355
- Studer-Rohr** I. (1995b) Ochratoxin A in Humans: Exposure, Kinetics and risk assessment (Dissertationsschrift). Diss ETH No. 11071
- Studer-Rohr** I.; Schlatter J.; Dietrich D.R. (2000) Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology* **74**: 499-510
- Suzuki** S.; Kozuka Y.; Satoh T.; Yamazaki M. (1975) Studies on the nephrotoxicity of ochratoxin A in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **34**: 479-490
- Suzuki** S.; Satoh T.; Yamazaki M. (1977) The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Japanese Journal of Pharmacology* **27/5**: 735-744
- Tanchev** Y.; Dorossiev D. (1991) The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 21-28
- Tatu** C.A.; Orem W.H.; Finkelman R.B.; Feder G.L. (1998) The etiology of balkan endemic nephropathy: Still more questions than answers. *Environm. Health Persp.* **106**, 11: 689-700
- Theron** J.J.; Liedenberg N.; Joubert H.J.B. (1965) Acute liver injury in ducklings as a result of aflatoxin and ochratoxin poisoning. *South African Medical Journal, Supplement – South African Journal of nutrition* **39**: 767
- Thuvander** A.; Breitholtz-Emanuelsson A.; Olsen M. (1995) Effects of ochratoxin A on the mouse immune system after subchronic exposure. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 12: 1005-1011

- Thuvander A.**; Breitholtz-Emanuelsson A.; Brabencova D.; Gadhasson I. **(1996a)** Prenatal exposure of Balb/c mice to ochratoxin A: effects on the immune system in the offspring. *Food Chem. Toxicol.* **34**: 547-554
- Thuvander A.**; Funseth E.; Breitholtz-Emanuelsson A.; Palminger Hallén I.; Oskarsson A. **(1996b)** Effects of ochratoxin A on the rat immune system after perinatal exposure. *Natural Toxins* **4**: 141-147
- Thuvander A.**; Paulsen J.E.; K.Axberg.; Johansson N.; Vidnes A.; Enghardt-Barbieri H.; Trygg K.; Lund-Larsen K.; Jahrl S.; Widenfalk A.; Bosnes V.; Alexander J.; Hult K.; Olsen M. **(2001)** levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food and Chemical Toxicology* **39**: 1145-1151
- Towndrow K.M.**; Mertens J.J.W.M.; Jeong J.K.; Weber T.J.; Monks T.J.; Lau S.S. **(2000)** Stress- and growth-related gene expression are independent of chemical-induced prostaglandin E₂ synthesis in renal epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 111-117
- Trucksess M.W.**; Giler J.; Young K.; White K.D.; Page S.W. **(1999)** Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee - 1997. *J. AOAC Int.* **82**, 1: 85-89
- Tsuda M.**; Sekine T.; Takeda M.; Cha S.H.; Kanai Y.; Kimura M.; Endou H. **(1999)** Transport of ochratoxin A by Renal Multispecific Organic Anion Transporter 1. *J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics* **289**, 3: 1301-1305
- Turesky R. (2003)** persönliche Mitteilung
- Ueno Y.**; Kubota K.; Ito T.; Nakamura Y. **(1978)** Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Research* **38**: 536-542
- Ueno Y.**; Kawamura O.; Sugiura Y.; Horiguchi K.; Nakajima M.; Yamamoto K.; Sato S. **(1991)** Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. In: Castegnaro M.; Plestina R.; Dirheimer G.; Chernozemsky I.N.; Bartsch H. (eds.) *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon: 71-76
- Ueno Y.**; Umemori K.; Niimi E.; Tanuma S.; Nagata S.; Sugamata M.; Ihara T.; Sekijima M.; Kawai K.; Ueno I.; et al. **(1995)** Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. *Natural Toxins* **3/3**: 129-137
- Umeda M.**; Tsutsui T.; Saito M. **(1977)** Mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins. *Gann* **68/5**: 619-625
- Umemura T.**; Takagi A.; Sai K.; Hasegawa R.; Kurokawa Y. **(1998)** Oxidative DNA damage and cell proliferation in kidneys of male and female rats during 13-weeks exposure to potassium bromate (KBrO₃). *Archives of Toxicology* **72/5**: 264-269
- Uzelac-Keserovic B.**; Spasic P.; Bojanic N.; Dimitrijevic J.; Lako B.; Lepsanovic Z.; Kuljic-Kapulica N.; Vasic D.; Apostolov K. **(1999)** Isolation of a coronavirus from kidney biopsies of endemic Balkan nephropathy patients. *Nephron* **81/2**: 141-145
- V. d. Steegen G.**; Jörissen U.; Pittet A.; Saccon M.; Steiner W.; Vincenzi M.; Winkler M.; Zapp J.; Schlatter C. **(1997)** Screening of european coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Additives and Contaminants* **14/3**: 211-216

