



Einflüsse von niedrig dosiertem Furan auf die Leber in vivo und in vitro

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

Dissertation

(D386)

vorgelegt von
Diplom-Chemiker

Jens Brück

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Kaiserslautern 2015

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 30.06.2015

Prüfungskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. W. Thiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Richling

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit entstand zwischen Januar 2007 und Januar 2010 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern im Rahmen des EU geförderten Projektes FURAN-RA mit dem Titel "Role of genetic and non-genetic mechanisms in furan Risk" (SSPE-CT-2006-44393).

Meinen Eltern

*Alles Wissen geht aus einem Zweifel hervor
und endigt in einem Glauben.*

Marie von Ebner-Eschenbach

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	I
2	Abkürzungsverzeichnis	III
3	Abbildungsverzeichnis.....	VI
4	Tabellenverzeichnis	VIII
5	Einleitung	1
6	Theoretische Grundlagen.....	2
6.1	Furan.....	2
6.1.1	Eigenschaften	2
6.1.2	Vorkommen und Entstehung.....	3
6.1.3	Verteilung und Metabolisierung.....	6
6.1.4	Toxikologie.....	8
6.2	Leber.....	10
6.2.1	Aufbau	10
6.2.2	Funktion	14
7	Problemstellung	21
8	Material	22
8.1	Geräte	22
8.2	Chemikalien	25
8.3	Lösungen	28
9	Methoden	32
9.1	Histologie	32
9.1.1	Tierhaltung.....	32
9.1.2	Behandlung.....	33
9.1.3	Probennahme	34
9.1.4	Probenvorbereitung	35
9.1.5	Probenauswertung.....	42
9.2	Zellkultur	43
9.2.1	Permanente Zellkulturen.....	43
9.2.2	Primäre Zellkultur.....	44
9.2.3	Versuchsdruchführung.....	48
9.2.4	Zytotoxizität.....	51

9.3	Synthese.....	52
9.3.1	Butendial.....	52
9.3.2	Adduktbildung	53
9.4	Analytik	54
9.4.1	HPLC-MS.....	54
9.4.2	GC-MS.....	56
9.5	Statistik	57
10	Ergebnisse.....	58
10.1	Histologie	58
10.2	Zellkultur	63
10.2.1	Furan in vitro	64
10.2.2	Butendial in vitro	72
10.2.3	Butendial-GSH-Addukte.....	72
11	Diskussion	80
11.1	Histologie	80
11.2	Zellkultur	84
12	Zusammenfassung	97
13	Literaturverzeichnis.....	99
14	Danksagung	108
15	Lebenslauf	110

2 Abkürzungsverzeichnis

7-MFC	7-Methoxytrifluoromethylcoumarin
AA	Acrylamid
Add	Addukt
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDA	cis-1,2-Buten-1,4-dial
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest	zweifach-destilliert
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin (Bovine Serum Albumine)
Butendial	cis-1,2-Buten-1,4-dial
bw	Körpergewicht (Body weight)
C34	transfizierte menschliche Hepatomzelllinie
CID	Kollisionsbedingte Teilung (Collision-induced dissociation)
cps	Registrierungen pro Sekunde (counts per second)
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E47	transfizierte menschliche Hepatomzelllinie
EC50	50% Effektive Konzentration (50% Effective concentration)
ECHA	Europäische Chemikalienbehörde (European Chemicals Agency)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	Elektrospray Ionisation
EU	Europäische Union
FAO	Rattenhepatomzelllinie
FDA	Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde (Food and Drug Administration; USA)
FKS	Fötales Kälberserum
GC	Gaschromatograph
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Dimer
GST	Glutathion S-Transferase

H4IIE	Rattenhepatomzelllinie
HE	Hämatoxylin-Eosin
HepG2	menschliche Hepatomzelllinie
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IARC	Internationale Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer)
KG	Körpergewicht
Konz	Konzentration
LC50	50% Lethale Konzentration
LD50	50% Lethale Dosis
LDH	Lactatdehydrogenase
LOD	untere Detektionsgrenze (Limit of Detection)
LOQ	Minimum der quantitativen Bestimmung (Limit of Quantification)
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometer
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NTP	National Toxicology Program
OECD	Organisation (Organization for Economic Co-operation and Development)
Ox	Oxidation
P450	Cytochrom P450
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBPK	physiologisch basiertes Pharmakokinetikmodell
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PC10	Antikörper für PCNA
PCNA	Antigen in proliferierenden Zellen (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PH	Primäre Rattenhepatozyten
pHPLC	Präparative HPLC
P _i	anorganisches Phosphat
PIS	Zerfallsverfolgungs-Modus (Product Ion Scan)
PNP	para-Nitrophenol
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure (Polyunsaturated Fatty Acid)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REACH	Chemikalienzulassung (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
Red	Reduktion

RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
ROS	reaktive Sauerstoffverbindung (Reactive Oxygen Species)
RT	Raumtemperatur
R _T	Retentionszeit
S9	Mirkrosomenauszug (Supernatant 9000 g)
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SIM	Einzelmassen-Modus (Single ion monitoring)
SPME	Solid Phase micro-extraction
SVHC	Substanz mit hohem Risiko (Substance of Very High Concern)
TBS	gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TEMED	N, N, N', N'' – Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett

3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturformel von Furan.....	2
Abb. 2:	Furangehalte einiger Lebensmittelgruppen	4
Abb. 3:	Bildungswege des Furans aus verschiedenen Ausgangssubstanzen in Lebensmitteln	5
Abb. 4:	Metabolisierung des Furans	7
Abb. 5:	Reaktivität des BDA mit typischen nukleophilen Gruppen.....	9
Abb. 6:	Leberaufbau bei der Ratte	11
Abb. 7:	Leberlobuli mit Pfortader, Arterie und Gallengang im Portalfeld und der Zentralvene.....	12
Abb. 8:	Schematische Darstellung der Hepatozytenanordnung.....	13
Abb. 9:	Metabolisierung in der Leber	15
Abb. 10:	Substratoxidation durch Cyp 2E1 katalysiert.	16
Abb. 11:	Struktur des Glutathion als Tripeptid.	17
Abb. 12:	Wege der reaktiven Aktivierung durch Glutathion.....	19
Abb. 13:	Aufteilung der Leberlappen in die einzelnen Probenschnitte	34
Abb. 14:	Lage der Ligaturen während der Perfusion in der Ratte	47
Abb. 15:	Schema der Zählkammer „Neubauer Improved“	48
Abb. 16:	Reduktion des Resazurins.....	51
Abb. 17:	Erste Stufe der Synthese mit dem Zwischenprodukt 2,5-Diacetoxy-2,5- Dihydrofuran.....	52
Abb. 18:	Zweite Stufe der Synthese mit resultierendem 2-Buten-1,4-dial.....	52
Abb. 19:	Rechter vorderer Leberlappen (100x/400x) eines Tieres der Hochdosisgruppe. Es wird dieselbe periportale Zone gezeigt, oben in H&E-Färbung und unten in PCNA-Färbung.....	59
Abb. 20:	Das gleiche Periportalfeld eines kaudalen Leberlappens (100x/400x) eines Tieres der Kontrollgruppe. Oben in H&E-Färbung und unten in PCNA-Färbung. Die Proliferation ist vor allem an den dunkleren, braunen Zellkernen in der PCNA-Färbung zu erkennen.....	60

Abb. 21:	Periportalfeld des Caudalen Leberlappens (100x) nach Behandlung mit 2 mg/ kg bw. Die Leberlobuli zeigen keine Beeinträchtigung.....	61
Abb. 22:	Kaudaler Leberlappen (100x / 400x) eines Tiers der Dosisgruppe 2 mg/ kg bw. Die radiale, funktionelle Anordnung der Hepatozyten war nie beeinträchtigt.	62
Abb. 23:	PCNA-Färbung der Randzone des Kaudalen Leberlappens (100x) nach Behandlung mit 2 mg/ kg bw für 28 Tage. Zwischen Randzonen und zentralen Zellen war keine Unterscheidung möglich.....	63
Abb. 24:	Die verwendeten Gefäße mit gasdichtem Raum über der Petrischale, einmal vor und einmal während der Inkubation	65
Abb. 25:	Zytotoxizität von H4IIE im geschlossenen System, nach Präinkubation mit 30 mM Aceton. (n=3)	66
Abb. 26:	Umwandlung von 7-MFC durch Cyp2E1 relativ zur Leistung von HepG2 nach 1 Stunde Inkubation.....	67
Abb. 27:	Zytotoxizität von Furan im geschlossenen System an Primären Ratten-Hepatocyten (n=5)	68
Abb. 28:	Ermittelte Effektive initiale Konzentration (50%) für Furan an Primären Hepatozyten	69
Abb. 29:	Bestimmung der effektiven Inkubationskonzentrationen für die anfangs berechneten, eingesetzten Konzentrationen	71
Abb. 30:	Bestimmung der EC50 von BDA für H4IIE und Primäre Hepatozyten	72
Abb. 31:	Zytotoxizität eines BDA-GSH-Reaktionsgemisches im Verhältnis 1:10 an HepG2 (n=8).....	73
Abb. 32:	Vergleich des zytotoxischen Effektes unterschiedlicher Reaktionsansätze auf HepG2 (n=4)	74
Abb. 33:	In den Reaktionsgemischen durch HPLC-MS-MS gefundene Verbindungen zwischen Butendial und Glutathion	75
Abb. 34:	Chromatogramm des Reaktionsansatzes von BDA mit GSH im Verhältnis 1:10.....	76
Abb. 35:	Chromatogramm des Reaktionsansatzes von BDA mit GSH im Verhältnis 1:2.....	77
Abb. 36:	Trennung der BDA-GSH-Produkte in einzelne Fraktionen	78

4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Physikochemische Daten.(Roempp, 2009)	3
Tab. 2:	Gemessene Radioaktivität von Geweben 24 Stunden nach Behandlung mit 8 mg/kg KG ¹⁴ C-Furan (n=3) (Burka <i>et al.</i> , 1991)	6
Tab. 3:	Toxikologische Daten.(Roempp, 2009)	10
Tab. 4:	Einteilung der Ratten in die verschiedenen Dosisgruppen	33
Tab. 5:	Ein Überblick über die Schritte während der Entwässerung	36
Tab. 6:	Reihenfolge der Stufen während der Färbevorbereitung.....	37
Tab. 7:	Die Stufen während der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	39
Tab. 8:	Die Stufen während der PCNA-Hämatoxylin-Färbung.....	41
Tab. 9:	Zellzahl pro Gefäß zur Erlangung von 70% Konfluenz nach 24 Stunden	49
Tab. 10:	Einwaagen der Reaktionspartner GSH und BDA	53
Tab. 11:	Fließmittel-Gradient während der HPLC-MS-Analyse	54
Tab. 12:	Potentiale und Einstellungen der ESI-Quelle und der Quadrupole.....	55
Tab. 13:	Resultierende Fraktionen aus der Preparativen Trennung des Gemisches aus der Reaktion von GSH und BDA.....	79

5 Einleitung

Furan ist ein prozessbedingter Kontaminant in Lebensmitteln. Aufmerksamkeit erlangte er verstärkt dadurch, dass er auch in geringen Dosen Karzinome in Ratten hervorrief. Nimmt man diese beiden Punkte zusammen, so erklärt sich schnell die toxikologische Brisanz dieser Verbindung.

Die Hitzebehandlung von Lebensmitteln gehört heutzutage zur alltäglichen Optimierung von Geschmack und Haltbarkeit, dass es dabei auch zu unerwünschten Stoffumwandlungen kommt, ist spätestens seit Acrylamid bekannt. Für dessen Entstehung bedarf es jedoch deutlich höherer Temperaturen als beim Furan. Zusätzlich kann sich dieses nicht nur aus kohlenhydrathaltigen Speisen bilden, sondern hat auch noch einige weitere Vorläufer. Eine der Hauptbelastungsquellen stellt Kaffee dar, die zweitwichtigste ist Gläschennahrung für Kleinkinder.

Bei letzterer dürfte wohl die hohe Flüchtigkeit ein bedeutender Faktor sein, da Babynahrung oftmals zur Sterilisation im geschlossenen Glas erhitzt wird und das gebildete Furan so nicht entweichen kann. Daraus ergibt sich gleich ein weiterer kritischer Punkt, da bei Kleinkindern schon deutlich kleinere Mengen zu bedrohlichen Belastungen führen können. Anders ausgedrückt kommen sie schneller auf die Dosis Furan, die in Ratten nachweislich Tumore ausgelöst hat. Um dieses Risiko bewerten zu können, muss allerdings sowohl der Weg zum Furan, als auch der weitere Weg zum Krebs vollständig aufgeklärt sein. Dessen weitere Enthüllung war Ziel des europäischen Furan-RA-Projektes, zu dem diese Arbeit einen Teil beiträgt.

In dieser Arbeit ging es um die leberschädigende Wirkung von Furan in vivo. Dabei war insbesondere die Krebsentstehung in frühen Stadien von Interesse, die anhand von histologischen Schnitten behandelte Ratten beurteilt wurde.

Die Untersuchungen in vitro sollten vor allem einen Zusammenhang zwischen Konzentration und Zytotoxizität herstellen, da hierdurch auch eine Beurteilung der tumorpromovierenden Effekte des Furans abgeleitet werden kann. Hierzu wurden unterschiedliche Zellkulturen mit Konzentrationsreihen des Furans und dessen metabolischen Folgeprodukten behandelt.

6 Theoretische Grundlagen

6.1 Furan

6.1.1 Eigenschaften

Furan ist unter Standardbedingungen eine farblose, wasserklare, leicht entflammbare Flüssigkeit mit einem chloroformartigen Geruch, der ab einer Konzentration von 50–75 mg/l wahrnehmbar ist. In höheren Konzentrationen ist ein süßlicher Geschmack in Wasser feststellbar (Sheftel, 2000).

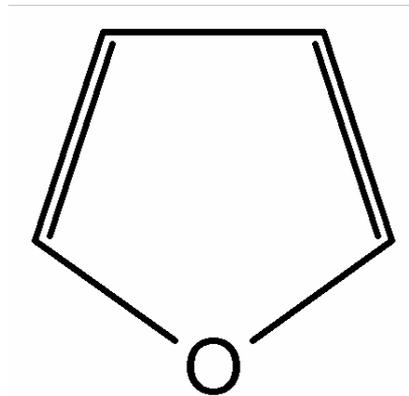


Abb. 1: Strukturformel von Furan

Der Sauerstoff-Heterocyclus besteht aus vier C-Atomen, die mit einem Sauerstoffatom einen Ring bilden. Durch zwei Doppelbindungen im Molekül entsteht ein, wenn auch nur leicht ausgeprägtes aromatisches System. Dieses kann nach IUPAC als Oxocyclopentadien benannt werden (siehe Abbildung 1). Weitere Handelsnamen sind Divinylenoxid, 1,4-Epoxy-1,3-butadien, Oxol, Tetrol und Furfuran (Sheftel, 2000; Roempp, 2009).

Während Furan in organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Alkoholen, gut löslich ist kann es in Wasser nur schlecht aufgenommen werden. So ist bei 20°C eine maximale Konzentration von 2,3% erreichbar (Sheftel, 2000).

Unter basischen Bedingungen ist Furan stabil, wohingegen es unter Säureeinwirkung zur Zersetzung kommt.

Tab. 1: Physikochemische Daten.(Roempp, 2009)

Summenformel	C ₄ H ₄ O
CAS No.	110-00-9
Molare Masse M_r	68,08
Schmp. [°C]	-86
Sdp. [°C]	31
Dichte (ρ) [g/cm ³]	0,944
FP. [°C]	-35
Dampfdruck [hPa, 20 C]	658
Brechzahl (n_D^{20})	1,4214
Explosionsgrenzen [Vol.- %]	2,3–14,3

6.1.2 Vorkommen und Entstehung

Natürliche Vorkommen von Furan wurden bei der Destillation von Harzen verschiedener Nadelhölzer gefunden und auch bei Ebereschen wurde es im gasförmigen Teil der Absonderungen festgestellt. In der chemischen Industrie wird Furan als Lösungsmittel eingesetzt bzw. dient als Ausgangsstoff zur Herstellung von Tetrahydrofuran. Es entsteht als Intermediat z.B. bei der Polymerisierung von Furanharzen (Isidorov *et al.*, 1985; Roempp, 2009).

Auch die Allgemeinbevölkerung ist einer Exposition mit Furan ausgesetzt, so ist Furan in der Gasphase des Zigarettenrauchs in Konzentrationen von 8,4 µg/40 ml Zug enthalten (Egle and Gochberg, 1979).

Lebensmittel sind eine weitere wichtige Quelle für die Furanbelastung des Menschen. So findet es sich in einem sehr breiten Spektrum von Lebensmitteln, denen überwiegend gemein ist, dass sie einem Erhitzungsprozess unterzogen wurden. Dabei spielen die Art der Erhitzung und die Bedingungen während dessen eine entscheidende Rolle für den Furangehalt (Crews and Castle, 2007).

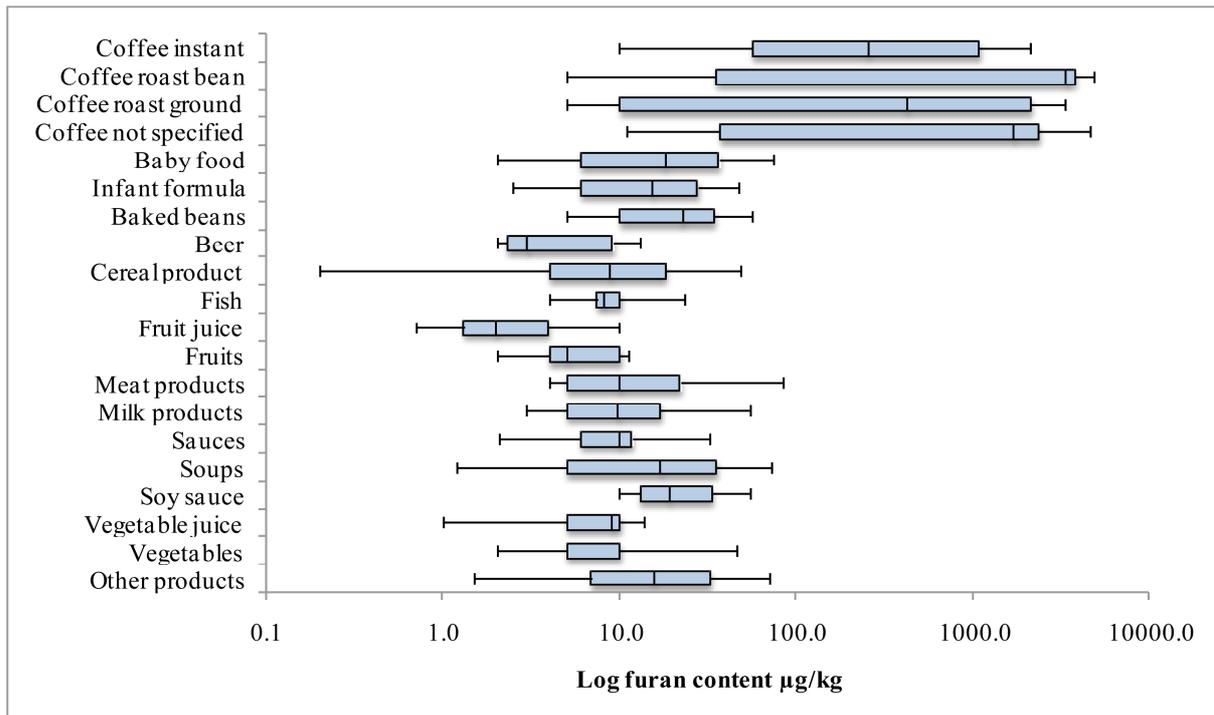


Abb. 2: Furangehalte einiger Lebensmittelgruppen (EFSA, 2009)

So wurden nach dem Rösten hohe Gehalte von maximal 3,4 mg/kg in Kaffeebohnen gefunden. Davon verbleiben ca. 25–40% im fertigen Kaffegetränk. Für den Erwachsenen resultiert hieraus eine der größten ernährungsbedingten Furanquellen überhaupt und spiegelt sich in der Diskussion um dieses Getränk wider (Kuballa, 2007; Richling and Habermeyer, 2014). Weniger überraschend, als beim offenen Röstvorgang ist die Entwicklung und Anreicherung des flüchtigen Furans im geschlossenen Gefäß. So ist im Handel erhältliche Babynahrung mit Furangehalten von bis zu 108 µg/kg gefunden worden. Aus diesen beiden Hauptquellen zusammen mit vielen weiteren wurde eine durchschnittliche tägliche Belastung von 0,03-0,59 µg/kg KG für Erwachsene bzw. 0,09-0,22 µg/kg KG für Kleinkinder ermittelt (FDA, 2009; EFSA, 2011).

Diese grundverschiedenen Beispiele lassen erkennen, dass Furan in einem breiten Spektrum von Lebensmitteln entstehen kann. Daher ist davon auszugehen, dass nicht nur ein Ausgangsstoff für die Entstehung verantwortlich ist.

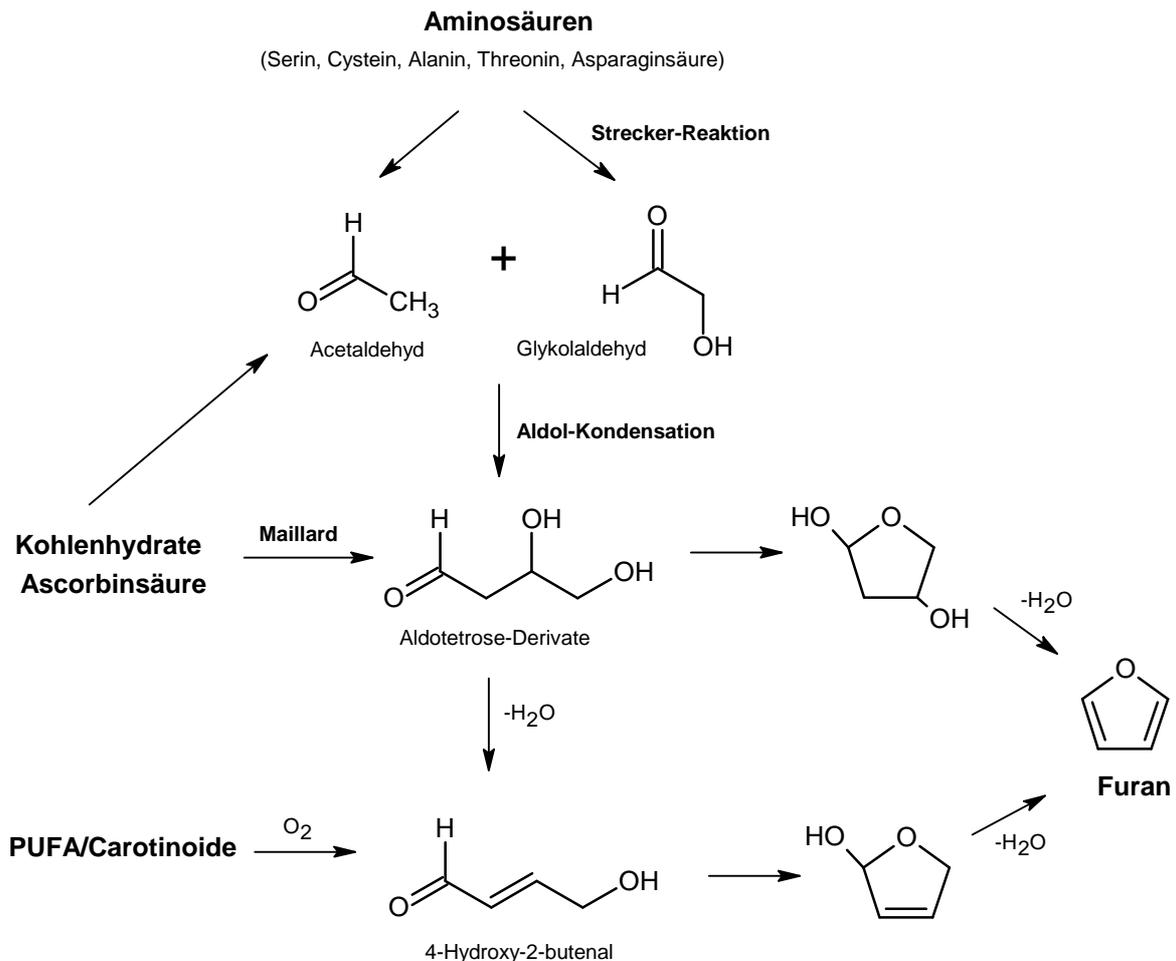


Abb. 3: Bildungswege des Furans aus verschiedenen Ausgangssubstanzen in Lebensmitteln (Perez Locas and Yaylayan, 2004; Vranová and Ciesarová, 2009)

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Furan aus Kohlenhydraten und Ascorbinsäure über die Maillardreaktion, aber auch aus Aminosäuren und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) gebildet wird (Becalski and Seaman, 2005; Fan, 2005). Im Modellversuch konnte dann ermittelt werden, dass die Furanbildung durch bestimmte Substanzgemische erhöht wird. So war die Entstehung bei Ascorbinsäure als Reinsubstanz am höchsten, gefolgt von Mischungen aus Glycolaldehyd/ Alanin, Erythrose, Ribose/ Serin, Sucrose/ Serin, Fructose/ Serin und Glucose/ Serin (Perez Locas and Yaylayan, 2004).

6.1.3 Verteilung und Metabolisierung

6.1.3.1 Absorption

In einem Experiment mit männlichen F344-Ratten, denen ^{14}C -markiertes Furan in einer Dosis von 8 mg/kg Körpergewicht (KG) über 8 Tage verabreicht wurde, zeigte sich, dass Furan vollständig absorbiert wurde. Auch in einer Inhalationsstudie wurde Furan proportional zur aufgenommenen Konzentration in der Lunge resorbiert (Egle and Gochberg, 1979; Burka *et al.*, 1991).

6.1.3.2 Verteilung

Die geringe Polarität des Furans ermöglicht eine ungehinderte Passage der Membranen, so dass es sich in allen Kompartimenten des Körpers verteilen kann. 24 Stunden nach einmaliger Gabe von 8 mg/kg KG wurden radioaktiv markierte Furanspuren in verschiedensten Organen nachgewiesen.

Tab. 2: Gemessene Radioaktivität von Geweben 24 Stunden nach Behandlung mit 8 mg/kg KG ^{14}C -Furan (n=3) (Burka *et al.*, 1991)

Gewebe	Radioaktivität in nmol eq/g Gewebe			Dosisanteil in %		
Leber	307	±	9	13	±	3
Niere	60	±	12	0,45	±	0,8
Dickdarm	25	±	5	0,13	±	0,03
Dünndarm	13	±	3	0,15	±	0,04
Blut	5,5	±	0,7	0,42	±	0,0
Lunge	3,5	±	1,6	0,02	±	0,01

Ungefähr 15% der Dosis wurden also innerhalb von 24 Stunden auf die Organe verteilt. Dabei war die messbare Radioaktivität überwiegend an Proteine gebunden und ging innerhalb von 7 Tagen auf ein Level unterhalb der Nachweisgrenze zurück (Burka *et al.*, 1991).

6.1.3.3 Metabolisierung

Nach einmaliger oraler Gabe von 8 mg/kg KG ^{14}C -Furan wurden nach 24 Stunden 14% unverändert abgeatmet, während die restlichen 86% einer Metabolisierung

unterliegen. Das entspricht ziemlich genau dem, was Kedderis et al. in einem physiologisch basierten Pharmakokinetik Modell (PBPK) ermittelte. Bei gleicher Dosis und Zeitvorgabe kam er auf einen Anteil des metabolisierten Furans von 84% (Burka *et al.*, 1991; Kedderis *et al.*, 1993). Über einen „First-Pass-Effekt“ wird Furan in der Leber schnell umgewandelt. Entscheidend dabei ist die Menge des Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1), das für die Metabolisierung des Furans verantwortlich ist. Die Induktion dieses Enzyms steigert die Umwandlungsrate wohingegen eine Inhibition diese nur reduziert, aber nicht vollständig verhindert. Eine Vorbehandlung der Ratten mit Aceton zeigte daher eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität durch Induktion des CYP2E1 (Carfagna *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 2006).

Der wohl wichtigste dieser Metaboliten ist das *cis*-1,2-Buten-1,4-dial (Butendial, BDA), das durch Oxidation einer Doppelbindung und anschließender Ringöffnung des Furans entsteht. Als Zwischenstufe könnte ein sehr kurzlebiges Epoxid entstehen, das dann spontan zum Butendial abreagiert (Chen *et al.*, 1995).

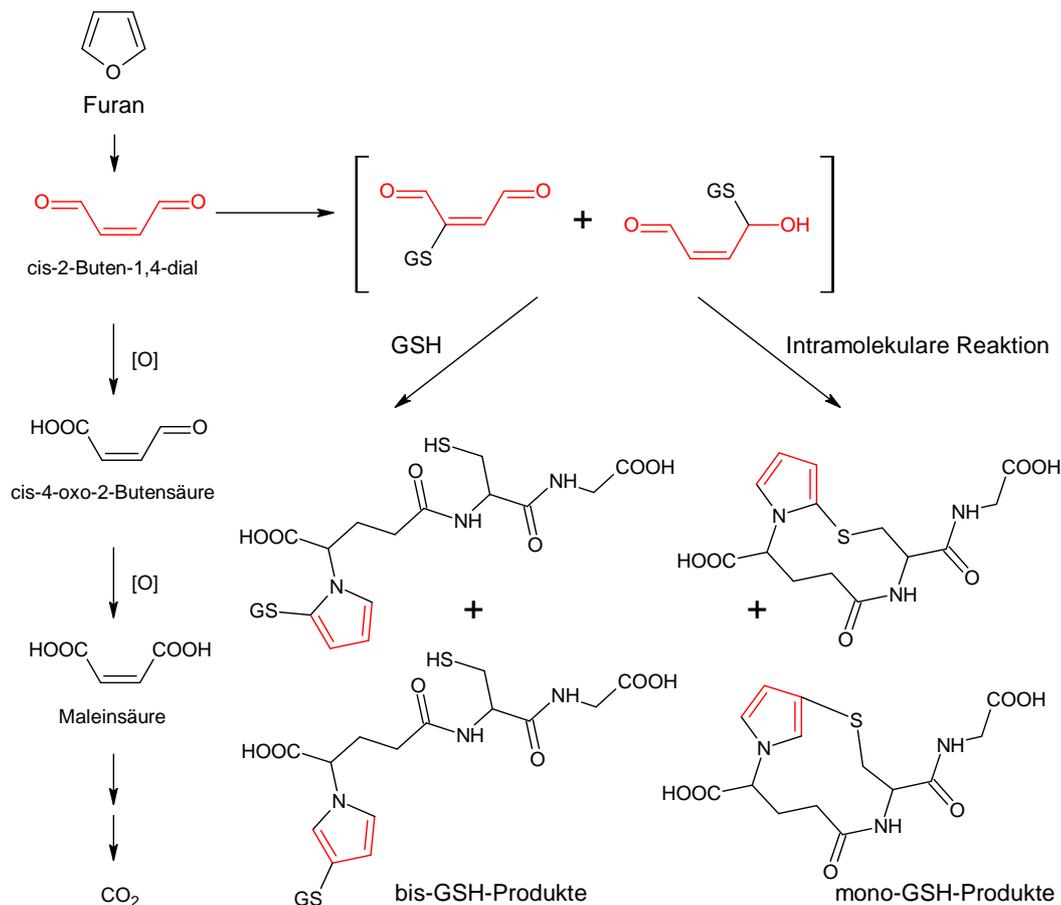


Abb. 4: Metabolisierung des Furans (Peterson *et al.*, 2006)

Aufgrund seiner starken Elektrophilie ist dieses Diketon hochreaktiv. So ist bekannt, dass es spontane Reaktionen mit Proteinen, Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Glutathion (GSH) eingeht (Chen *et al.*, 1997; Byrns *et al.*, 2006). Die Reaktion mit GSH ist ein klassischer Schritt des Phase II Metabolismus. Das besondere bei BDA ist jedoch, dass es gleichzeitig eine Verknüpfung mit der Thiolgruppe und der Aminogruppe des GSH eingeht und dies sowohl intramolekular, als auch unter Beteiligung mehrerer Moleküle. Woraus sich Ringverbindungen mit unterschiedlichen Anteilen von BSH und BDA ergeben, die im Folgenden unter Angabe der Anzahl der jeweils beteiligten Konjugatbildner benannt werden (z.B. *bis*-GSH-BDA-Konjugat) (Peterson *et al.*, 2006).

6.1.3.4 Eliminierung

Innerhalb von 24 Stunden nach oraler Gabe von 8 mg/kg KG ¹⁴C-Furan wurde der mit 26% größte Anteil davon, unter Ringöffnung und vollständiger Oxidation, als Kohlendioxid abgeatmet. Über Urin und Fäzes wurden weitere 20% bzw. 22% der Metabolite ausgeschieden. Nach dieser Zeit verblieben 19% der Metabolite im Körper (Burka *et al.*, 1991).

Weitere Untersuchungen des Urins zeigten, dass sich mindestens 18 verschiedene Metabolite bilden, die alle auf das Butendial zurückgehen. Der häufigste ausgeschiedene Metabolit ist das *mono*-GSH-*mono*-BDA-Konjugat (Peterson *et al.*, 2006). Weitere identifizierte Metabolite im Urin stammten entweder vom *mono*-GSH-*mono*-BDA-Konjugat ab oder waren Abbauprodukte von Proteinaddukten. Einer konnte auf eine Lysinverbindung zurückgeführt werden und zwei weitere stammen höchstwahrscheinlich von einem Cross-Link zwischen BDA mit Lysin und Cystein ab (Kellert *et al.*, 2008).

6.1.4 Toxikologie

Furan-behandelte Hepatozyten und isolierte Mitochondrien von Furan-exponierten Ratten zeigen einen ATP-Verlust von 95% bedingt durch eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (Mugford *et al.*, 1997).

Die meisten nachteiligen Effekte des Furans können auf seinen Metaboliten *cis*-1,2-Buten-1,4-dial zurückgeführt werden. So konnte dessen Proteinbindung *in vitro*, wie auch *in vivo* nachgewiesen werden (Burka *et al.*, 1991; Parmar and

Burka, 1993). In Modell-Inkubationen mit nukleophilen Aminosäuren und GSH wurden meistens mehrstufige Reaktionen unter Beteiligung von einer Thiol- und einer Aminogruppe beobachtet. Dieser Vorgang fand auch zwischen unterschiedlichen Molekülen statt, so dass sich Cross-Links zwischen Proteinbestandteilen (z.B. Lysin mit Cysteine) bildeten.

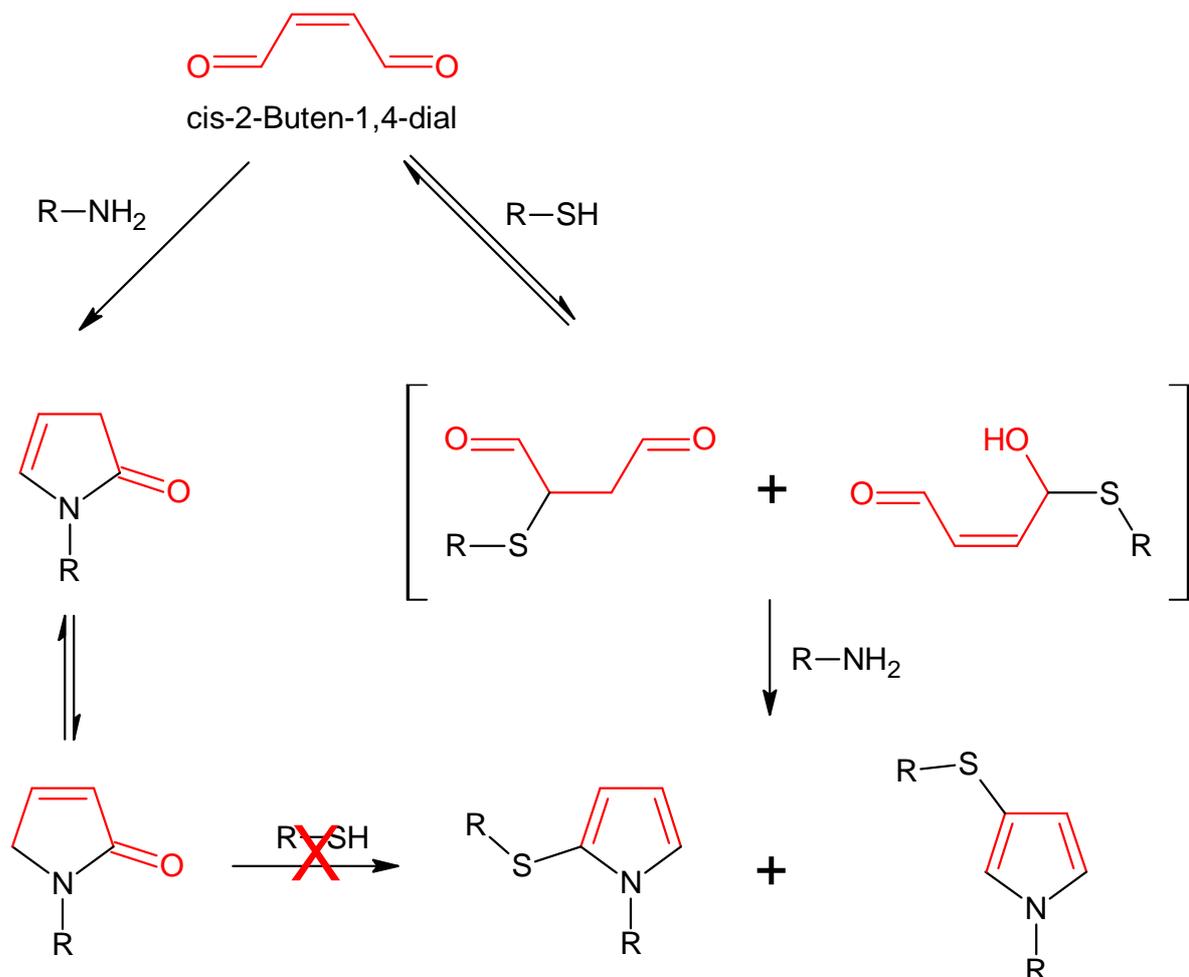


Abb. 5: Reaktivität des BDA mit typischen nukleophilen Gruppen (**Peterson et al., 2006**)

Dies belegt die hohe Proteinreaktivität des BDA (Chen *et al.*, 1997). Nach einer Inkubation mit BDA wurden Proteinextrakte aus Hepatozyten mit GSH-Antikörpern im Immunoblot untersucht. Es wurden Verknüpfungen u.a. zwischen GSH und Lysingruppen der Proteine nachgewiesen, woraus ersichtlich ist, dass der zunächst mit GSH gebildete Furan-Metabolit weiter mit Nucleophilen der Zelle reagiert (Lu *et al.*, 2009).