- Van der Merwe** K.J.; Steyn P.S.; Fourie L. **(1965a)** Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh.. *Nature* **205**: 1112-1113
- Van der Merwe** K.J.; Steyn P.S.; Fourie L. **(1965b)** Mycotoxins. Part II. The Constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh.. *Journal of the Chemical Society*: 7083-7088
- Vedani** A.; Bruinink A. **(1996)** Ochratoxin A und B: Ein dreidimensionales molekulares Modell zur mechanistischen Erklärung ihrer Toxizität. *ALTEX* **13**, 3: 124-129
- Vedani** A.; Zbinden P. **(1997)** Zielproteine und Mechanismen der Ochratoxintoxizität – Ein Beitrag zur Identifikation potentieller Ochratoxinantagonisten. *ALTEX* **14/4**: 155-164
- Visconti** A.; Pascale M.; Centonze G. **(2000)** Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **888/1-2**: 321-326
- Vrabcheva** T.; Usleber E.; Dietrich R.; Märklbauer E. **(2000)** Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2483-2488
- Vukelic** M.; Sostaric B.; Belicza M. **(1992)** Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *Food and Chemical Toxicology* **30, 3**: 193-200
- Waidyanatha** S.; Lin P.-H.; Rappaport S.M. **(1996)** Characterization of chlorinated adducts of hemoglobin and albumin following administration of pentachlorophenol to rats. *Chemical Research in Toxicology* **9**: 647-653
- Warren** M.F.; Hamilton P.B. **(1980)** Intestinal fragility during ochratoxicosis and aflatoxicosis in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **40/3**: 641-645
- Wei** Y.-H. **(1998)** Oxidative Stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *P. S. E. B. M.* **217**: 53-63
- Welborn** J.R.; Groves C.E.; Wright S.H. **(1998)** Peritubular transport of ochratoxin A by single rabbit renal proximal tubules. *Journal of the American Society of Nephrology* **9**: 1973-1982
- Welling** M. **(2000)** Pilzgift Ochratoxin A: Umfassende Studie schafft Klarheit für Verbraucher. WWW
- Wexler** P. (ed.) **(1998)** The kidney, in: *Encyclopedia of toxicology* **2**: 198-225, Academic Press
- Whyllie** A.H.; Kerr J.F.R.; Currie A.R. **(1980)** Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytometry* **68**: 251-306
- Wiger** R.; Stoermer F.C. **(1990)** Effects of ochratoxins A and B on prechondrogenic mesenchymal cells from chick embryo limb buds. *Toxicology Letters* **54/2-3**: 129-134
- Wolf** D.C.; Crosby L.M.; George M.H.; Kilburn S.R.; Moore T.M.; Miller R.T.; DeAngelo A.B. **(1998)** Time- and dose-dependent development of potassium bromate-induced tumors in male Fischer 344 rats. *Toxicological Pathology* **26/6**: 724-729
- Wolff** J. **(1997)** Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A. Abschlussbericht; BA für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung

- Wolff J. (2000a)** Ochratoxin A in Getreide und Getreideerzeugnissen. Archiv für Lebensmittelhygiene **51**: 85-88
- Wolff J.**; Bresch H.; Cholmakov-Bodechtel C.; Engel G.; Gareis M.; Majerus P.; Rosner H.; Scheuer R. **(2000b)** Ochratoxin A: Contamination of foods and consumer exposure, final evaluation. Archiv für Lebensmittelhygiene **51**: 115-117
- Würgler F.E.**; Friedrich U.; Schlatter J. **(1991)** Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, de-trinin, patulin and cnestine in Salmonella typhimurium TA102. Mutation Research **261**: 209-216
- Xiao H.**; Marquardt R.R.; Frohlich A.A.; Ling Y.Z. **(1995)** Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. J. Agric. Food Chem. **43**: 524-530
- Xiao H.**; Marquardt R.R.; Abramson D.; Frohlich A.A. **(1996a)** Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of Aspergillus ochraceus. Applied and Environmental Microbiology **62/2**: 648-655
- Xiao H.**; Madhyastha S.; Marquardt R.R.; Li S.; Vodela J.K.; Frohlich A.A.; Kemppainen B.W. **(1996b)** Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. Toxicol. Appl. Pharmacol. **137**: 182-192
- Yeulet S.E.**; Mantle P.G.; Rudge M.S.; Greig J.B. **(1988)** Nephrotoxicity of Penicillium aurantiogriseum, a possible factor in the aetiology of Balkan endemic nephropathy. Mycopathologia **102**: 21-30
- Yong S.**; Albassam M.; Prior M.G. **(1987)** Protective effects of sodium bicarbonate on murine ochratoxicosis. Journal of environmental science and health. Part B, Pesticides, food contaminants and agriculture wastes **22/4**: 455-470
- Yukawa M (1911)** Zwei neue Aspergillus-Arten aus "Katsuo-boshi". Journal of the college of Agriculture, Imperial university of Tokyo **1**: 357-366
- Zanic-Grubisic T.**; Zrinski R.; Cepelak I.; Petrik J.; Pepljinjak S. **(1995)** Ochratoxin A impairs activity of the membrane bound enzymes in rat pancreas. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry **33/10**: 699-704
- Zanic-Grubisic T.**; Santini A.; Cepelak I.; Barisic K.; Juretic D.; Pepljinjak S. **(1996)** Influence of ochratoxin A treatment on the activity of membrane bound enzymes in rat brain regions. Biological Chemistry Hoppe Seyler **377/2**: 121-127
- Zanic-Grubisic T.**; Zrinski R.; Cepelak I.; Petrik J.; Radic B.; Pepljinjak S. **(2000)** Studies of ochratoxin A-induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversal by phenylalanine. Toxicology and Applied Pharmacology **167/2**: 132-139
- Zepnik H.**; Pähler A.; Schauer U.; Dekant W. **(2001)** Ochratoxin A-induced tumor formation: Is there a role of reactive ochratoxin A metabolites? Toxicological Sciences **59**: 59-67
- Zimmerli B.**; Dick R. **(1995)** Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and swiss data. Journal of Chromatography B **666**: 85-99
- Zimmerli B.**; Dick R. **(1996)** Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. Food Add. Contam. **13**, 6: 655-668

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliches

Hennicke Georg Kamp

geboren am 01.08.1974 in Mettingen/Westfalen

verheiratet

Schulbildung

1981-1985 Paul-Gerhard-Grundschule, Mettingen/Westfalen

1985-1989 Kardinal von Galen-Gymnasium, Mettingen/Westfalen

1989-1994 Werner-Heisenberg-Gymnasium, Neuwied

08.06.1994 Abitur (Note 1,9)

Wehrersatzdienst

1994-1995 Wehrersatzdienst im Wohnheim der Josefs-gesellschaft Köln für erwachsene Behinderte in Neuwied

Studium

1995-2000 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Kaiserslautern

1995-1997 Grundstudium

23.10.1997 staatliche Vorprüfung (Note 1,8)

1997-2000 Hauptstudium

13.04.2000 Abschluss des Studienganges Diplom-Lebensmittelchemie und erste Staatsprüfung (Note 1,0)

Diplomarbeit bei Prof. Dr. Eisenbrand: „Klonierung und Validierung eines neuen Reporter-gensystems“