Dass über ein Viertel einer Furandosis als CO₂ abgeatmet wird (siehe 6.1.3.4) deutet auf weitere Intermediate hin, die ihrerseits eine spezifische, toxikologische Bedeutung haben. Zu nennen wären z.B. Maleinsäure und Fumarat, die als Oxidationsprodukte des Furans in Frage kommen (Peterson *et al.*, 2006).

Tab. 3: Toxikologische Daten.(Roempp, 2009)

Wassergefährdungsklasse (WGK)	3
MAK-Werte-Liste 2009 – krebserzeugend: Kategorie	2
LD ₅₀ [mg/kg] (EPA, 2001)	650 (Ratte oral) 650 (Maus, oral)
LC ₅₀ [mg/kg/1h] (EPA, 2001)	42 (Maus, inhalativ) 3398 (Ratte inhalativ)

6.2 Leber

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels und findet sich in voll funktionsfähiger Form in allen Wirbeltieren. Beim Menschen stellt die Leber mit ca. 1500 g eines der größten Organe dar (Sauermost and Freudig, 2002).

6.2.1 Aufbau

Der makroskopische Aufbau der Leber kann zwischen den Säugerarten sehr unterschiedlich ausfallen. So finden sich beim Menschen lediglich vier ungleich große Leberlappen, ein großer Rechter, sowie ein etwas kleinerer Linker und die beiden deutlich kleineren Lobus caudatus und Lobus quadratus. Die Ratte hingegen besitzt eine fünffache Unterteilung der Leber. Beim Menschen wird das Gallensekret in der Gallenblase gesammelt und je nach Bedarf in das Lumen des Zwölffingerdarms abgegeben. Bei den Ratten findet diese Abgabe kontinuierlich statt, da sie keine Sammelblase besitzen (Boorman, 1990; Mutschler *et al.*, 2007).

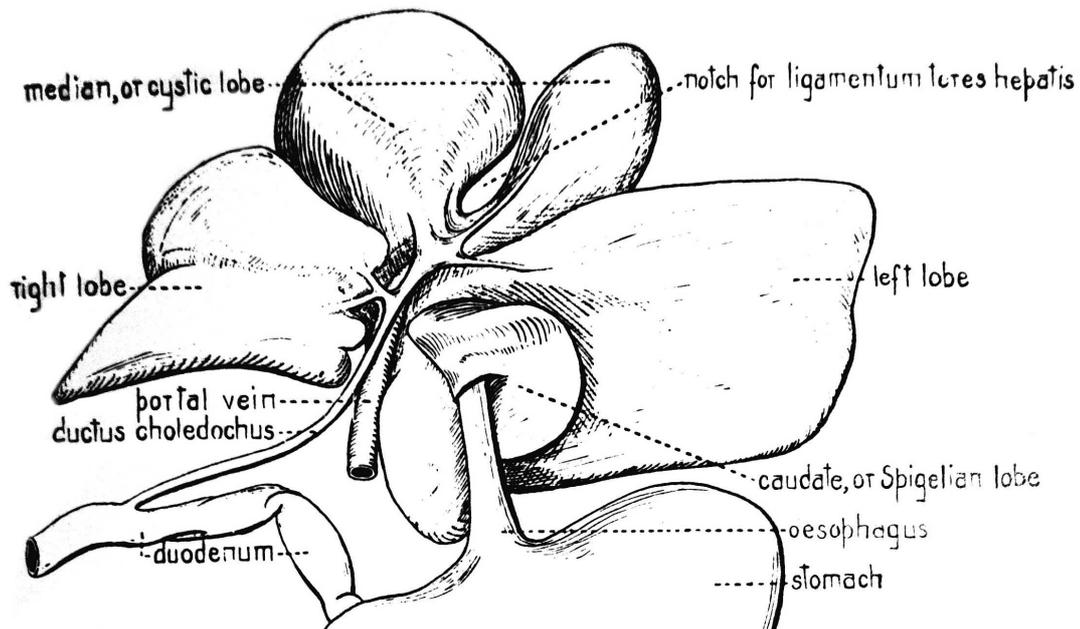


Abb. 6: Leberaufbau bei der Ratte (Green, 1968)

Bei näherer Betrachtung ist die Funktionsweise und der Aufbau der funktionellen Einheiten jedoch bei allen Säugern identisch und soll hier exemplarisch für den Menschen beschrieben werden. Sammelläppchen werden von jeweils einem Pfortaderast angeströmt und eine Sammelvene ist für den Abfluss aus dieser Einheit zuständig. Die Pfortader verzweigt sich dabei immer weiter, so dass immer feinere Einheiten entstehen. Die kleinste Funktionseinheit ist der Leberlobulus. Hierin finden sich die Sinusoiden, besonders weite Blutkapillaren, die eine Versorgung annähernd sämtlicher Epithelzellen gewährleisten. Sie besitzen eine hexagonale Anordnung um eine Zentralvene, nach der sich auch die Leberzellen ausrichten (Mutschler *et al.*, 2007).

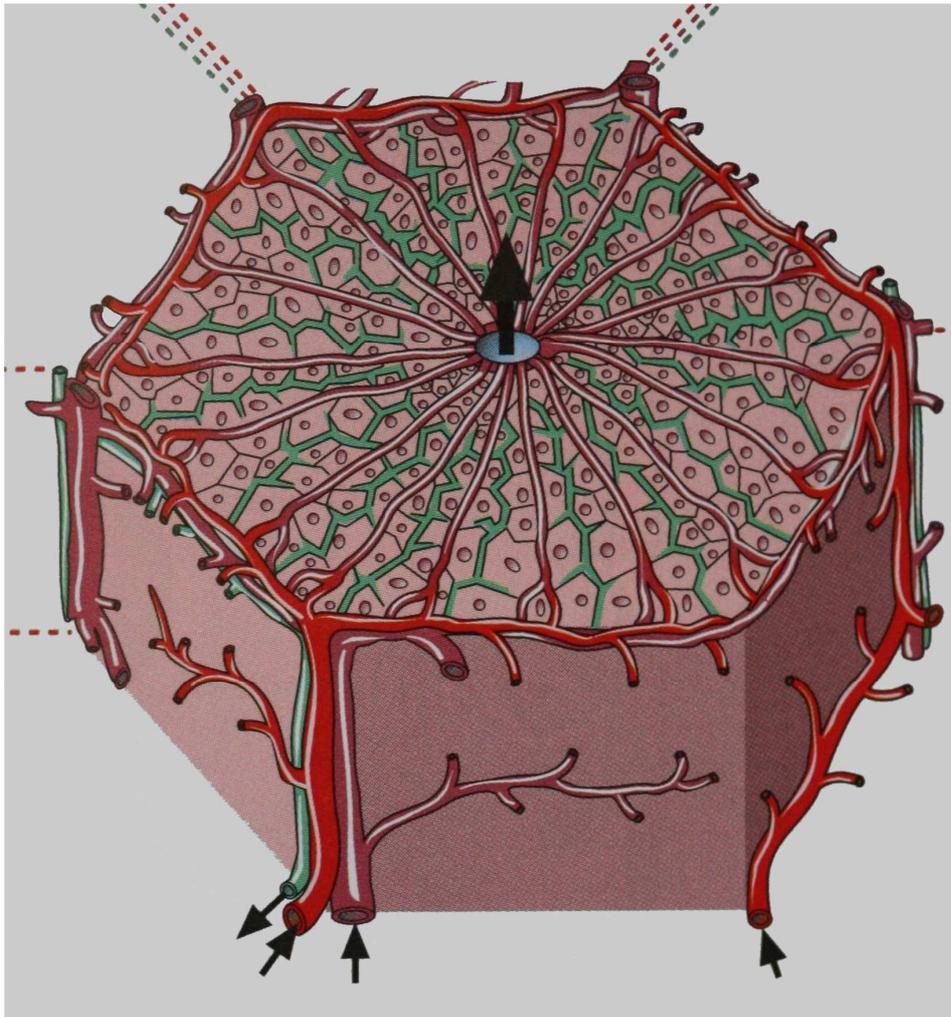


Abb. 7: Leberlobuli mit Pfortader, Arterie und Gallengang im Portalfeld und der Zentralvene (**Mutschler et al., 2007**)

Rund um die Hepatozyten besteht ein weiteres Netzwerk, das die Produkte der Gallensekretion sammelt und entweder in der Gallenblase sammelt, oder aber direkt über den Gallengang in das Darmlumen abgibt. Die Gallenkapillaren verlaufen stets parallel zu den Pfortaderästen (Sauermost and Freudig, 2002).

Hier findet sich mit den Arteriolen ein weiteres Gefäß, das über die Leberarterie die Sauerstoffversorgung der Hepatozyten und anderer Zellen sicherstellt. Mit ihr bildet sich im Lobulus eine Trias aus Pfortadersinusoid, Gallenkapillare und Arteriole, die als Periportalzone oder Glisson-Dreieck bezeichnet wird (Sauermost and Freudig, 2002).

Sie ist für 20-25% des Blutzustroms verantwortlich und die Pfortader für die restlichen 75-80% oder 1150 ml/min. Im Gegenstrom wird die Gallenflüssigkeit (900 ml/Tag) abtransportiert, was natürlich eine Trennung von Lebersinosoiden und Gallenkapillaren voraussetzt (Klinke et al., 2003).

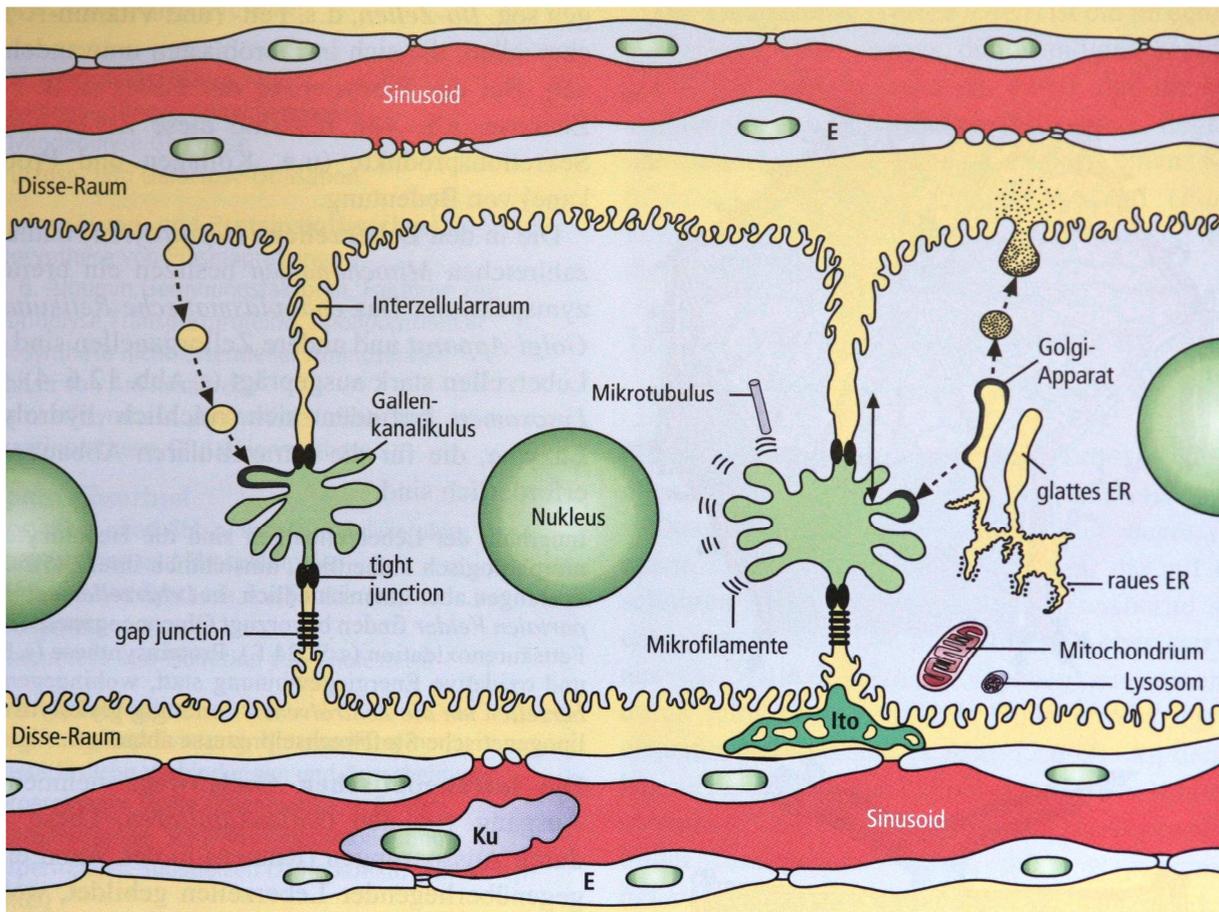


Abb. 8: Schematische Darstellung der Hepatozytenanordnung
(Mutschler *et al.*, 2007)

Ort der Gallenproduktion ist vor allem das innerhepatische Gewebe, genauer 80% in den Hepatozyten und 20% in den Epithelzellen. Letztere kleiden die Sinusoide aus und haben einen räumlichen Abstand zu den Hepatozyten. Dieser Spalt wird als Disse'scher Raum bezeichnet und ermöglicht den Leberzellen eine Oberflächenvergrößerung durch Mikrovilli. Diese ragen auch in die Gallenkapillaren, die sich als Spalt zwischen zwei Leberzellen bilden. Tight junctions verhindern die Kommunikation mit dem Disse'schen Raum. Die Gallenkapillaren besitzen folglich keine eigene Epithelschicht sondern die Hepatozyten übernehmen die Trennung zum Sinusoid. Sie sind also polarisiert, mit ihrer basalen Seite im Gallensystem (Junqueira and Carneiro, 2005; Wachtler, 2005).

Die Hepatozyten sind mit 20-40 μm recht große Zellen, die reich mit allen Arten von Organellen ausgestattet sind. Von diesen sind vor allem das

Endoplasmatische Reticulum (ER) für den Metabolismus von Bedeutung. Auf der Oberfläche vor allem des glatten ER sind die für den Fremdstoffwechsel verantwortlichen Enzyme lokalisiert. Dabei ist die Ausstattung der Hepatozyten in der Leber nicht homogen, sondern vor allem aufgrund der Sauerstoffversorgung und Fließrichtungen örtlich variabel. Hinzukommt noch, dass einige der Enzyme induzierbar sind, so dass eine beträchtliche Variabilität der Leberzellen entstehen kann (Jungermann, 1988).

6.2.2 Funktion

Die anatomische Lage der Leber ermöglicht ihr ein enormes Spektrum an Aufgaben zu erfüllen. Da sämtliche Stoffe, die über den Magen-Darm-Trakt resorbiert werden zunächst durch sie hindurchfließen, stellt sie eine primäre Auffang-, Verteilungs- und Speicherstelle der Verdauungsprodukte dar. Die umfangreichste Aufgabe stellt dabei sicherlich die Speicherung von Kohlenhydraten in Form von Glykogen dar (Sauermost and Freudig, 2002).

Die meisten chemischen Vorgänge finden in den Hepatozyten statt. Ihre physiologischen Tätigkeiten können in drei Abschnitte unterteilt werden. Nach der basolateralen Aufnahme aus der Pfortader findet eine intrazelluläre Verstoffwechslung statt. Die meist apikale Abgabe erfolgt dann in die Gallenkanälchen (Klinke *et al.*, 2003).

Dieser Weg gilt insbesondere für die in der Leber synthetisierten Gallensäuren, das Bilirubin und anderer Gallenbestandteile. Andere Syntheseprodukte, wie z.B. Plasmaproteine, Glykogen und Lipidproteine werden in den Blutkreislauf abgegeben. Für die beiden Letzteren ist die Leber zusätzlich ein wichtiger Speicherort und dient damit der Aufrechterhaltung der Plasmaspiegel (Schiebler, 2005).

Eine weitere essenzielle Aufgabe der Leber besteht in der Entgiftung des Organismus. Dabei ist die ständig ablaufende Entfernung der bei endogenen Stoffwechselprozessen anfallenden toxischen Substanzen, vor allem des Ammoniaks, von Bedeutung (Sauermost and Freudig, 2002).

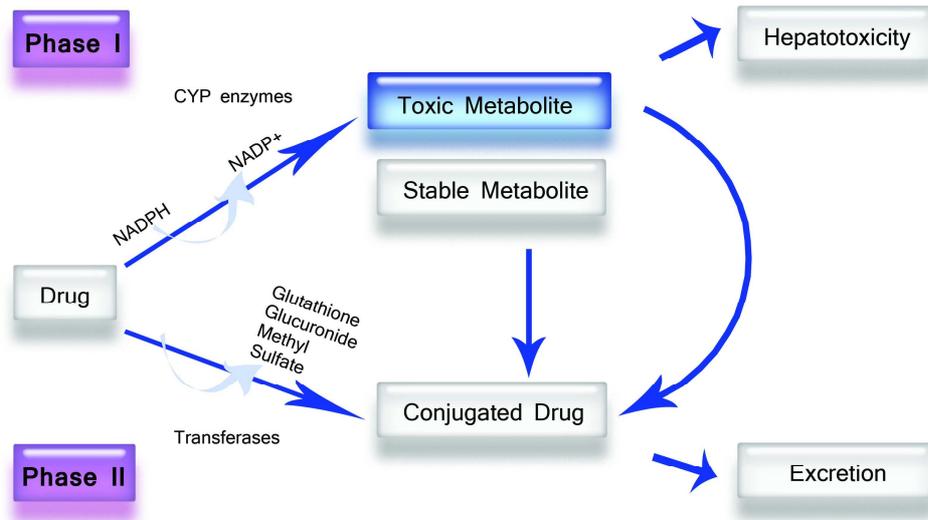


Abb. 9: Metabolisierung in der Leber (Larson, 2007)

Da im Darm die meisten lipophilen Stoffe aufgenommen werden und so in den Organismus gelangen, stellt die Leber auch für diese die erste Barriere dar. Um eine Anreicherung im Fettgewebe zu verhindern, werden Fremdstoffe in der Leber möglichst bald in eine hydrophilere Form umgewandelt. Dieser Biotransformation genannte Schritt lässt sich meist in zwei Phasen unterteilen. In Phase I wird eine funktionelle Gruppe in das Lipophil eingeführt. Dafür stehen verschiedene Enzyme zur Verfügung, zu denen auch die für Furan relevanten Cytochrome P450 gehören. In der Phase II wird oftmals eine Konjugation an der zuvor entstandenen Reaktionsstelle katalysiert, im Falle des Furans ist hier das Glutathion mit seinem Enzym der Glutathion-S-Transferase zu nennen (Dekant and Vamvakas, 2005; Peterson, 2006).

6.2.2.1 Cytochrom P450 2E1

Die Superfamilie der Cytochrome P450-Enzyme bildet eine Gruppe grundsätzlich oxidativ detoxifizierender Enzyme, wobei die Hauptfunktion darin besteht, hydrophobe Moleküle unter Zuhilfenahme von NADPH und Sauerstoff, in wasserlöslichere Produkte zu hydroxylieren (Penzlin, 2005).

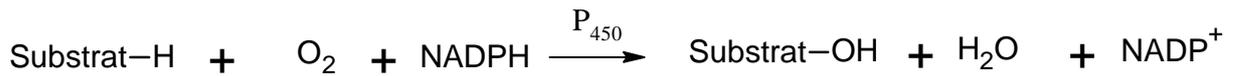


Abb. 10: Substratoxidation durch Cyp 2E1 katalysiert.

Dabei wird das energieliefernde NADPH zunächst von der Cytochrom-P450-Reductase verarbeitet, welche anschließend die zur eigentlichen Reduktion nötige Energie an das Cytochrom weiterleitet (Sauermost and Freudig, 2002).

Die Bildung der meisten Cytochrome P450 findet überwiegend in der Leber statt, dabei ist innerhalb des Organs eine zonale Verteilung zu erkennen. Während die Konzentration in der Periportal-Zone besonders niedrig ist, steigt sie im allgemeinen zum zentralvenösen Bereich hin deutlich an, was einerseits mit dem entgegengesetzt verlaufenden Sauerstoffgradienten zusammenhängen mag, andererseits an der zonalen, heterogenen Genexpression liegt (Gebhardt, 1992; Katz, 1992; Maier *et al.*, 1994).

Ein wichtiges Aufgabengebiet dieses Enzymsystems ist die Synthese verschiedener endogener Moleküle. Hier ist jedoch ihr Einsatz bei der Umwandlung und Eliminierung schädlicher, nicht-biologischer Verbindungen von größerem Interesse. So gibt es eine Vielzahl von Cytochromen, die eine mehr oder weniger ausgeprägte, substratspezifische Enzymaktivität zeigen (Ioannides, 1996).

Cytochrom P450 2E1 ist toxikologisch besonders bedeutend, da es für die Umwandlung vieler, im Umfeld des Menschen vorkommender Kontaminanten (z.B. Alkohole, Pharmaka) verantwortlich ist. Bei den Substraten scheint es sich ausschließlich um kleine Moleküle mit hydrophobem Charakter ähnlich dem Furan zu handeln (McGehee *et al.*, 1994; Lewis, 2004).

Gebildet wird es anscheinend lediglich von Säugetieren, wobei die Funktionalität in Mäusen, Ratten und dem Menschen wohl identisch zu sein scheint. Sie alle bilden es in Leber und Niere, gefunden wird es aber auch in Lunge, Haut und Ösophagus. Cyp 2E1 ist dabei für die weiter oben bereits angesprochene Verteilung in der Leber ein Paradebeispiel, da es besonders in den zentrilobularen Bereichen seine Aktivität zeigt. Dies gilt sowohl für die Ratte, als auch den Menschen, sofern keine Induzierung vorliegt (Cohen *et al.*, 1997; Ding and Kaminsky, 2003; Du *et al.*, 2004; Gates *et al.*, 2012).

Üblicherweise hat Cyp 2E1 einen Anteil von unter 10% an der Gesamtheit der Cytochrome P450 des Menschen. Aufgrund seiner sehr guten Induzierbarkeit, durch z.B. Ethanol, schwankt die hepatische Konzentration allerdings um bis zu 50% (Novak and Woodcroft, 2000; Rendic, 2002).

Die Beteiligung von Cyp 2E1 an der Metabolisierung von Furanen ist schon seit langem bekannt. Es findet stets eine Oxidation statt, die allerdings je nach Substitution des Furangrundgerüsts auf zwei verschiedenen Intermediaten beruht. Einerseits kann zunächst ein sehr reaktives Epoxid des Furanrings gebildet werden, das dann mit Nucleophilen weiterreagiert. Andererseits wurde häufiger die Bildung eines cis-Enediones beobachtet, was sich allerdings auch in einem weiteren Reaktionsschritt aus dem Epoxid bilden kann. Für Furan selbst konnte es allerdings noch nicht nachgewiesen werden, und da sich auch keine Intermediate mit erhaltenem Furansystem finden, liegt es nahe, dass im Falle des Furans kein Epoxid sondern direkt das Butendial gebildet wird. Ein weiterer Beleg dafür ist die fehlende Entstehung von S-(2-Furanyl)-Glutathion, das sich aus dem Epoxid bilden würde (Ruzo *et al.*, 1985; Peterson *et al.*, 2005; Druckova and Marnett, 2006; Gates *et al.*, 2012).

6.2.2.2 Glutathion

Glutathion ist ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin, welches aufgrund seiner Thiolgruppe und der γ -Glutamylobindung eine Fülle von biologischen Funktionen in den Zellen erfüllt. Es ist beteiligt in der Proteinsynthese, in der Regulation des Zellmilieus, in der Reparatur von DNA-Schäden und nicht zuletzt in den Entgiftungsreaktionen (Sauermost and Freudig, 2002).

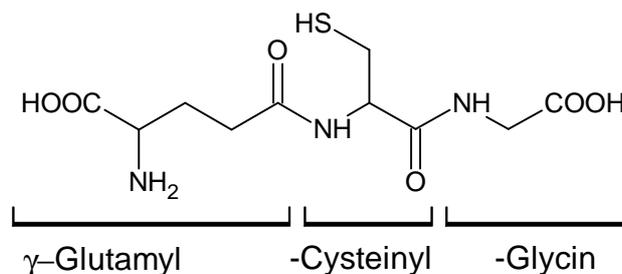


Abb. 11: Struktur des Glutathion als Tripeptid. (Chasseaud, 1973)

Glutathion stellt keine hohen Anforderungen an seine Reaktionspartner und demzufolge deckt es ein weites Spektrum an Xenobiotika ab. Die strukturellen Voraussetzungen für eine Interaktion sind einerseits wenigstens ein elektrophiles Zentrum und zweitens eine relative Hydrophobie. Sind diese beiden Bedingungen erfüllt, so wird die Reaktion zusätzlich durch die Glutathion S-Transferase (GST) katalysiert, die die Konjugation begünstigt (Jakoby, 1978; Armstrong, 1997). Auch wenn die Reaktivität - selbst unter katalytischem Einfluss - nicht sehr effizient ist, kann doch eine große Menge an Substrat lediglich aufgrund der hohen Konzentrationen umgesetzt werden. Glutathion findet sich dabei in nahezu allen Zellen mit zum Teil hohen Konzentrationen von etwa 5 mmol/l, in der Leber sogar mit ca. 10 mmol/l. Dort findet sich auch GST mit seiner höchsten Konzentration von immerhin bis zu 10% der gesamten hepatozellulären Proteine (Akerboom and Sies, 1981; Wexler *et al.*, 2005).

In neueren Untersuchungen finden sich immer häufiger auch Hinweise auf die Beteiligung von Glutathion an toxifizierenden Umwandlungen. So ist bekannt, dass es aktivierende Mechanismen mit Haloalkanen, Fluortelomeralkoholen, Quirionen, Quinoneiminen und Isothiocyanaten gibt (Koob and Dekant, 1991; Pompella *et al.*, 2003; Wexler *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2009; Takakusa *et al.*, 2009).

Die Mechanismen, über die diese metabolischen Aktivierungen ablaufen, sind so unterschiedlich wie die Substrate selbst. Bei den erstgenannten Halogenalkanen ist z.B. eine direkte Substitutionsform aus GSH und 1,2-Dihalogenalkanen bekannt. Die durch die Halogene stark elektrophilen Kohlenstoffatome gehen dabei eine Verbindung mit dem Schwefel des Glutathions ein, was durch die GST katalysiert abläuft. Es bildet sich ein selbst sehr elektrophiles Episulfonium-Ion, das unter anderem DNA-Addukte bildet. Das häufigste gefundene Produkt, S-2-N⁷-guanylethylglutathione, resultiert aus der Reaktion dieses Intermediates mit Guanine (Inskeep *et al.*, 1986; Monks *et al.*, 1990; Anders, 2008).

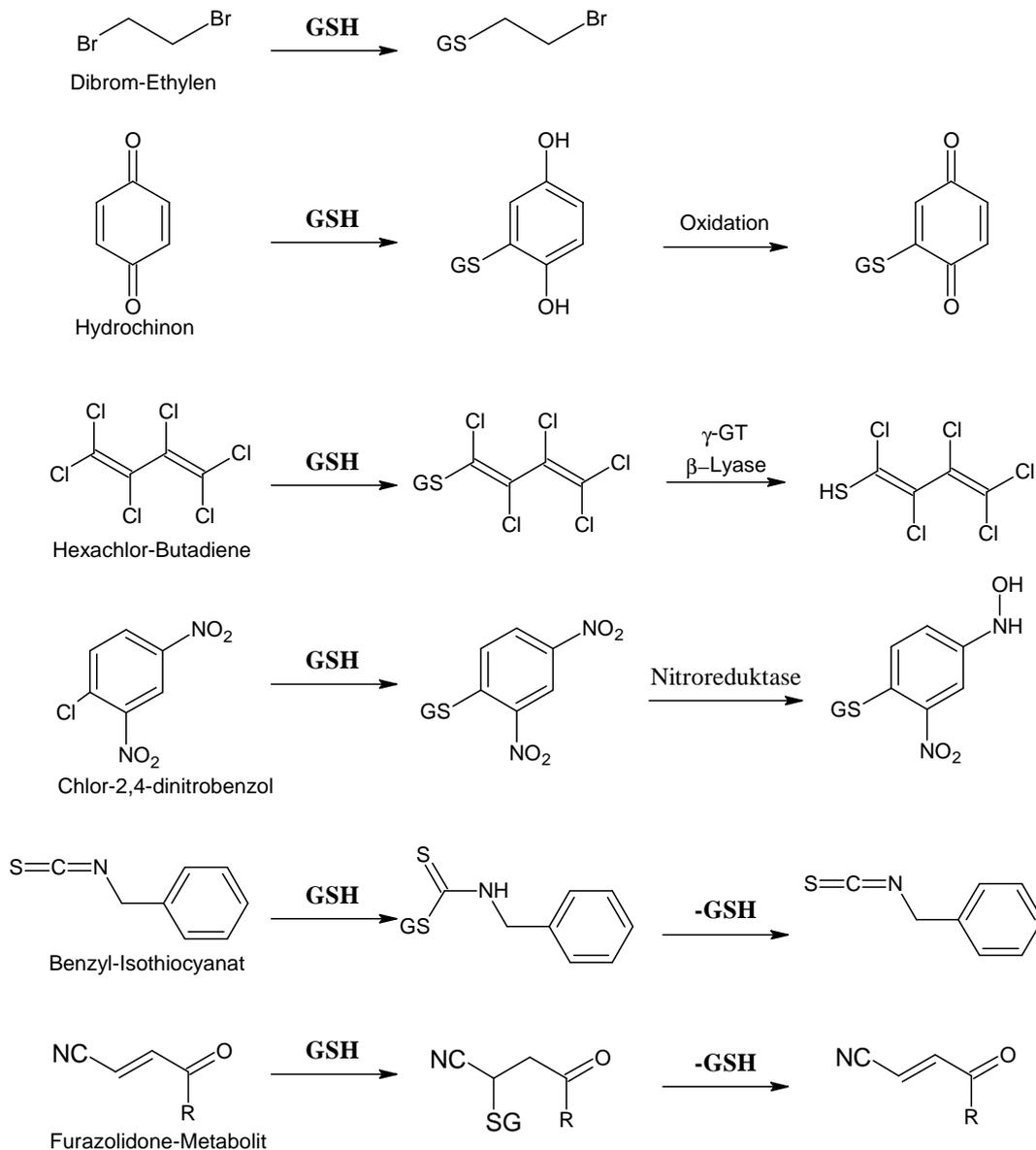


Abb. 12: Wege der reaktiven Aktivierung durch Glutathion
(van Bladeren, 2000)

Ein ganz anderer Weg findet sich z.B. bei der Aktivierung von Acetaminophen und Propachlor. Hier wird mit der Adduktion der GSH zunächst eine gesteigerte Wasserlöslichkeit erreicht. Die so entstandenen Glutathion-Konjugate werden dann ins Gallensekret abgegeben. Die im Gallenepithel vorkommenden Enzyme γ -Glutamyl-Transpeptidase und Aminopeptidase wandeln sie zu Cystein-Konjugaten um. Nach einer weiteren Umformung des Thioethers zu einem Thiol, unter Katalyse der β -Lyase, sind diese Produkte wiederum deutlich lipophiler und können so im Dünndarm wieder resorbiert werden. Als ein klassisches Beispiel für den Enterohepatischen Kreislauf, werden sie über die Pfortader zurück zur Leber

transportiert. Dort besteht dann die Möglichkeit der Methylierung der Thiolgruppe durch die S-Methyltransferase. Dieser Weg dürfte für das Auftauchen einiger ungewöhnlicher, schwefel-enhaltender Verbindungen im Urin verantwortlich sein, die nach Gabe von an sich schwefelfreien Xenobiotika dort zu finden waren (Tateishi *et al.*, 1978; Rafter *et al.*, 1983; Bessems and Vermeulen, 2001).

Eine weitere Möglichkeit der Bioaktivierung ist der temporäre Einfluss von Glutathion. Bei Isocyanaten ist bekannt, dass sie gut mit Glutathion reagieren. Die gebildeten Thioester können allerdings unter physiologischen Bedingungen wieder spontan die Isocyanate freisetzen. Somit steigert die Glutathion-Konjugation die Verteilung des Substrats im Organismus und es lassen sich seine adversen Effekte in zahllosen Organsystemen erklären (Slatter *et al.*, 1991).

7 Problemstellung

Furan wirkt nachgewiesenermaßen kanzerogen in Ratten. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt.

Ziel des EU-Projektes FURAN-RA war es daher, die vom Furan ausgehenden Vorgänge im Körper genauer aufzuklären. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die wirkenden Konzentrationen gelegt, um eine Aussage über Risiken der Furanbelastung für den Menschen treffen zu können. Die Differenz zwischen angenommener Aufnahme und nachgewiesener kanzerogener Wirkung in Ratten scheinen recht gering zu sein. Dieses Projekt sollte eine bessere Abschätzung der Dosisabhängigkeit und Wirkungsweise des Furans und seiner Metaboliten gerade in diesem Bereich ermöglichen.

In dieser Arbeit sollte dazu die Auswirkung von Furan auf die Leberstruktur beurteilt werden. Behandelte Ratten sollten histologisch betrachtet und eine Relation der Läsionen zur Dosis von 0-2 mg/kg KG aufgezeigt werden. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei den strukturellen Veränderungen entlang der Gefäße und proliferierendem Gewebe in der Leber, um Wirkungsmechanismen ableiten zu können. Dies sollte über histologische und immunohistologische Färbungen von Leberschnitten Furan-dosierter Ratten erfolgen.

In einem zweiten Projektteil sollte die zytotoxische Wirkung von Furan und seinen Metaboliten auf unterschiedliche Leberzellen bestimmt werden. Vorgesehen war der Test einer Konzentrationsreihe an unterschiedlichen Zellsystemen, um einen Zusammenhang zwischen Furan und gesteigerter Proliferation herstellen zu können. Die Bestimmung sollte mittels bekannter zytotoxischer Tests an Hepatomzellen und Hepatozyten erfolgen.

8 Material

Hier sind sämtliche Apparaturen und verwendeten Chemikalien aufgelistet, die für die Ermittlung der Daten herangezogen wurden. Einzelne Kits und Sonderchemikalien, die genauerer Erklärung bedurften sind mit Herkunftsangabe im Text zu finden.

8.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav 500	H+P Labortechnik; Oberschleißheim, D
Autosampler	AS-2057	Jasco; Groß-Umstadt, D
Autosampler	Autosampler 200	Perkin Elmer; Waltham, US
Biofreezer	MDF-U6086S	Sanyo; München, D
Brutschrank	B 5060 E CO2	Heraeus; Hanau, D
Brutschrank	Köttermann 2737	Köttermann GmbH; Uetze/Hänigsen, D
Brutschrank	BB6220	Heraeus; Hanau, D
Brutschrank	Stericult Inkubator	Thermo Fisher Scientific; Waltham, US
Diodenarray-Detektor	785A	Perkin Elmer; Waltham, US
Entgaser	DG-2080-53	Jasco; Groß-Umstadt, D
Handdispenser	Multipette	Eppendorf; Hamburg, D
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf; Hamburg, D
Homogenisator	RZ R2100	Heidolph Elektro GmbH; Kelheim, D
HPLC-Pumpe	PU-2080	Jasco; Groß-Umstadt, D
HPLC-Pumpe	200	Perkin Elmer; Waltham, US
HPLC-Säule	006-4435-E0 C18	Phenomenex ; Torrance, US
HPLC-Software	Analyst 1.4.2	Jasco; Groß-Umstadt, D
HPLC-Steuerung	LC-Net II/ADC	Jasco; Groß-Umstadt, D
Kühlplatte	COP 30	Medite; Burgdorf, D
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Elektro GmbH; Kelheim, D
Massenspektrometer	API 3200	Applied Biosystems; Darmstadt, D
Massenspektrometer	API 2000	Perkin Elmer; Waltham, US

Mehrkanalpipette	Multipette	Eppendorf; Hamburg, D
Mehrkanalpipette	Biopette	Labnet; Woodbridge, US
Mikroskop	Leica DM IRB	Leica; Wetzlar, D
Mikroskop	Axioskop	Zeiss; Oberkochen, D
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss; Oberkochen, D
Mikrowelle	NN - E235 MB	Panasonic; Hamburg, D
Nanodrop	ND-7000	Thermo Fisher Scientific; Waltham, US
NMR	AMX-400	Bruker; Rheinstetten, D
Ölpumpe	RD8	Vacuubrand GmbH; Wertheim, D
Perfusionspumpe	BVP	Ismatec; Glattbrugg, CH
pH-Meter	pH210	Hanna Instruments; Ann Arbor, US
pH-Meter	CyberScan pH 510	Thermo Fisher Scientific; Waltham, US
Photometer	Uvikon Spectrophotometer 930	Kontron; München, D
pHPLC-Detektor	1200 G1314B	Agilent Technologies; Santa Clara, US
pHPLC-Fraktionensammler	1200 G1364B	Agilent Technologies; Santa Clara, US
pHPLC-Pumpe	1200 G1362A	Agilent Technologies; Santa Clara, US
pHPLC-Säule	Reposil 100 C18, 5µm, 250 x 20 mm	Dr. Maisch GmbH; Ammerbuch-Entringen, D
Pipette	Eppendorf Research	Eppendorf; Hamburg, D
Pipette	Pipetman	Gilson Inc.; Middleton, US
Pipettierhilfe	Pipettus	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt, D
Plattenreader	Fluoroskan Ascent FL	Thermo Fisher Scientific; Waltham, US
Plattenreader	Model 450	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, D
Rotationsmikrotom	RM2125RT	Leica; Wetzlar, D
Schlittenmikrotom	HN 40	Jung; Heidelberg, D
Sterilbank	UVF 6 125	BDK; Sonnenbühl-Genkingen, D
Sterilbank	Laminar Flow BSB 4A	Gelaire; Sydney, AU
Sterilbank		STEAG Laminarflow-Prozeßtechnik GmbH; Pliezhausen, D

Streckbad	HI 1210	Leica; Wetzlar, D
Trockenschrank	UNB 200	Memmert; Schwabach, D
Ultrazentrifuge	Optima TL	Beckman; München, D
Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery 90 SE	Thermo Fisher Scientific; Waltham, US
Vakuumpkontrolle	VAP5	Vacuubrand GmbH; Wertheim, D
Vortexer	Agitateur Top-Mix 11118	BioBlock Scientific; Schwerte, D
Waage	BP 210 S	Sartorius; Goettingen, D
Waage	BP 410 S	Sartorius; Goettingen, D
Waage	OHAUS Precesion Standard	Ohaus; Parsippany, D
Waage	CP64-OCE	Sartorius; Goettingen, D
Wärmeblock	Accu Block Digital Dry Bath	Labnet; Woodbridge, US
Wasserbad	GFL	Fischer/ Merck; Frankfurt, D
Wasserbad	Julabo 13	Julabo; Seelbach, D
Wasserbad	E100	Lauda Dr. Wobser GmbH; Lauda- Königshofen, D
Zählkammer	Neubauer	Paul Marienfeld GmbH; Königshofen, D
Zentrifuge	JA-14	Beckman; München, D
Zentrifuge	JA-2550	Beckman; München, D
Zentrifuge	GS-6R	Beckman; München, D