2000-2003 Promotion als wissenschaftlicher Angestellter bei Prof. Dr. Eisenbrand am Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelt-

toxikologie, Universität Kaiserslautern: „Untersuchungen zur nephrotoxischen Wirkung des Mykotoxins Ochratoxin A“

Praktika/Auslandsaufenthalte

08/1996- 05/2000 während des Studiums Aushilfsanstellungen im analytischen Labor der Dyckerhoff Zement GmbH, Neuwied

24.06.- 25.06.1999 Praktikum „Zelluläre Toxikologie“ bei Prof. Dr. Wolf, Novartis, Basel

06.04.- 10.04.2002 93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Francisco

16.05.- 29.05.2003 Forschungsaufenthalt in den USA: „Untersuchung (oxidativer) DNA-Schäden in Leber und Niere von Ratten nach Behandlung mit dem Mykotoxin Ochratoxin A“ (Kooperation mit Dr. R. Turesky, NCTR, Jefferson, AR)

28.09.- 01.10.2003 41st Congress of the European Societies of Toxicology, Eurotox 2003, Firenze

Administrative Aufgaben

Betreuung von Seminararbeiten mit aktuellen Themen der Lebensmittelchemie und -toxikologie:

Seminare

Carsten Schröder: Das Mykotoxin Ochratoxin A: Bedeutung für den Verbraucher

Sebastian Ganß: QUID – rechtliche Grundlagen und Auswirkungen

Heike Daumann: Neu zugelassene Fette in Schokolade (Auswirkungen auf Kosten, Qualität und Rezepturen)

Betreuung und Koordination der Arbeit von Forschungspraktikanten, Diplomanden und Laboranten, Beurteilung der Arbeiten

Forschungspraktika

Christine Pohl: Untersuchungen zur Zellschädigung durch das Mykotoxin Ochratoxin A

Peter Mertes: Etablierung einer HPLC-Methode zum Nachweis des Mykotoxins Ochratoxin A in CV-1-Zellen

Christian Dausch: Zelluläre Aufnahme und Verteilung von Ochratoxin A – Bestimmung mittels Fluoreszenz-HPLC

Diplomanden

Christine Pohl: Untersuchungen zur Zellschädigung an primären Rattenhepatozyten durch das Mykotoxin Ochratoxin A

Sandra Schäfer: In vitro Charakterisierung potentieller protektiver Wirkungen eines Ballaststoffes aus Johannisbrotbaumschoten

Kirsten Würth: Untersuchungen zur Wirkung von Ochratoxin A auf Zellzyklus, Apoptoseinduktion und Glutathionspiegel von Nierenzelllinien

Vorbereitung von Vorlesungen und Vorlesungsvertretung, sowie Planung und Durchführung von Praktika

Beantragung von Drittmittelprojekten bei Firmen, Stiftungen, DFG, BMBF, EU und den dazugehörigen Ethikvoten

Berichterstattung zu den laufenden Projekten

Protokollführung für das Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen (S1)

Zusatzqualifikationen

Eingeschränkte Sachkunde nach §5 Chemikalien-Verbotsverordnung

Seit 02/2001 Weiterbildung zum **Fachtoxikologen** der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

02/2001 Klinische Toxikologie

06/2001 Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie II

11/2001 Chemische Kanzerogenese und Mutagenese

02/2002 Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I

03/2002 Fremdstoffmetabolismus und Toxikokinetik

10/2002 Versuchstierkunde I und Biostatistik

02/2003 Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie

02/2003 Reproduktionstoxikologie

Gremientätigkeiten

12/1995-12/1999 Mitglied des Fachschaftsrates Chemie

12/1997-12/1998 Fachschaftssprecher Chemie

bis 12/1999 Stellvertretender Fachschaftssprecher Chemie

02/1996-02/2000 Mitglied des Fachbereichsrates Chemie, des Fachausschusses für Studium und Lehre und des Prüfungsausschusses für Lebensmittelchemie,

Mitarbeit in Habilitations- und Berufungskommissionen

02/1999-02/2001 Studentischer Senator der Universität Kaiserslautern

9.2 Posterbeiträge, Vorträge und Publikationen

2001:

GDCh Lebensmittelchemische Gesellschaft, Regionalverband Süd-West, Arbeitstagung 2001, Kaiserslautern, 02.-03.04.:

H.G. Kamp; G.Eisenbrand; J. Schlatter; C. Janzowski (2001) Ochratoxin A: Induktion von oxidativen DNA-Schäden und Cytotoxizität in Säugerzellen. Lebensmittelchemie **55/5**: 124

11th AEK Congress of the German Cancer Society, Heidelberg, 04.-06.04.:

Janzowski C.; **Kamp H.G.**; Schlatter J.; Eisenbrand G. (2001) In-vitro cytotoxicity and oxidative DNA damage induced by the carcinogenic mycotoxin ochratoxin A. Cancer Research and Clinical Oncology **127, Suppl.**: 32, CA5

International Comet Assay Workshop der GUM, Ulm, 22.-24.07.:

Kamp H.G.; Eisenbrand G.; Schlatter J.; Janzowski C. (2001) Ochratoxin A: in-vitro induction of oxidative DNA damage and cytotoxicity. www.cometassay.com/2001 Comet Assay Workshop Abstracts

2002:

39. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., Jena, 14.-15.03.:

Kamp H.G.; Eisenbrand G.; Schlatter J.; Schrenk D.; Janzowski C. (2002) Das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) induziert oxidative Schädigungen an primären Nierenzellen. Proceedings of the German Nutrition Society, **Vol 4/P58**: 48

93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Francisco, 06.-10.04.:

Janzowski C.; **Kamp H.G.**; Schlatter J.; Eisenbrand G. (2002) The mycotoxin ochratoxin A induces oxidative DNA damage in mammalian cells. Proceedings of the American Association for Cancer Research, **Vol. 43** (march 2002): 867

GDCh Lebensmittelchemische Gesellschaft, Regionalverband Süd-West, Arbeitstagung 2002, Saarbrücken, 18.-19.03.:

Kamp H.G.; Eisenbrand G.; Schlatter J.; Janzowski C. (2002) Ochratoxin A: Induktion von oxidativen Zell-Schädigungen in Säugerzellen.

GDCh Lebensmittelchemische Gesellschaft, Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt, 09.-11.09.:

Janzowski C.; **Kamp H.G.**; Schlatter J.; Eisenbrand G. (2002) Das Mykotoxin Ochratoxin A induziert oxidative DNA-Schädigung, Glutathiondepletion und Apoptose in Nierenzellen. Lebensmittelchemie, **56**: 138-139 (Vortrag)

2003:

Mitarbeit am Römpp Chemielexikon: Bearbeitung von Stichworten mit toxikologischem Hintergrund

12. International AEK Cancer Congress, Würzburg, 25.-28.03.:

H.G. Kamp; K.Würth; J. Schlatter; G. Eisenbrand; C. Janzowski (2003) Ochratoxin A: induction of cytotoxicity, DNA damage and apoptosis, www.kukm.de/aek2003 P106

GDCh Lebensmittelchemische Gesellschaft, Regionalverband Süd-West, Arbeitstagung 2003, Gießen, 31.03.-01.04.:

H.G. Kamp; K.Würth; J. Schlatter; G. Eisenbrand; C. Janzowski (2003) Das Mykotoxin Ochratoxin A induziert oxidative Zellschädigung und Apoptose in Nierenzellen. *Lebensmittelchemie* **57**: 114-115
(Vortrag)

41st Congress of the European Societies of Toxicology, Eurotox 2003, Florence (Italy), 28.09.-01.10.:

H.G. Kamp; R.Turesky; J. Schlatter; G. Eisenbrand; C. Janzowski (2003) Oxidative DNA damage induced by the carcinogenic mycotoxin ochratoxin A in vitro and in vivo. *Toxicology Letters* **144/Suppl.1**: 230

C. Janzowski; V. Glaab; C. Müller; U. Strässer; **H.G. Kamp;** A.R. Collins; G. Eisenbrand (2003) α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds: Induction of oxidative DNA-Damage in mammalian Cells. *Mutagenesis* **18**: 465-470

2004:

45. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 09.-11.03.:

H.G. Kamp; R.Turesky; J. Schlatter; G. Eisenbrand; C. Janzowski (2004) Ochratoxin A: Induction of oxidative DNA damage in primary rat tubular cells and in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, eingereicht

GDCh Lebensmittelchemische Gesellschaft, Regionalverbände Süd-West und Bayern, Gemeinsame Arbeitstagung 2004, Würzburg, 08.-09.03.:

S. Schäfer; S. Fritzen; M. Baum; **H.G. Kamp;** H. Dietrich; F. Will; F.W. Albert; T. Nesbigall; G. Eisenbrand; C. Janzowski (2004) Das antioxidative Potenzial von Apfelsaftinhaltsstoffen und Apfelsaftextrakt in humanen Kolonellen. *Lebensmittelchemie*, im Druck

Symposium of the Senate Commission on Food Safety (SKLM): „Functional Food: Safety Aspects“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Karlsruhe, 05.-07.05. 2002:

S. Schäfer, **H.G. Kamp,** C. Müller, B. Haber, G. Eisenbrand, C. Janzowski (2004) Modulation of oxidative DNA damage by constituents of carob fibre. Im Druck

H.G. Kamp, G. Eisenbrand, J. Schlatter, K. Würth, C. Janzowski (2004) Ochratoxin A: Induction of (Oxidative) DNA Damage, Cytotoxicity and Apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. Toxicology, eingereicht

10 Dank

Alles Lebendige ist ein Werden, nicht ein Sein.

Hermann Hesse

Wie bedankt man sich bei wem für die Hilfe zum erfolgreichen Gelingen einer Dissertation? Wie entscheidet man, wer zu diesem Gelingen etwas beigetragen hat? Fange ich einfach chronologisch an und bedanke mich bei meinen Eltern, dass sie mich gezeugt und groß gezogen und soviel sonst für mich getan haben? Und meinen Lehrern, dass sie mir geholfen haben, eine allgemeine Hochschulreife zu erlangen? Was ist mit all den Leuten, die mir während meines Studiums geholfen haben, die vielen Freunde, die mir ein Leben in Kaiserslautern attraktiver gemacht haben, als ich es mir anfangs vorstellte? Sollte ich den ganzen Mitarbeitern des Fachbereiches Chemie danken, weil sie ja alle mehr oder weniger dazu beigetragen haben, dass ich mein Studium abgeschlossen habe?

Ja, eigentlich sollte ich das wohl, aber ich befürchte, das wäre etwas übertrieben. Zudem wäre die Liste derer, denen ich hier wirklich gerne sagen würde, wie sehr sie mir in meinem Leben geholfen haben, dass ich in die Lage versetzt wurde, das alles hier überhaupt zu schaffen, wohl so lang, dass ich sie alphabetisch anlegen müsste, weil sich sonst niemand darin zurecht fände. Außerdem habe ich so viel geschrieben in dieser Arbeit (an dieser Stelle muss ich vor allem mal mir selber danken), dass ich keine Lust habe noch ein Buch mit dem Dank zuschreiben...

Trotzdem gibt es ein paar Dinge, die ich hier erwähnen möchte. Zunächst einmal muss ich mir zugestehen, dass ich es nicht schaffen werde, vollständig zu sein (dafür bin ich vielleicht auch schon zu sehr Naturwissenschaftler und die sind ja in erster Linie schusselig und unorganisiert). Deshalb möchte ich bei allen um Entschuldigung bitten, denen ich gerne gedankt hätte, die sich aber hier nicht finden können. Vielleicht meldet ihr euch einfach bei mir und ich lade euch zum Essen ein...

In der Tat ist es so - obwohl das eigentlich fast kein Dank, sondern eher Appell ist, der hier sowieso nicht die richtigen Adressaten erreicht - dass ich all den Kommilitonen, Mitarbeitern und Professoren danken muss, bei denen ich während des Studiums und vor allem meiner Zeit in den Gremien der Universität soviel über Menschen, Politik und das Setzen von Prioritäten lernen durfte, dass ich überhaupt mein Ziel nur erreichen konnte. Jetzt weiß ich, wie wichtig es ist, über den Teller- rand zu schauen.