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Autosamplervials 1,5 ml	Agilent Technologies; Santa Clara, US
Falcons	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D
Filterpapier	Carl Roth; Karlsruhe, D
Messpipetten	Schott; Mainz, D
Mikrozentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D
Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D
6-Well-Platten	Greiner Bio-One; Frickenhausen, D
96-Well-Platten	Greiner Bio-One; Frickenhausen, D
Einmalspritzen	Terumo; Somerset, US
Falcons 15 und 50 mL	Greiner Bio-One; Frickenhausen, D
HPLC-Vials	Buddeberg; Mannheim, D
Inserts für Vials	Wagner & Munz; München, D
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One; Frickenhausen, D
Membranfilter PVDF	Carl Roth; Karlsruhe, D
Nanosep 3K omega	Pall; Port Washington, US
Petrischalen	Greiner Bio-One; Frickenhausen, D
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One; Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One; Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One; Frickenhausen, D

8.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Ort
Aceton	BASF	Ludwigshafen, D
Aceton reinst	Merck	Darmstadt, D
Acetonitril reinst	Thermo Fisher Scientific	Geel, D
Acrylamid	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Allylalkohol	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Ameisensäure	Carl Roth	Karlsruhe, D

Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck	Darmstadt, D
Blei(IV)-Acetat	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Collagenase 100 CDU/ml	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Deuteriumoxid	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Diethylether	Merck	Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	Darmstadt, D
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck	Darmstadt, D
Dimethylformamid (DMF)	Merck	Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
DMEM low glucose (1g/l) mit L- Glutamin	PAA Laboratories	Cölbe, D
DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin	PAA Laboratories	Cölbe, D
Eosin	Carl Roth	Karlsruhe, D
Essigsäure	Carl Roth	Karlsruhe, D
Essigsäureanhydrid	Merck	Darmstadt, D
Ethanol	BASF	Ludwigshafen, D
Ethanol reinst	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories	Cölbe, D
Furan	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Glucose	Merck	Darmstadt, D
Glycin	Carl Roth	Karlsruhe, D
Goat-anti-rabbit-HRP	Santa Cruz Biotech	Heidelberg, D
Hematoxylin	Carl Roth	Karlsruhe, D
Heparin 1000U/ml	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
HEPES	Carl Roth	Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, D
Kaliumphosphat (K ₃ PO ₄ *7H ₂ O)	Carl Roth	Karlsruhe, D
L-Lysin	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	Merck	Darmstadt, D

Methanol	BASF	Ludwigshafen, D
Methanol reinst	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Natriumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Carl Roth	Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)	Merck	Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem	Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck	Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	Darmstadt, D
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat (NADPH)	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Penicillin	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories	Cölbe, D
Pentobarbital	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Resazurin	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Roticlear (Xylolersatz)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Saccharose	AppliChem	Darmstadt, D
Saponin	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Saponin	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
SDS	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Trypsin	PAA Laboratories	Cölbe, D
Wasser reinst (H ₂ O bidest.)	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Xylol	Merck	Darmstadt, D
Zitronensäure	Carl Roth	Karlsruhe, D
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth	Karlsruhe, D

8.3 Lösungen

Perfusionslösung 1

NaCl	0.10 mM	31.50 g
KCl	4.00 mM	1.00 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1.00 mM	1.35 g
KH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.00 mM	0.75 g
NaHCO ₃	20.00 mM	9.05 g
HEPES	15.00 mM	17.90 g
Glucose	8.00 mM	7.50 g
EGTA	0.10 mM	0.19 g
H ₂ O bidest.		5.00 l

Bemerkung: Lagerung bei 4°C
Sterilfiltration
Sterilkontrolle
pH 7,4

HEPES-Stammlösung

HEPES	1.00 M	23.83 g
bidest. H ₂ O		100.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei RT
pH 7,4
Sterilfiltration

Perfusionslösung 2

HEPES (Stammlsg.)	10.00 mM	5.00 ml
DMEM/Ham's F12	1:1	500.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei 4°C
Sterilkontrolle

Collagenaselösung

Collagenase	100.00 CDU/ml	Einwaage je nach Charge
Perfusionslösung		200.00 ml

Bemerkung: keine Lagerung

Waschpuffer

FKS		100.00 ml
HEPES (Stammlsg.)	10.00 mM	5.00 ml
Penicillin	100.00 U	5.00 ml
Streptomycin	0.10 mg/l	
DMEM/Ham's F12	1:1	500.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei RT
Sterilkontrolle

0.9%-NaCl-Lösung

NaCl	0.90%	31.50 g
H ₂ O bidest.		1.00 l

Bemerkung: Lagerung bei 4°C
Sterilisation

Heparin-Lösung

Heparin	1000.00 U/ml	Einwaage je nach Charge
0.9%-NaCl		10.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei 4°C
Sterilfiltration

Pentobarbitallösung

Pentobarbital		33.00 mg
bidest. H ₂ O		1.00 ml

Bemerkung: keine Lagerung

Zellkulturmedium

FKS		50.00 ml
Penicillin/Streptomycin		5.00 ml
DMEM low glucose		500.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei 4°C

Inkubationsmedium

DMEM low glucose		500.00 ml
------------------	--	-----------

Bemerkung: Lagerung bei 4°C

SDS-Lösung

SDS	0.50 M	144.00 mg
bidest. H ₂ O		10.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei RT

Resazurin-Stammlösung

Resazurin	440.00 mM	110.50 mg
Dimethylformamid		1.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei 4°C
max. 7 Tage
lichtempfindlich

NaCl/Pi-Puffer

KH ₂ PO ₄	1.00 mM	144.00 mg
NaCl	154.00 mM	9.00 g
Na ₂ HPO ₄	3.70 mM	528.00 mg
bidest. H ₂ O		1000.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei 4°C
pH 7,2

Resazurin-NaCl/Pi-Lösung

Resazurin-Stammlsg.	440.00 µM	1.00 ml
NaCl/Pi-Puffer		999.00 ml

Bemerkung: Lagerung bei 4°C
max. 4 Wochen
lichtempfindlich

Resazurin-Arbeitslösung

Resazurin-NaCl/Pi-Lösung		0.05 ml
DMEM low glucose	100%	ml

Bemerkung: keine Lagerung
lichtempfindlich

PBS--

NaCl	137.00 mM	8.00 g
KCl	2.70 mM	0.20 g
NaH ₂ PO ₄	10.00 mM	1.78 g
KH ₂ PO ₄	2.00 mM	0.27 g
bidest. H ₂ O		1.00 l

Bemerkung: Lagerung bei RT
Sterilisation
pH 7,4

Zitronensäure-Lösung

Zitronensäure	100.00 mM	21.01 g
bidest. H ₂ O		1.00 l

Bemerkung: Lagerung bei 4°C

Natriumcitrat-Lösung

Natriumcitrat	100.00 mM	29.41 g
bidest. H ₂ O		1.00 l

Bemerkung: Lagerung bei 4°C

Citratpuffer

Zitronensäure-Lsg	1.80 mM	9.00 ml
Natriumcitrat-Lsg	8.20 mM	41.00 ml
bidest. H ₂ O		450.00 ml

Bemerkung: keine Lagerung
pH 6,0

Kaliumphosphat-Puffer

K ₃ PO ₄	0.10 M	21.23 g
bidest. H ₂ O		1.00 l

Bemerkung: Lagerung bei RT
pH 7,4

9 Methoden

Die Versuchsdurchführungen erfolgten einerseits nach bekannten Vorgehensweisen, die im Arbeitskreis bereits erprobt und validiert wurden, andererseits sind neue Vorgehensweisen erstellt worden, die soweit angegeben, auf in der Literatur bekannten Methoden aufbauen. In diesem Fall wird eine kurze Beschreibung der veröffentlichten Schritte gegeben, überwiegend aber auf die Abweichungen und eigenen Abänderungen eingegangen.

9.1 Histologie

Die histologischen Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes in Kooperation mit der Universität Würzburg durchgeführt. Der Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. Dekant führte die Tierstudie inklusive Tierhaltung und Behandlung in ihren Versuchstierlaboren entsprechend der OECD-Guideline 407 durch (OECD, 1995). Die Probennahmen wurde anschließend in Gemeinschaft durchgeführt. Diese Studie wurde bewusst als Folgestudie zu Technical Report Series No. 402 ausgelegt, um damit eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen und so die Aussagekraft der Ergebnisse zu steigern (NTP, 1993).

9.1.1 Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden männliche Fischer F344/N von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH bestellt. Den Tieren wurde eine Eingewöhnungsphase von 14 Tagen vor der ersten Behandlung gewährt.

Während der gesamten Studie wurden die Tiere unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Die Makrolonkäfige Typ-4 waren mit 3 oder 5 Tieren besetzt und mit Standard-Holzspänen ausgelegt. Die Außenbedingungen wurden konstant bei einer Atmosphäre von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ Lufttemperatur, 30-70% Luftfeuchte und einem 12-15 fachen Luftaustausch pro Stunde gehalten.

Die Tiere hatten zum Lieferzeitpunkt ein Alter von 5-7 Wochen und wurden zum Studienstart mit 7-9 Wochen und anschließend regelmäßig zweimal pro Woche gewogen. Sie hatten während des gesamten Zeitraums der Studie freien Zugang zu den verabreichten Standardfutterpellets der Firma SSNIF Spezialdiäten GmbH, sowie zu autoklaviertem Leitungswasser. Lediglich 24 Stunden vor der

Probennahme wurden die Tiere in Stoffwechselkäfige gesetzt, in denen sie nüchtern gehalten wurden.

9.1.2 Behandlung

Für die histologischen Untersuchungen wurden Leberproben von 50 männlichen Ratten genommen. Diese unterteilten sich in drei Zeitgruppen, die wiederum in 2 bzw. 4 Dosisgruppen aufgeteilt waren. Probennahmen fanden nach einer und vier Behandlungswochen statt. Die Dosierungen von 0,1 mg, 0,5 mg und 2 mg/kg KG wurden an fünf Tagen pro Woche durchgeführt. Dazu löste man Furan in entsprechender Menge in Maisöl, das man den Ratten über Schlundsonden verabreichte. Die Verdünnungen wurden jeweils täglich neu erstellt und dem Körpergewicht der Ratte entsprechend verabreicht. Zusätzlich wurde jeweils eine entsprechende Kontrollgruppe mitgeführt, die die gleiche Behandlung, lediglich ohne Furangehalt im Öl, durchliefen. Zehn Tiere, eine Hochdosisgruppe mit Kontrolle, verblieben im Anschluss an die Behandlung weitere zwei Wochen in den Käfigen (Recovery Group), um die Erholung nach der Dosierung beobachten zu können.

Tab. 4: Einteilung der Ratten in die verschiedenen Dosisgruppen

		Furan Dosis [mg/kg KG]			
		0.0	0.1	0.5	2.0
1 Woche Behandlung	[n=5]	1-5	11-15	21-25	31-35
4 Wochen Behandlung	[n=5]	41-45	51-55	61-65	71-75
4 Wochen Behandlung + 2 Wochen Erholung	[n=5]	81-85			91-95

9.1.3 Probennahme

Nachdem die Ratten 24 Stunden in den Stoffwechselkäfigen verbracht hatten wurden sie mit Isofluran betäubt. Anschließend wurden sie durch intrakardiale Blutentnahme getötet und die Organe für die Untersuchungen der Projektteilnehmer herauspräpariert. Dabei wurden sämtliche makroskopisch erkennbaren Veränderungen des Gewebes notiert und die Organe vor der weiteren Behandlung gewogen. Die für die histologischen Untersuchungen wichtige Leber wurde direkt in die fünf einzelnen Leberlappen zerlegt. Diese wurden wiederum derart aufgeteilt, dass für jeden Versuch die optimale Probenmenge und Probenbeschaffenheit erzielt wurde.

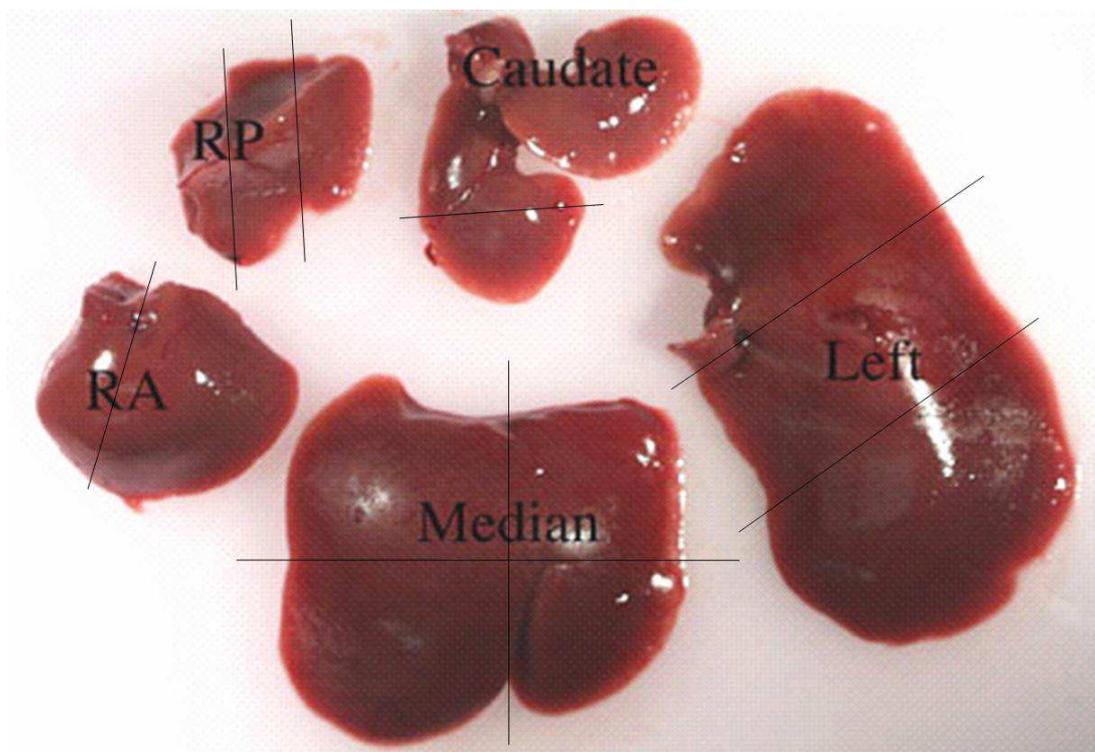


Abb. 13: Aufteilung der Leberlappen in die einzelnen Probenschnitte

Für die histologischen Schnitte wurde darauf geachtet, dass möglichst von jedem Leberlappen ein vollständiger Querschnitt erhalten bleibt, um alle funktionellen Bereiche, wie Pfortadern, Arterien, Venen, zentrale Hepatozyten und Randzonen einzubeziehen. Daraus ergab sich das in Abbildung 13 dargestellte Schema. Demnach wurden jeweils zwei Proben aus dem mittleren und linken Leberlappen

entnommen, sowie jeweils eine Probe aus caudalem, vorderem und hinterem rechten Leberlappen.

Von jedem Leberlappen wurde eine Probe in Einbettkassetten direkt in 4-prozentige Formalinlösung gelegt. Die zusätzlichen Abschnitte des linken und mittleren Leberlappens wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und als Reserve für weitere Untersuchungen im Kühlschrank bei -80°C gelagert.

Die in Formalin fixierten Gewebeteile verblieben darin bis zur weiteren Aufarbeitung der Proben.

9.1.4 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung für die histologischen Untersuchungen gliederte sich in drei Schritte, wobei zunächst die Gewebeproben vom Wasser befreit wurden. Dieses wurde über eine Konzentrationsreihe durch Paraffin ersetzt und in Paraffinblöcke eingebettet. Im zweiten Schritt konnten diese dann geschnitten werden und die Gewebeschnitte auf Objektträger aufgezogen werden. Im letzten Schritt wurden sie dann auf den Objektträgern in die für die Färbung benötigten Bäder getaucht.

9.1.4.1 Entwässerung

Die Proben verblieben nach der Probennahme zur vollständigen Fixierung mindestens drei Tage in der Formalinlösung, bevor sie weiter bearbeitet wurden. Zunächst entfernte man Formalinreste durch Spülen der Einbettkassetten mit Leitungswasser, wobei auf ständigen Wasseraustausch während der 10-minütigen Prozedur geachtet wurde.

Anschließend wurden die Proben für mindestens vier Stunden, meist aber über Nacht in 70-prozentigem Isopropanol gelagert. Nachdem die Kassetten durch leichtes Klopfen gründlich von Lösungsmittelresten befreit waren konnte sie in die nächste Stufe überführt werden. In dieser verblieben sie zweimal für jeweils 45 Minuten in 96-prozentigen Isopropanollösungen. Im nächsten Schritt folgten zwei 100-prozentige Isopropanollösungen wiederum für je 45 Minuten. Für einen besseren Austausch gegen Xylol, das in der anschließenden Stufe folgte, wurde eine zusätzliche Stufe mit zweimaligem Verbleib in reinem Ethanol eingefügt. In diesen Lösungen wie auch im Folgenden, reinen Xylol waren die Kassetten auch jeweils 45 Minuten. Diese Zeit wurde auch für die letzte Stufe verwendet, in der

sich die Proben in reinem, 60°C warmem Paraffin befanden. Nach Austausch der Paraffinlösung konnten die Proben bei 60°C über Nacht gelagert werden. Am folgenden Tag konnten die Gewebeproben in einzelne Paraffinblöcke eingegossen werden und für unbestimmte Zeit gelagert werden.

Bis auf die letzte Stufe hatten alle Lösungen Raumtemperatur. Um die Konzentration weitestgehend zu wahren wurden sie regelmäßig nach 40-50 Kassetten im rotierenden Verfahren erneuert, d.h. die jeweils erste Lösung einer Stufe wurde verworfen und durch die Zweite ersetzt. Für die letzte Lösung der Stufe kam dann eine Frische zum Einsatz.

Tab. 5: Ein Überblick über die Schritte während der Entwässerung

Stufe	Zeit [min]	Lösungsmittel	Konz. [%]
1	10	Leitungswasser	100
2	ü.N.	Isopropanol	70
3	45	Isopropanol	96
	45	Isopropanol	96
4	45	Isopropanol	100
	45	Isopropanol	100
5	45	Ethanol	100
	45	Ethanol	100
6	45	Xylol	100
	45	Xylol	100
7	45	Paraffin	100
	ü.N.	Paraffin	100

9.1.4.2 Gewebeschnitte

Um die Schnitte später auf dem bereits beschrifteten Objektträger fixieren zu können, wurde das Glas mit Eiweißglycin benetzt und über Nacht getrocknet. Die über Nacht im Paraffin gehaltenen Proben wurden in Wachsblockformen positioniert, diese anschließend mit flüssigem Paraffin aufgefüllt und der beschriftete Käfig als spätere Halterung darin eingebettet. Die Form stand dabei ständig auf einer Kühlplatte bei ca. -15°C. Sobald der Wachs vollständig

ausgehärtet war konnten die Probenblöcke aus den Formen herausgelöst werden und überschüssiges Paraffin mit einem Messer vorsichtig entfernt werden. Die fertigen Blöcke wurden in Probenkästen einsortiert und in dieser Form bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Im weiteren Verlauf wurden sie dann auf einer Kühlplatte auf -13°C gebracht und anschließend am Rotationsmikrotom 2-5 μm dicke Schnitte erzeugt. Diese wurden direkt ins Streckbad überführt. In dem 45°C warmen Wasser verweilten sie bis das Wachs um das Gewebe vollständig glatt auf der Wasseroberfläche schwimmt. Auf den zuvor beschrifteten Objektträger wurden 2-3 Schnitte aus dem Wasser aufgezogen und waagrecht auf einer Trockenbank bei ca. 70°C getrocknet. Aufrecht im Heizschrank konnten bei einer Temperatur von 60°C die überschüssigen Wachsmengen abfließen.