Bernd, Sabine und Sonja möchte ich danken, dass sie mich während meiner Diplomarbeit auf eine Promotion im AK Eisenbrand vorbereitet haben, auch wenn sie mich für ein Thema begeisterten, das ich dann während der Promotionszeit nicht vertiefen konnte.

Frau Janzowski und Herrn Eisenbrand möchte ich danken, dass ich eben nicht die Möglichkeit hatte, dieses Thema fortzuführen, denn das, was ich auf den vorhergehenden viel zu vielen Seiten auszuführen die Möglichkeit (ein Vergnügen war es nicht immer) hatte, war ebenfalls sehr spannend und hat meinen Blick auf die Toxikologie enorm erweitert.

Wo ich gerade hier innehalte, muss ich Frau Janzowski danken für die vielen Dinge außerhalb meines Themas, die mich etwas über Konzepte und Stehvermögen lehrten, auch wenn ich nicht verhehlen kann, dass mir einige der Stunden vor dem Rechner überaus schrecklich vorkamen.

Herrn Eisenbrand muss ich nicht nur danken, weil er mein Doktorvater ist, mir ein Thema, viele außerordentlich konstruktive Diskussionen, Anregungen und die richtige Telefonnummer gab, sondern weil ich mich als gleichberechtigter Wissenschaftler fühlen und dabei Fehler machen durfte.

Sollte ich an dieser Stelle Herrn Schlatter danken, dass er das Bundesgesundheitsamt der Schweiz überzeugen konnte, meine Arbeit finanziell zu unterstützen? Nein besser nicht, das macht unter Umständen den Eindruck, ich wollte hier nur eine Pflicht erfüllen. Ich danke ihm aber dafür, dass er immer Geduld mit mir hatte und trotzdem noch hilfreiche Hinweise gab, auch wenn ich ihm meine Tagungsabstracts immer kurz vor knapp zum Lesen schickte.

Ich möchte nicht angeben, aber...

...this paragraph has to be written in english, because I want to thank Rob for the opportunity to work in his lab at the NCTR. He and his colleagues gave me a great time. And they didn't only give me a great time! Without their help I wouldn't have had any chance to do my work there. Thank you! I have to mark that the best thing in US was not the work at the NCTR, but the time with Nicole and Rob! Hope to see you once again...

Was ich bisher loswerden wollte, klingt ein bisschen danach, als hätte ich meine Arbeit problemlos aus eigener Kraft bewältigen können. Aber ohne die Hilfe ein paar anderer Leute wäre ich echt aufgeschmissen gewesen: allen Mitarbeitern der Arbeitskreise Schrenk, Marko und Eisenbrand, die mir während der letzten drei Jahre geholfen haben, kann ich nämlich nicht genug danken. Ich hoffe, ihr ver-

zeiht mir, dass ich euch manchmal echt auf die Nerven fallen musste. Ich möchte jetzt nicht aufzählen, wer mir bei welchem Problem wie viel helfen konnte, ich meine euch alle!

Trotzdem muss ich Susi erwähnen, die mir zeigte, wie schwierig Ratten zu handhaben sein können, mir aber gleichzeitig das Gefühl gab, außerordentlich kompetent mit diesen Tieren umgehen zu können (ich weiß jetzt, wie ahnungslos ich war...). Zudem lernte ich bei ihr, eine unangenehme Arbeit liebevoll auszuführen und hoffe, dass mich das davor bewahrt hat, ein Schlächter zu werden.

Und ohne Herrn Schrenk und seine tatkräftige Unterstützung praktischer (beim perfundieren!) und theoretischer Natur wären wesentliche Teile dieser Arbeit auch nicht zustande gekommen.

Sandra Jakobs und Michael muss ich für den Beistand bei den vielen Themen und Geräten danken, die mir so unendlich fern und unverständlich erschienen, ohne die ich aber manch eine Erkenntnis schuldig geblieben wäre.