9.1.4.3 Färbung

Die Färbungen finden im Allgemeinen im wässrigen Milieu statt, dafür mussten die Gewebe zunächst wieder aufnahmefähig gemacht werden. Dies geschah wiederum über eine mehrstufige Konzentrationsreihe, die mit 100-prozentigem Roticlear, einem Xylolersatzstoff, begann. Dieser wurde in diesem Fall bevorzugt, da er aufgrund seiner Verdunstungseigenschaften und geringeren Toxizität angenehmer im Umgang war. In den drei Roticlearbädern verblieben die Proben für jeweils 5-6 Minuten. Anschließend folgten drei Stufen mit reinem, 96-prozentigem und 70-prozentigem Isopropanol.

Tab. 6: Reihenfolge der Stufen während der Färbepreparation

Stufe	Zeit [min]	Lösungsmittel	Konz. [%]
1	5-6	Xylolersatz	100
	5-6	Xylolersatz	100
	5-6	Xylolersatz	100
2	1-2	Isopropanol	100
	1-2	Isopropanol	100
3	1-2	Isopropanol	96
4	1-2	Isopropanol	70
5	1- ∞	H ₂ O _{dest} bzw. PBS	100

Die erste Stufe bestand aus zwei, die letzten beiden Stufen aus nur einer Station. In jeder dieser Schritte verblieben die Proben für 1-2 Minuten, bevor sie ins Wasserbad oder, bei der Antikörperfärbung, in eine PBS-Lösung kamen. Im destillierten Wasser konnten die Proben verweilen, bis sie der jeweiligen Färbung unterzogen wurden.

9.1.4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Färbung färbt den Zellkern, während die Eosin-Färbung das Cytosol der Zellen anfärbt. Die Kombination dieser beiden Färbungen ermöglicht es Gewebsveränderungen von der einzelnen Zelle bis hin zum gesamten Organ sichtbar zu machen. Für diese Standardfärbung in der Histologie wurden die Objektträger mit der Probe zunächst für 6-10 Minuten in die fertige Hämatoxylinlösung gestellt. Die Dauer richtete sich nach der Färbeleistung der Lösung und den Gewebeeigenschaften. Erstere hing mit dem Alter der Lösung und ihrer anfänglichen Konzentration zusammen. Der Farbstoff ist unter Luftausschluß stabil und kann daher mehrmals verwendet werden. Da es sich bei den Geweben ausschließlich um Leberproben handelte konnte die Zeit generell recht kurz gehalten werden. Dieses Probenmaterial ist leicht zu durchdringen, weil es mit vielen Gefäßlumen durchzogen ist.

Überschüssige, oberflächliche Färbestoffe wurden anschließend in essigsauerm Wasser kurz abgespült und die Objektträger anschließend für mindestens 5 Minuten unter fließendes Leitungswasser gehalten. Durch die basischen Bedingungen wird der Farbstoff im Gewebe ausgefällt. Während dessen konnten einzelne Stichproben unter dem Mikroskop auf ihre Färbung untersucht werden. Besonders wichtig war die Gleichmäßigkeit und Intensität der Anfärbung, wovon abhing, ob mit der Eosinfärbung fortgefahren wurde, oder aber die bisherige Färbung intensiviert oder abgeschwächt wurde. Das hieß die Stationen 1-3 bzw. 2 und 3 mit angepassten Zeiten zu wiederholen.

War diese Färbung erwartungsgemäß konnte mit der Eosinfärbung fortgefahren werden. Die Eosinlösung wurde bei jedem Färbedruchgang neu angesetzt, indem sie mit 0,1% Essigsäure versetzt wurde. Die eigentliche Färbung erfolgte in dieser Lösung für 5-15 Minuten gefolgt von einem kurzen Spülschritt in destilliertem Wasser. Jeweils eine Minute verblieben die Proben in 70- bzw. 96-prozentigem Isopropanol. Auch hier bestand die Möglichkeit einer optischen Kontrolle der

Färbung, um ein optimales Ergebnis zu gewährleisten. Anschließend verweilen die Proben für eine weitere Minute in reinem Isopropanol, sowie mindestens zwei Minuten in reinem Ethanol. Zum endgültigen Eindecken der Objektträger mit dem entsprechenden Deckglas fehlten noch drei Stationen in reinem Xylolersatz. Darin blieben sie für jeweils mindestens fünf Minuten. Aus der letzten Lösung wurden sie erst zum direkten Abdecken mit Histokit und dem Deckgläschen genommen.

Tab. 7: Die Stufen während der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Stufe	Zeit [min]	Lösungsmittel	Konz. [%]
1	6-10	Hämatoxylin	100
2	Kurz	H ₂ O _{dest} (0,1% Essigsre)	100
3	5-10 (∞)	Leitungswasser	100
4	Kurz	H ₂ O _{dest}	100
5	5-15	Eosin (0,1% Essigsre)	100
6	Kurz	H ₂ O _{dest}	100
7	1	Isopropanol	70
8	1	Isopropanol	96
9	1	Isopropanol	100
10	2	Ethanol	100
11	5-6	Xylolersatz	100
	5-6	Xylolersatz	100
	5-∞	Xylolersatz	100

9.1.4.3.2 Färbung des Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Die PCNA-Färbung hat sich als ein guter und sicherer Marker für gesteigerte Proliferation in Geweben herausgestellt. Ein besonderer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die Färbung auch aus bereits fixierten und ausgeblockten Proben, selbst nach längerer Lagerung durchzuführen. (Greenwell *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2003; Banlunara *et al.*, 2005)

Das einzige Problem dabei besteht darin, die während des Paraffinierens blockierten Antigene wieder zurück zu gewinnen. Dazu wurde eine hitzeaktivierende Methode nach Dietrich angewendet. (Dietrich *et al.*, 1994)

Die zur Färbung vorbereiteten Objektträger wurden bei dieser Färbung direkt aus dem PBS-Bad genommen und in den Citratpuffer gestellt. In der Mikrowelle wurde dieser dann bis zum Sieden erhitzt und für 3 Minuten so gehalten. Nach einer kurzen Abkühlung wurde der Anteil des verdampften Citratpuffers wieder aufgefüllt und die 3-minütige Siedephase wiederholt. In der Lösung durften die Proben dann langsam wieder auf Raumtemperatur abkühlen. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit PBS-Lösung.

Um eine vollständige Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu erreichen, wurde eine weitere Stufe mit 4N Salzsäure durchgeführt. Darin verweilten die Proben für 20 Minuten und wurden anschließend 2-mal für je 5 Minuten in PBS neutralisiert. In Stufe 3 wird mit einer 3% H₂O₂-Lösung die Aktivität der endogenen Peroxidase abgefangen. Auch hier wurde diesmal mit 3 x 5 Minuten PBS gewaschen.

Um eine möglichst spezifische Bindung des Primär-Antikörpers zu erreichen enthält das verwendete mouse ABC-Staining System (Santa Cruz Biotechnology sc-2017) eine mehrkomponentige Blockierlösung, die nach Anleitung hergestellt wurde. Diese muss eine Stunde bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C, Zeit zum reagieren haben und kann dann anschließend einfach mit PBS abgespült werden. Nach dieser Vorbereitung kann dann der monoklonale Maus-Antikörper für die PCNA-Antigene PC10 (Santa Cruz Biotechnology sc-56) aufgebracht werden. Bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:100 in PBS betrug die Verweildauer auf dem Präparat 60 Minuten. Zum gründlichen Entfernen der ungebundenen Antikörper wurde hiernach 3-mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die gleiche Waschung erfolgte nach dem sekundären Antikörper. Dieser ist ein im Kit enthaltener biotinylierter Maus-Antikörper, der für 40 Minuten auf den Objektträgern verblieb. Nach Anleitung folgte dann eine Stufe mit einem zuvor frisch angesetzten Enzym-Reagenz, das für 30 Minuten einwirkte. Die drei üblichen Waschschriffe mit 3 mal 5 Minuten folgten erneut. In der letzten Stufe des Kits wird die eigentliche Färbung mit Hilfe eines Peroxidase-Substrates entwickelt. Dabei ist die Inkubationsdauer je nach der gewünschten Intensität der Färbung zu wählen. Diese Stufe konnte auch mit Spülen unter Wasser unterbrochen und anschließend wiederholt werden, um das Färbergebnis zu kontrollieren bzw. intensivieren.

Tab. 8: Die Stufen während der PCNA-Hämatoxylin-Färbung

Stufe	Zeit [min]	Lösungsm.	Konz. [%]
1	3	Citratpuffer (650 W)	100
	3	Citratpuffer (650 W)	100
	15	Citratpuffer	100
	2 x 5	PBS	100
2	20	4N HCl	100
	2 x 5	PBS	100
3	10	H ₂ O ₂	3
	3 x 5	PBS	100
4	60	Blockierlösung	1,5
	2 x kurz	PBS	100
5	60	PCNA PC10 (1:100)	
	3 x 5	PBS	100
6	40	Sekundär-Antikörper (1:10)	
	3 x 5	PBS	100
7	60	Enzym-Reagenz	
	3 x 5	PBS	100
8	1-10	Peroxidase Substrat	
	kurz	H ₂ O _{dest}	100
9	2-10*	Hämatoxylin	100
	kurz	H ₂ O _{dest} (0,1% Essigsre)	100
10	5-10 (∞)	Leitungswasser	100
	kurz	H ₂ O _{dest}	100
11	1	Ethanol	70
12	1	Ethanol	96
13	1	Ethanol	100
14	2	Ethanol	100
15	5-6	Xylolersatz	100
	5-6	Xylolersatz	100
	5-∞	Xylolersatz	100

War diese Färbung erfolgreich beendet, so wurde direkt mit der Gegenfärbung fortgefahren. Das Verfahren entsprach genau dem Vorgehen in den Stufen 1-4 der Eosin-Hämatoxylin-Färbung (s. Kap.: 9.1.4.3.1). Auch hier konnte die Intensität durch wiederholen der Stufen bzw. abspülen der Färbelösung angepasst werden. Im Anschluss folgte eine Rückführung in Xylol über eine 5-stufige Ethanolreihe mit 70-, 96- und 100-prozentigem Ethanol für jeweils eine Minute. Zuletzt einmal für wenigstens 2 Minuten und anschließend direkt in reinen Xylolersatz. Darin konnten die Proben verweilen, oder aber direkt mit Histokit und einem Deckgläschen versehen werden.

9.1.5 Probenauswertung

Vor der eigentlichen Probenauswertung wurden die Schnitte auf ihre Qualität bezüglich Färbung und Schnitteigenschaften verglichen und die besten 3 pro Objekt heraussortiert. Diese wurden anschließend in einer Tabelle erfasst und mit einer zufällig erzeugten Nummer versehen. Diese wurde über die ursprüngliche Beschriftung geklebt, so dass diese verdeckt war. Anschließend wurden sämtliche Proben nach dieser neuen Nummer sortiert. Somit war gewährleistet, dass es keine Zusammenhänge zwischen Probeneigenschaften und beobachteten Effekten gab.

Erst nach dieser Randomisierung wurden die Proben unter dem Mikroskop begutachtet und die Objektträger mit auffälligen Veränderungen in den Geweben nach der Ausprägung der Läsion sortiert.

Diese Proben wurden erneut gemischt und dann von einem zweiten Gutachter betrachtet. Nach erneuter Beurteilung wurden die ermittelten Reihenfolgen verglichen.

War diese Reihenfolge nicht identisch, so wurden die Proben teilweise einem dritten Gutachter vorgelegt, bis eine Eindeutige Reihenfolge entstand. Im letzten Schritt wurde dann die Kodierung aufgehoben und das Resultat beurteilt.

9.2 Zellkultur

Um Kontaminationen in der Zellkultur zu verhindern wurden sämtliche, die Zellen betreffenden Arbeiten, unter einer laminar-flow Sterilbank durchgeführt. Alle eingesetzten Mehrweg-Mittel wurden je nach Material entweder mit trockener oder mit feuchter Hitze autoklaviert. Alles was in den sterilen Bereich der Werkbank kam wurde zuvor mit 70-prozentigem Alkohol benetzt. Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders erwähnt, vor dem Kontakt mit den Zellen auf 37°C vorgewärmt. Im Brutschrank wurden die Zellen bei dieser Temperatur, einer CO₂-Konzentration von 5% und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

9.2.1 Permanente Zellkulturen

Die permanente Zellkultur wurde überwiegend als Verfahren zu Testzwecken und Vorversuchen eingesetzt, da sie oftmals relevante Schwächen, wie z.B. mangelnde Enzymausstattung aufweisen. Zeigten sich die Ergebnisse jedoch als plausibel und einheitlich und die Nachteile als irrelevant, so wurden sie auch für Testreihen eingesetzt.

9.2.1.1 Zelllinien

Zum Einsatz kamen ausschließlich adhärent und einschichtig (Monolayer) wachsende Hepatomzellen von Mensch und Ratte.

9.2.1.1.1 H4IIE-Rattenhepatomzellen

Die H4IIE-Zelllinie wurde von Pitot etabliert. (Pitot *et al.*, 1964) Sie sind als ein Subklon aus dem Reuber H-35 Hepatom hervorgegangen. Dieses wurde in der Wanderratte induziert (Reuber, 1961).

9.2.1.1.2 HepG2 menschliche Hepatomzellen

Die HepG2-Zelllinie wurde 1975 aus dem Leberkarzinom eines 15-jährigen Jungen aus Argentinien etabliert (Aden *et al.*, 1979; Knowles *et al.*, 1980).

9.2.1.1.3 FAO transfizierte Hepatomzellen

Rattenhepatomzellen, die CYP2E1 exprimieren (De Waziers *et al.*, 1995).

9.2.1.1.4 HepG2-E47 / -C34 transfizierte Hepatomzellen

Menschliche Hepatomzellen, die CYP2E1 überexprimieren (E47) bzw. gar nicht exprimieren (C34) (Wu and Cederbaum, 2008).

9.2.1.2 Medienwechsel und Subkultivierung

Als Zellgefäße dienten 75 cm²-Zellkulturflaschen, die maximal für jeweils drei folgende Subkultivierungen im Einsatz blieben. Diese wurde stets dann durchgeführt, wenn die Zellen einen einheitlich konfluenten Monolayer ausgebildet hatten. In diesem Fall wurde das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA überspült und dieses direkt wieder grob entfernt. Ein weiterer Milliliter Trypsin-Lösung wurde auf den Zellen verteilt und die Kulturflasche je nach Zelltypus für 5-10 Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Zeit wurde, durch leichtes seitliches Klopfen, der Ablösevorgang kontrolliert und entweder die Zeit verlängert, oder mit dem Passagieren fortgefahren. Dann wurden die Zellen in 10 ml serumhaltigem Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Pipettieren bestmöglich vereinzelt. Durch das Serum wurde auch das Trypsin inaktiviert und das EDTA von Calcium oder Magnesium komplexiert. Von der Zelllösung wurde dann im allgemeinen ein Fünftel in die neue Zellkulturflasche überführt. Nach der Zugabe von 10 ml Kulturmedium und der Beschriftung mit der aktuellen Passagenzahl wurden die Zellen in den Brutschrank gestellt. Die Verbleibende Zelllösung wurde für die Testreihen eingesetzt, nachdem die Zellzahl (s. 9.2.3.1) bestimmt war.

Am Folgetag wurde der erste Mediumswechsel zur Entfernung der nicht angehafteten Zellen durchgeführt. Das Zellmedium wurde abgesaugt und durch 15 ml neues Medium ersetzt. Dieser Vorgang wurde im Anschluss alle 2-3 Tage wiederholt, um genügend Nährstoffe für das Zellwachstum sicherzustellen.

9.2.2 Primäre Zellkultur

9.2.2.1 Bradford

Der Bradford-Test beruht auf der Bindung von Protein an das Farbpigment Coomassie Brilliant Blue G-250 und dessen Farbumschlag. Dieser kann dann

spektrometrisch erfasst werden und gibt über eine Regression den quantitativen Proteingehalt. (Bradford, 1976)

In eine erste 96-welll-Platte wurden von jeder Probe jeweils 3 µl pipettiert. Parallel wurde eine Standardreihe aus Bovine Serum Albumin (BSA) und ein Negativwert (Wasser) erstellt. In jedes Well wurden 60 µl Wasser hinzugefügt und, nach ordentlicher Durchmischung, in drei Wells auf einer zweiten Platte verteilt.

Das Bradford-Reagenz wurde 5-fach mit Wasser verdünnt und 200 µl in jedes Well hinzugefügt. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurde die Absorption bei 570 nm gemessen.

9.2.2.2 Collagenbeschichtung

Um die Haftung der primären Hepatozyten zu verbessern wurden die Petrischalen vor dem Gebrauch mit einer Collagenbeschichtung versehen.

Die Collagenlösung wurde aus tiefgekühlten (-20°C) Rattenschwänzen hergestellt, die unter sterilen Bedingungen gehäutet wurden. Die Collagenfasern wurden nach und nach aus den Schwänzen herausgezogen und über Nacht unter UV-Licht getrocknet. Nach Zerkleinern der Fasern erfolgte erneute Trocknung und am Folgetag wurden 2 g abgewogen. Die restlichen Fasern wurden bei -20°C gelagert.

Die Lösung wurde angesetzt, indem die Fasern zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann für 24 Stunden in 0,2% Essigsäure gelöst wurden. Aus dem über die Methode nach Bradford (s. 9.2.2.1) ermittelten Proteingehalt wurde zur Aufbewahrung eine sterile Stammlösung von 5 g/l Kollagen in 0,2 % Essigsäure eingestellt. (Bradford, 1976)

Mit destilliertem Wasser wurde diese dann auf 0,5 g/l verdünnt und konnte durch einfaches Umschütten auf die Platten verteilt werden. Durch Schwenken der Petrischalen wurde die Lösung gleichmäßig verteilt. Unter UV-Bestrahlung trockneten diese dann in der Sterilbank über Nacht.

9.2.2.3 Perfusion

Die primären Rattenhepatozyten wurden in einer in situ Perfusion nach einer modifizierten Methode nach Seglen gewonnen. In diesem zweistufigen Vorgang wird die Leber zunächst mit EGTA gespült und anschließend werden die

parenchymalen Leberzellen durch eine Collagenasebehandlung isoliert (Seglen, 1976).

In der Vorbereitung wurden 500 ml / 250 ml der Perfusionslösungen I und II im Wasserbad auf 42°C erwärmt.

Die männliche Wistar-Ratte von Charles River mit einem Gewicht von 150-250 g wurde intraperitoneal mit einer Dosis von 100 mg Pentobarbital je kg KG betäubt. Zur Überprüfung der Narkosewirkung diente die mechanische Reizung der Schwanzwurzel oder der Zwischenzehenreflex.

Die Ratte wurde in Rückenlage auf einer Unterlage fixiert und eine Lampe diente dem Wärmeerhalt. Nach Desinfektion des Bauches mit 70% Ethanol wurde das Abdomen bis zum Brustbein geöffnet und die Leber freigelegt. Zur Verhinderung von Blutgerinnseln wurden 100U Heparin in 0,1 ml 0,9% NaCl-Lösung direkt in die Hohlvene (vena cava inferior) injiziert. Um diese wurde anschließend eine erste Ligatur gelegt. Die Zweite erfolgte um die Pfortader (vena porta hepatica), in die dann eine Venenverweilkanüle eingeführt wurde und, mit der Ligatur fixiert, dort verblieb.