Herrn Dr. von Knethen danke ich sehr für die Möglichkeit, die Durchflusszytometrie von einer weniger problembehafteten Seite kennen zu lernen. Ohne diese Hilfe wären mehr Fragen als mir lieb offen geblieben.

Ich hatte irgendwann einmal beschlossen, Lebensmittelchemie und nicht Mathematik zu studieren mit der Folge, das Handwerk der Statistik nur ähnlich rudimentär zu beherrschen, wie die Verarbeitung von Wollfäden zu Kleidungsstücken. Ich möchte mich deshalb bei Herrn Dr. Stockis bedanken, dass er mir meine Ergebnisse auf ein statistisches Fundament zu stellen half.

Anette, Ari, Daniel, Eva, Heike, Ingrid, Matthias, Moni, Peter, Rainer, den Sandras, Silke Fritzen, Tamara, Volker und vor allem Christoph danken ich für viele kleine und große Hilfen im Labor, vor allem aber, dass sie mir immer geholfen haben, den Frust in 52/327 gut wegzustecken.

Frau Bressemer will ich danken, dass ich mich seit dem Wintersemester 1995/1996 (das war noch im letzten Jahrtausend!) immer wieder dumm anstellen durfte und trotzdem weiterkam, weil sie mir alle meine Fragen beantworten konnte. Ich habe dafür winters gerne meine Palme zur Verfügung gestellt, um das Treppenhaus der Chemie etwas zu verschönern.

Thomas und den vielen anderen Freunden in Kaiserslautern, Neuwied und sonst wo im Wald und auf der Welt danke ich für die Erkenntnis, dass es ein Leben außerhalb der Uni gibt und dass das auch noch Spaß macht!

Rainer und Fine, Christina und Kim, Kristina und Marc, Henning und Christine, Nadine und Bernd, Anette und Helwig, Agnes und Stefan, Jockel und Barbara, Susanne und David und HLSDH und David und Sandra und Rolf und Kirsten und ... und... ach den anderen eben auch, möchte ich gar nicht aufzählen, was sie alles für mich getan haben. Vielen Dank, dass ihr meine Freunde seid.

Tja, Christoph und Vera...ihr seid zwei ganz besondere Freunde. Für euch beide gilt alles, was ich oben schon geschrieben habe, aber noch viel mehr. Wir haben viel Glück gehabt und viel Pech, aber ich will euch nicht danken, für das was war, sondern für das, was hoffentlich noch kommen wird.

Dann gibt es da noch jemanden, der mir ganz besonders viel Halt gegeben hat, der mich immer wieder daran erinnert hat, was eigentlich wichtig ist, der mich (so hoffe ich) auch bei schlechter Laune liebt (zwar nicht ganz widerspruchlos) und neben dem ich einfach mal herlaufen kann. Danke, Oskar!

Ich werde mich bemühen, für euch alle einfach Hennicke zu bleiben und nicht Dr. Hennicke (zumindest nicht mehr als ohnehin schon), und ich freue mich auf die Zukunft mit euch!

Es ist ja durchaus üblich, seine wichtigen Werke mit der netten Geste einer Widmung zu versehen. Ich möchte mich aber in ein paar Jahren nicht fragen, wie ich auf gerade diese Person gekommen bin. Diese Arbeit ist ja auch in erster Linie für mich und es macht doch einen ungebührlichen Eindruck, so etwas in geschwungener Schrift auf Seite drei zu schreiben. Deshalb widme ich diese Arbeit nicht irgendjemandem, sondern allen, die wie ich glauben, dass die Zukunft noch vor uns liegt und wir sie gestalten können. Die anderen sollen einfach still sein und in unserer Zukunft leben...

So, das sind meine unbedeutenden Gedanken zum Zustandekommen dieser Arbeit. Ich werde darauf verzichten, meinen Dank vor dem Hintergrund philosophischer Literatur zu diskutieren, wie ich das mit meinen vorne geschriebenen Erkenntnissen tun musste. Dann würde ich nur auf die Idee kommen, die gesellschaftliche Relevanz meiner Arbeit zu erörtern und sie in den Kontext der Geschichte und des Glaubens zu stellen. Aber Eines will ich noch sagen:

Silke...danke.