Das an eine Pumpe angeschlossene Perfusionsmedium I wurde nun mit sehr langsamem Fluss von 3,6 ml/min in diese Kanüle geleitet. Sobald sich die Leber blähte wurde die Hohlvene angeschnitten, um einen Abflussweg zu öffnen. So wurde die Leber dann für 7-10 min bei 40 ml/min durchströmt. Das EGTA löste dabei durch einen massiven Calciumentzug die Desmosomen zwischen den Leberzellen. Während dessen konnte das Zwerchfell zerschnitten und der Brustraum geöffnet werden.

Vor dem zweiten Schritt mit Kollagenase wurde eine zirkulierende Perfusion erstellt, indem die obere Hohlvene mit einer Venenverweilkanüle mit Ligatur versehen wurde. Sobald die erste Ligatur an der Hohlvene zugezogen wurde, diente die neue Kanüle als Rückfluss und konnte, kurz nach dem Wechsel auf Perfusionsmedium II, in den Pumpenkreislauf eingebaut werden. Unter Beibehalt der Flussrate wurde nun erneut für 5-10 Minuten gespült, bis eine deutliche Erweichung des Organs zu spüren war.

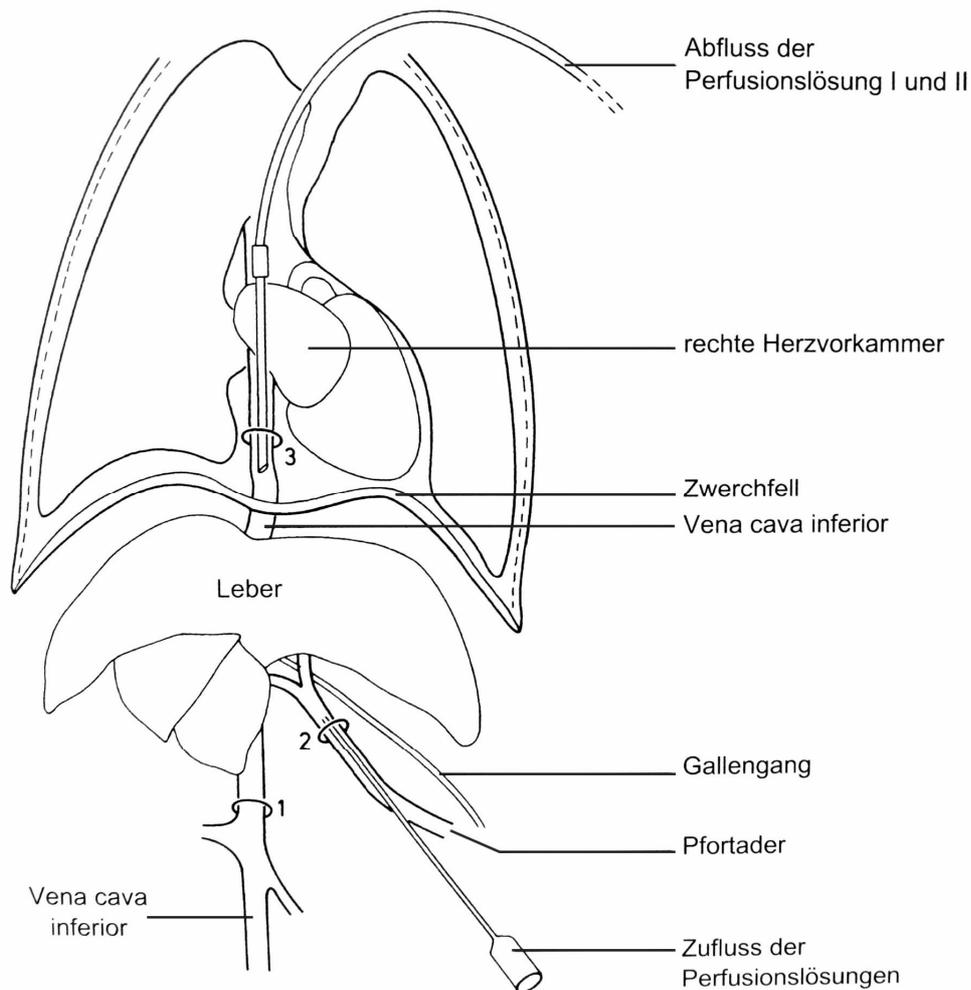


Abb. 14: Lage der Ligaturen während der Perfusion in der Ratte
(Gstraunthaler and Lindl, 2013)

Die Leber wurde herauspräpariert und unter der Sterilbank auf einem 250 μm Nylonnetz geöffnet. Die Hepatozyten wurden mit Waschpuffer in das darunter stehende Becherglas gespült und anschließend erneut durch ein feineres Sieb (100 μm) vereinzelt.

Zur Entfernung von Zelltrümmern wurden sie zweimal 2 min bei Raumtemperatur und 25 g zentrifugiert. Die Lösung wurde jeweils verworfen und durch neuen Waschpuffer ersetzt. Zuletzt in weniger Puffer (7-10 ml), um alle Zellen in ein Röhrchen zusammen zu fügen. Die daraus bestimmte Zellzahl (s. 9.2.3) diente dann als Grundlage für die Aussaat auf die kollagenierten Petrischalen.

9.2.3 Versuchsdruchführung

9.2.3.1 Zellzahlbestimmung

Die bei der Subkultivierung zurückbehaltene Zelllösung wurde jeweils für die Versuchsdruchführung verwendet. Dazu wurde die Zahl der zuvor mit Trypanblau angefärbten Zellen in einer „Neubauer Improved“ Zählkammer bestimmt. Das Anfärben hat dabei zwei Vorteile. Zunächst kann man die toten von den lebenden Zellen unterscheiden, da nur erstere den Farbstoff aufnehmen. Zusätzlich wird aber auch der Kontrast zwischen dem dann dunkleren Medium und den hellen, intakten Zellen erhöht.

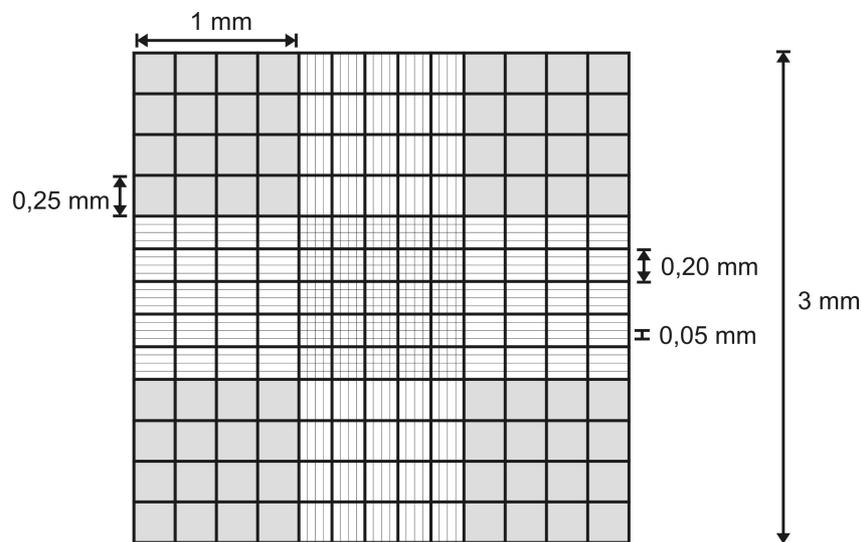


Abb. 15: Schema der Zählkammer „Neubauer Improved“

Unter dem Mikroskop wurden jedes Mal die vier Großquadrate mit einem Millimeter Kantenlänge in den Ecken der Neubauer-Kammer (graue Flächen in Abbildung 15) ausgezählt. Die kleineren Quadrate dienen dabei der Orientierung und Strukturierung während der Zählung.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zählung} \cdot 1000 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm}^3}$$

Der aus den vier Werten erhaltene Durchschnitt entsprach dann der Zählung mit der Zellzahl pro 1 mm^2 in der Kammer. Bei einer Kammertiefe von $0,1 \text{ mm}$

entspricht das einem Volumen von 1 μl . So lässt sich dann die ursprüngliche Zellzahl im Medium unter Berücksichtigung der x-fachen Verdünnung berechnen. Die Zelllinien wurden jeweils so ausgesät, dass sie nach 24 Stunden eine 70-prozentige Konfluenz erzielten. Dadurch blieb ausreichend Platz für die Ausbreitung während der anschließenden Inkubationszeit. Die Anzahl der kultivierten Zellen hing dabei vom Zellwachstum, also der Verdopplungszeit und natürlich von der Gefäßgrundfläche ab.

Tab. 9: Zellzahl pro Gefäß zur Erlangung von 70% Konfluenz nach 24 Stunden

Kulturgefäß	Wachstums-	übliches	H4IIE / FAO	HepG2 / E47 / C34
	fläche	Füllvolumen		
	[cm ²]	[ml]		
250 ml-Flasche	75,00	20	2.000.000	4.000.000
50 ml-Flasche	25,00	7	800.000	1.300.000
100 mm Petrischale	57,00	8	2.000.000	3.000.000
94 mm Petrischale	58,00	8	2.000.000	3.000.000
60 mm Petrischale	21,00	5	700.000	1.100.000
35 mm Petrischale	8,70	2	300.000	500.000
96-well	0,34	0,25	13.000	21.000
48-well	1,00	0,5	33.000	53.000
24-well	1,90	1	66.000	105000
12-well	3,90	2	130.000	210000
6-well	9,60	3	330.000	530000

Die ausgezählte Zelllösung wurde derart weiter verdünnt, dass bei üblichem Füllvolumen des Gefäßes die optimale Zellanzahl darin enthalten war. Für die verschiedenen Gefäße und Zelllinien ist dies in Tabelle 9 wiedergegeben.

9.2.3.2 Im offenen System

Die Substanz wurde zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel, zumeist in Wasser oder Dimethylsulfoxid (DMSO), in möglichst hoher, definierter Konzentration gelöst. Mit dieser Ausgangslösung wurde anschließend eine Konzentrationsreihe errechnet und die unterschiedlichen Messpunkte durch Mischung mit Wasser erstellt. Hinzu kamen noch die Positivkontrolle mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) mit 1 mM als Endkonzentration, sowie eine Negativkontrolle mit dem in den Proben verwendeten Lösungsmittel in entsprechender Konzentration. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen wurde teilweise noch eine zusätzliche Wasserkontrolle mitgeführt. Vor der Inkubation wurde das vorhandene Zellkulturmedium entfernt und durch das Inkubationsmedium ersetzt. Dabei wurde stichprobenartig eine optische Kontrolle der Petrischalen bzw. Wells durchgeführt und bei Auffälligkeiten eine Umverteilung des Probenschemas vorgenommen.

Sobald das Medium ersetzt war wurde mit einer Eppendorf Pipette langsam die vorbereiteten Proben eingebracht und direkt durch schwenken des Gefäßes verteilt. Nach Beschriften des Deckels wurden die Zellen wieder in den Brutschrank gestellt. Dort verblieben sie dann bis zur Messung.

9.2.3.3 Im geschlossenen System

Die Versuche im geschlossenen System wurden durchweg in Petrischalen mit 60 mm Durchmesser durchgeführt. Diese wurden schon während des Mediumwechsels in den Metalldeckel der Polystyrol-Mehrzweckgefäße gestellt. Die Gefäße selbst wurden mit einem Septum versehen, um die Entnahme einer Probe zu ermöglichen, ohne das Gefäß öffnen zu müssen. Dieser Gefäßteil wurde zunächst mit der Öffnung nach oben neben den Deckel gestellt. Nach kurzer Zeit im Brutschrank wurden die Gefäße geschlossen und anschließend lediglich leicht gekippt, um die Probe ins Medium zu geben. So blieb die Brutschrank-Atmosphäre in den 290 ml Volumen des Gefäßes bestmöglichst erhalten und gewährleistete gute Bedingungen für das Zellwachstum.

Bei den Proben wurden in diesem Fall darauf geachtet, die Temperaturen während des Prozesses möglichst niedrig zu halten. Dies hieß insbesondere, dass

sämtliche Lösungen und Substanzen tief gekühlt wurden und die Reaktionsgefäße in Eis gelagert, befüllt und transportiert wurden, bis sie unter die Sterilbank kamen. Direkt nachdem die Probe in der Petrischale war, wurde zur Kontrolle das Gefäß nochmals zgedreht und dann in den Brutschrank gestellt.

9.2.4 Zytotoxizität

Der Alamar Blue Test misst die enzymatische Reduzierung von Resazurin durch Zellen. Da dieser Vorgang auf intakte Zellen angewiesen ist, gibt er proportional die Vitalität der Zellen wieder. Gemessen werden kann es einerseits über den Farbumschlag, andererseits über die sich entwickelnde Fluoreszenz des Resorufins (O'Brien *et al.*, 2000).

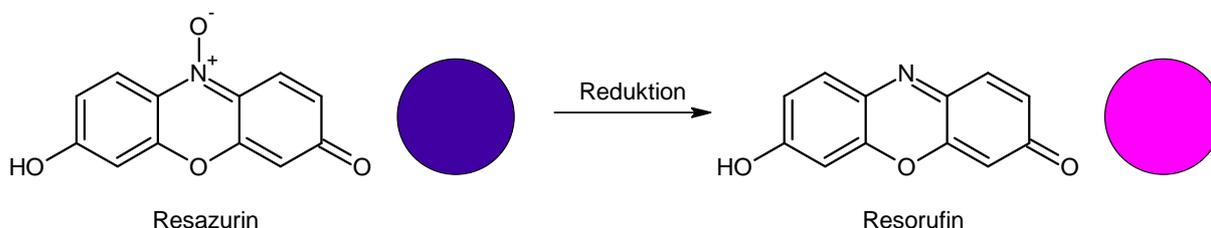


Abb. 16: Reduktion des Resazurins

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Inkubationsmedium vorsichtig abgesaugt und der Zellrasen 2-mal mit vorgewärmtem PBS gespült. Anschließend wurden die Wells bzw. Petrischalen mit dem Resazurin enthaltenden Medium mit dem üblichen Volumen nach Tabelle 9 gefüllt. Dieses wurde zuvor durch Mischen der Resazurin-Arbeitslösung mit DMEM low glucose im Verhältnis 1:10 hergestellt. Wie immer beim Umgang mit Resazurin galt es, den Lichteinfall zum minimieren. Für genau 90 Minuten konnten die Zellen dann ihr reduzierendes Potential nutzen um Resorufin zu bilden. Dieses wurde dann bei 37°C im Fluroscan mit 544 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 590 nm detektiert. Die Vitalität wurde dann, nach Abzug der Positivkontrolle, als Differenz zwischen Probe und Kontrolle berechnet.

9.3 Synthese

Da der Hauptmetabolit des Furans nicht kommerziell erhältlich ist, musste er für die damit durchgeführten Versuchsreihen synthetisiert werden.

9.3.1 Butendial

Die Synthese von BDA erfolgte in zwei Stufen, wobei die erste Umsetzung aus einer Synthese des Aflatoxin-Grundgerüsts entnommen ist. Zunächst wurde das 2,5-Diacetoxy-2,5-Dihydrofuran hergestellt, aus dem dann in einer zweiten Stufe das Hydrat des cis-2-Buten-1,4-dials hervorging (Holzapfel and Williams, 1995).

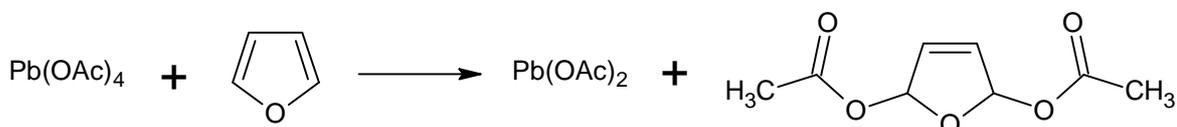


Abb. 17: Erste Stufe der Synthese mit dem Zwischenprodukt 2,5-Diacetoxy-2,5-Dihydrofuran

In einen Kolben wurden 50 ml Eisessig und als Katalysator weitere 2 ml Essigsäureanhydrid gegeben. Durch Hinzufügen von 10 g Bleiacetat (22,58 mmol) unter ständigem Rühren entstand eine Suspension. Diese wurde auf 60°C erhitzt und dann 1,7 ml Furan (22,8 mmol) hinzugegeben. Nach einer Stunde Reaktionszeit war eine homogene Lösung entstanden. Diese wurde in abgekühltem Zustand am Rotationsverdampfer eingeengt. Im Ölpumpenvakuum wurden noch verbliebene flüchtige Residuen entfernt und ein gelbes Öl erhalten. Dieses wurde in Diethylether gelöst, wobei sich ein weißer Feststoff bildete, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde anschließend über eine Kieselgelsäule chromatographisch aufgereinigt. Der Ether wurde abgezogen und das verbleibende Öl im Vakuum getrocknet, bis es eine zähflüssige Konsistenz hatte. Das Zwischenprodukt, 2,5-Diacetoxy-2,5-Dihydrofuran, konnte dann bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden, bis BDA benötigt wurde.

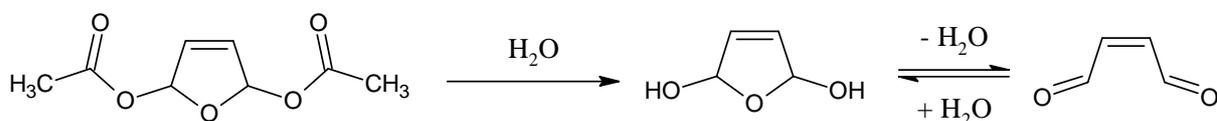


Abb. 18: Zweite Stufe der Synthese mit resultierendem 2-Buten-1,4-dial

Am Tag vor dem Einsatz des BDA wurde das Zwischenprodukt mit bidestilliertem Wasser oder mit Kaliumphosphat-Puffer umgesetzt. Dabei wurde die Menge 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran nach Bedarf gewählt und in einer entsprechenden Menge gelöst, so dass keine zu niedrigen Konzentrationen (meist 10 M) in Hinsicht auf die weitere Verwendung entstanden.

9.3.2 Adduktbildung

Für die Adduktreaktion wurden zunächst zwei Lösungen hergestellt. Einerseits die *cis*-2-Buten-1,4-dial-Lösung, die über Nacht in K₃PO₄-Puffer hergestellt wurde und zweitens eine GSH-Lösung. Diese enthielten die in Tabelle 10 angegebenen Mengen GSH und BDA.

Tab. 10: Einwaagen der Reaktionspartner GSH und BDA

Ansatz	BDA-Lösung		GSH-Lösung	
	BDA [mg]	K ₃ PO ₄ -Puffer [ml]	GSH [mg]	K ₃ PO ₄ -Puffer [ml]
1:2	93,1	2	307,3	3
1:4	93,1	2	614,6	3
1:6	93,1	2	921,9	3
1:8	93,1	2	1229,2	3
1:10	93,1	2	1536,5	3

Die Lösungsmittelmenge wurde derart gewählt, dass nach Zusammenfügen der beiden Reaktionslösungen eine Endkonzentration für *cis*-2-Buten-1,4-dial von 0,1 M entstand. Diese diente dann als Referenz für die Herstellung der Konzentrationsreihen (siehe: 9.2.3.2).

9.4 Analytik

Die Ermittlung von Bestimmungs- und Nachweisgrenze des Furans erfolgte nach den Ergebnissen von MacDougal und Crummett, die den Nachweis einer Substanz als gesichert ansahen, wenn es 3-fach über der Standardabweichung des Rauschens detektiert werden konnte. Für eine sichere quantitative Bestimmung forderten sie ein Verhältnis von mindestens einem Faktor 10 (MacDougall and Crummett, 1980).

9.4.1 HPLC-MS

Die HPLC-MS wurde zur Analyse der Adduktbildung des Butendials eingesetzt. Es wurde meist ein zuvor erstelltes Reaktionsgemisch untersucht, bei dem die Ausgangssubstanzen genau bekannt waren. Von diesem Ansatz wurde eine Probe derart entnommen, dass sich ein möglichst detailliertes Bild der entstehenden Eddukte erstellen ließ. Um ein noch genaueres Bild der entstandenen Verbindungen zu erhalten, wurde meist mit einem selektiven MS-MS-Modus entsprechend der Methode von Chen et. Al. gemessen, der es erlaubte ein Eddukt mit zuvor bestimmter Masse durch Kollisionen (Collision-induced dissociation CID) weiter aufzuspalten (Chen *et al.*, 1997).

Die beiden Fließmittel wurden vor ihrem Einsatz mit Ultraschall entgast. Methanol wurde als Fließmittel A eingesetzt. Im Gradienten gemischt wurde es mit gereinigtem Wasser, das mit 50 mM Ammoniumacetat auf einen pH von 5,5 gepuffert war.

Tab. 11: Fließmittel-Gradient während der HPLC-MS-Analyse

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	100	0
30	70	30
35	70	30
40	100	0
42	100	0

Die Probe wurde bei Bedarf mit den verwendeten Fließmitteln verdünnt, um eine Konzentration von 10 mM Butendial zu erreichen und anschließend auf den pH-Wert 5,5 eingestellt. Beladen wurde die C18-Trennsäule durch den Autosampler mit jeweils 20 µl der Probe.

Die Trennung erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, wobei der in Tabelle 11 gezeigte Gradient die beste Trennung erzielte.

Die für die Massenspektrometrie benötigte Ionisierung wurde durch Elektro-Spray-Ionisation im positiven Modus erreicht. Um alle entstehenden Ionen zu erfassen, wurde zunächst stets ein Totalionenscan im Massenbereich von 250-1150 m/z durchgeführt.

In weiteren Scans wurde dann eine der detektierten Masse-Ladungen im ersten Quadrupol isoliert und über eine Fragmentierung durch Kollisionsgas in Bruchstücke zerteilt, also ein so genannter Product-Ion-Scan (PIS) (De Hoffmann, 1996). Die Größe der Fragmente konnte über eine Variation der „Collision Energy“ justiert werden, um die Identifikation möglichst zu vereinfachen.

Tab. 12: Potentiale und Einstellungen der ESI-Quelle und der Quadrupole

Modus:	Positiv
Temperatur:	400
Curtain Gas:	50
Collision Gas:	5
Ion Spray Voltage:	5500
Ion Source Gas 1:	30
Ion Source Gas 2:	70
Declustering Potential:	151
Focusing Potential:	350
Entrance Potential:	7
Collision Energy:	15-35

9.4.2 GC-MS

Die Untersuchung der Furanhalte erfolgte durch Gaschromatographie (GC) mit gekoppelter Massenspektrometrie. Als Injektionsverfahren wurde das für Furan am häufigsten empfohlene Verfahren der Headspace-Injektion gewählt. Diese wurde von einem Combi-Pal-Autosampler durchgeführt, um identische Bedingungen und somit Vergleichbarkeit der Einzelmessungen zu gewährleisten. Während jeder Inkubation mit Furan im geschlossenen Gefäß wurden mehrere Proben jeweils nach 5 Minuten einer und 24 Stunden Inkubation entnommen. Ein Milliliter des Mediums wurde mit einer Einweg-Spritze durch das Septum entnommen und in das gekühlte Vial gegeben. Dieses wurde anschließend sofort mit einem Silikonseptum verschlossen und in den Autosampler gestellt. Vor Start der Messung wurde die Probe dann für 10 Minuten auf 60°C aufgeheizt. Von den 10 ml des Vialvolumens wurde ein Milliliter der Gasphase entnommen und im Splitless-Verfahren injiziert. Der Injektionsblock hatte eine Temperatur von 200°C und einen Heliumfluss von 1 ml/min.

Die Trennung erfolgte auf einer HP Plot Q Säule mit einer Länge von 30 m und einem inneren Durchmesser von 0,32 mm und einer Filmdicke von 20 µm. Der Ofen hatte eine Anfangstemperatur von 50°C für die ersten 10 min. Anschließend wurde innerhalb von 10 min auf 225°C erhöht und diese Temperatur erneut für 10 min gehalten.

Zur Analyse der Kalibrierstandards wurde ein Single-Ion-Monitoring-Scan (SIM) für den Massebereich des Furan mit 31 m/z und den des internen Standards Acetonitril mit 41 m/z durchgeführt. Die jeweiligen Peakflächen wurden ermittelt und ins Verhältnis gesetzt.

Zur Auswertung wurde eine Kalibrierung mit einer Konzentrationsreihe Furan und internem Standard im verwendeten Medium durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Lösungen und Gefäße eine Temperatur von 4°C hatten. Aus den erhaltenen Werten wurde dann eine Kalibriergerade zwischen Verhältnis der Peakfläche und Konzentration erstellt.

Die Bestimmung der Konzentration von Furan in den Proben konnte dann anhand dieser Kalibriergeraden erfolgen. Die Proben wurden dazu ebenfalls im SIM-Modus vermessen, dann jedoch auf den Bereich um 31 m/z konzentriert.

9.5 Statistik

Die statistische Signifikanz der Messwerte wurde mit „one-way analysis of variance“ (ANOVA) und dem Dunnett`s post test bestimmt. Sie wurden mit der Software InStat von GraphPad Software, Inc. (San Diego, USA) durchgeführt.

Die ANOVA wurde zur Klassifizierung von konzentrationsabhängigen Effekten verschiedener Substanzen herangezogen. Die Durchführung des Dunnett`s post test ermittelte evtl. Abhängigkeiten bei Effekten der Probensubstanzen mit einer Kontrollsubstanz.

Sofern im Graphen nicht anders angegeben bedeutet dabei * statistisch signifikant ($p < 0,05$) und ** statistisch hochsignifikant ($p < 0,01$).

10 Ergebnisse

Die Untersuchungen, die an der TU Kaiserslautern im Rahmen des Furan RA Projektes durchgeführt wurden, sind in zwei Bereiche unterteilt. Einerseits stand der Einfluss von Furan auf die makroskopische Funktion der Leber zur Untersuchung und zweitens sollte dessen Wirkung auf Zellebene untersucht werden. Daher sind hier zunächst die Ergebnisse zur Leberstruktur in Form von Histologischen Schnitten beschrieben. Anschließend folgen die Untersuchungen in der Zellkultur mit den Daten der Zytotoxizität an Leberzelle.

10.1 Histologie

Die für die Histologie durchgeführten Schnitte haben ein sehr gleichmäßiges Erscheinungsbild. Die Schichtdicke der Paraffinschnitte lag stets bei 3 μm und wurde nur in Ausnahmefällen erhöht, so sieht man in allen Leberschnitten eine einheitliche Lage von Hepatozyten. Es lassen sich auch keine überdeckenden Zellkerne erkennen, die ein Indiz für lokal erhöhte Schichtdicken oder Faltung des Schnittes sind.

Die Färbung der Schnitte mit Eosin zeigt sich sehr einheitlich und unproblematisch. Anders sieht es da beim Hämatoxylin aus, das keine so gleichmäßige Anfärbung der Zellkerne zuließ. Die Schwankungen in der Färbeintensität haben jedoch keinen sichtbaren Einfluss auf die Lage, Größe und Form der Zellkerne, die immer gut zu erkennen sind. Somit sind die für die makroskopische Beurteilung wichtigen Parameter alle klar erkennbar.

Die hier abgebildeten Proben repräsentieren lediglich die weit über 500 durchgeführten Schnitte und Färbungen, sind aber keineswegs besonders herausragende Exemplare. Es zeigt sich vielmehr eine hohe Homogenität der Schnitte, die Auswahl erfolgte lediglich nach der Erkennbarkeit von Besonderheiten in den dargestellten Proben. Diese werden durch eine Vergrößerung des betroffenen Bereiches hervorgehoben. Um die Übersicht über den funktionellen Aufbau zu wahren, wird allerdings die kleinere Vergrößerung nebenan gestellt.

In dieser ersten Abbildung 19 handelt es sich um den Schnitt durch einen rechten vorderen Leberlappen. Das Tier aus der Hochdosisgruppe erhielt über 28 Tage 2

mg/kg Furan. Mit einer Vergrößerung von 1:100 sieht man ein typisches Periportalfeld mit seinen drei funktionellen Einheiten. Das größte Lumen besitzt in Abbildung 19 a und c die Portalvene, woran sich im rechten oberen Bildteil ein größerer Gallengang anschließt. Rund um diese Einheiten sind mehrere kleinere Versorgungsarterien zu erkennen. Eine davon ist in Abbildung 19 b am linken Bildrand deutlich zu erkennen, es finden sich aber darunter noch weitere kleinere in der linken unteren Bildecke.

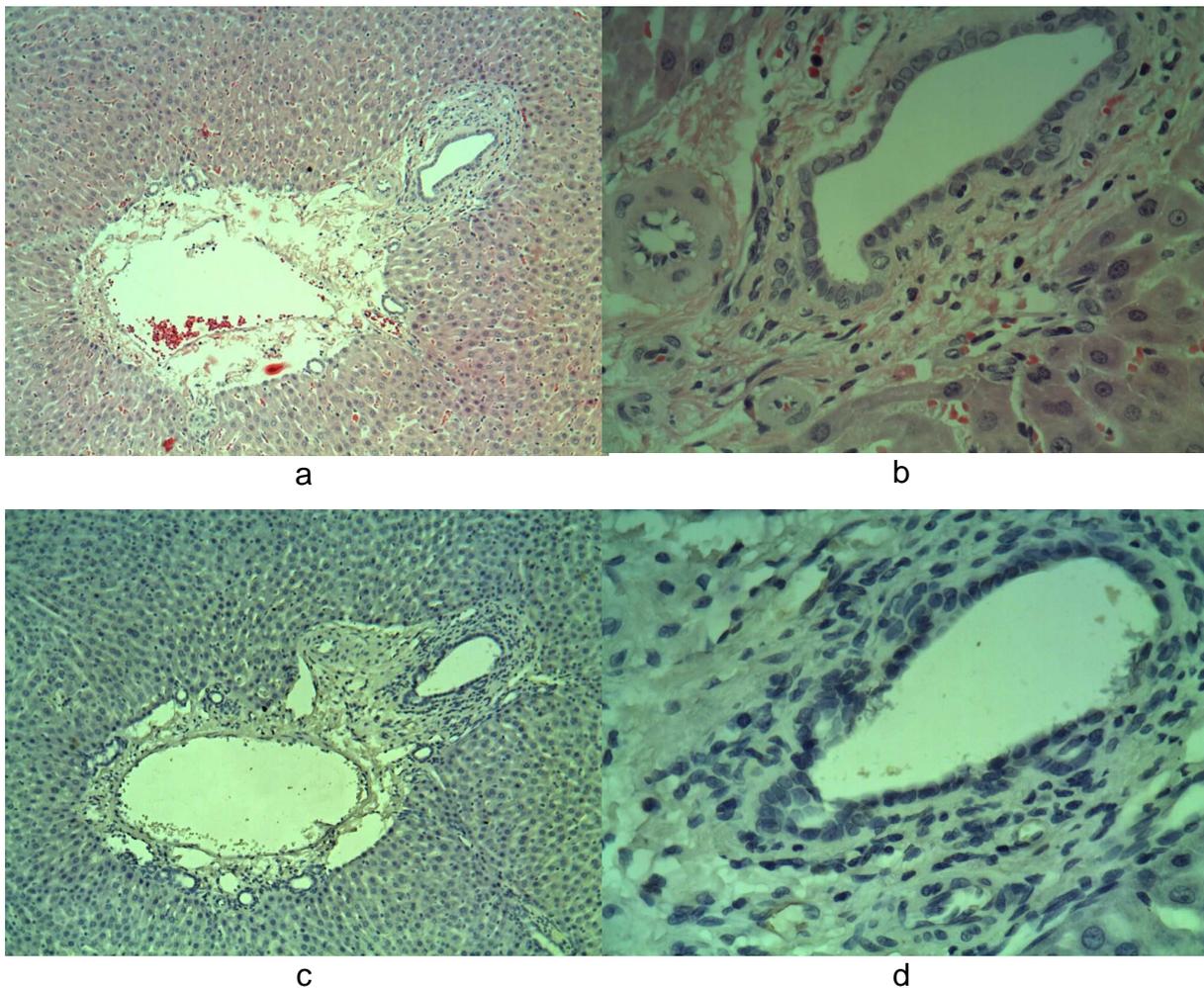


Abb. 19: Rechter vorderer Leberlappen (100x/400x) eines Tieres der Hochdosisgruppe. Es wird dieselbe periportale Zone gezeigt, oben in H&E-Färbung und unten in PCNA-Färbung.

Auffallend an diesem Schnitt ist das massive Epithelgewebe rund um den Gallengang. Zusätzlich findet sich eine deutlich erhöhte Zellkerndichte in diesem Bereich. Auch die Verteilung der Zellkerne und deren Anordnung ist nicht so

gleichmäßig wie üblich, so sind in Bild b die Zellkerne links des Gallengangs deutlich dichter als rechts unterhalb.

Bei der anschließenden Untersuchung mit Hilfe des PCNA-Färbens zeigt sich jedoch kein auffallendes Bild in 19 c und d. Es finden sich jedoch nur sehr wenige bräunlich gefärbte Zellkerne und somit liegt in dem dargestellten Bereich keine erhöhte Teilungsrate der Zellen vor.

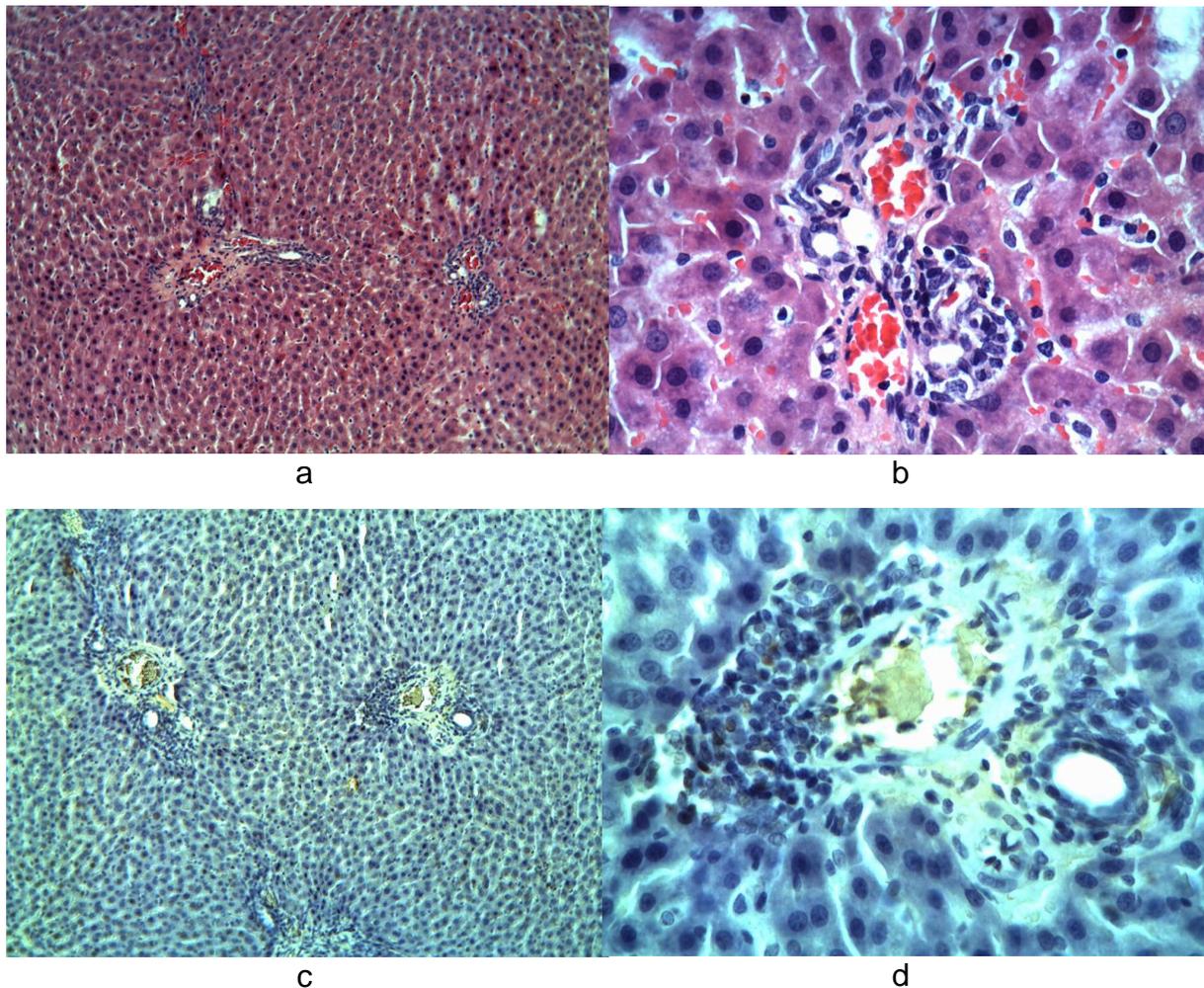


Abb. 20: Das gleiche Periportalfeld eines Kaudalen Leberlappens (100x/400x) eines Tieres der Kontrollgruppe. Oben in H&E-Färbung und unten in PCNA-Färbung. Die Proliferation ist vor allem an den dunkleren, braunen Zellkernen in der PCNA-Färbung zu erkennen.

Ein ganz ähnliches Bild findet sich in Abbildung 20 eines Tieres der Kontrollgruppe. Hier ist ein Kaudaler Leberlappen mit diesmal zwei Periportalfeldern in der kleineren Vergrößerung (a und c) zu erkennen. In der Mitte des oberen Bildes a kann man besonders deutlich die linear angeordneten

Hepatozyten mit den dazwischen befindlichen Sinusioden bzw. Gallencanaliculi erkennen. Wenn man die beiden Periportalfelder von rechts nach links verbindet und nach oben weiter geht, kann man an dem entstehenden Winkel die Grenze zwischen den hier aneinanderstoßenden, hexagonalen Leberlobuli deutlich erkennen.

Die Vergrößerung des rechten Periportalfeldes in Abbildung 20 b hebt wieder die Zone mit einer erhöhten Dichte der Zellkerne hervor. Auch die inhomogene Anordnung der Epithelzellen besonders im Vergleich von links oben, zur Mitte und zum rechten unteren Rand des Periportalfeldes stimmen nicht mit den weiteren betrachteten Präparaten überein.

Eine PCNA-Färbung eines parallel entlang der Periportalvene versetzten Schnittes in diesem Bereich ist in Abbildung 20 c und d zu sehen. Schon in der kleineren Vergrößerung kann man die dunklere Färbung des rechten Periportalfeldes erkennen. Die Vergrößerung in d ermöglicht dann ein genaueres Erkennen der Zellkernhäufung im linken Bereich der Abbildung. Die deutliche Braunfärbung vieler Zellkerne mit vermehrtem PCNA-Protein zeigt eine überdurchschnittliche Zellvermehrung in dieser Probe.

Diese Häufung der Zellkerne konnte in mehreren Proben dieses Probtieres im gezeigten kaudalen Leberlappen, sowie zweimal im mittleren und einmal im rechten vorderen Leberlappen beobachtet werden. In anderen Tieren war dieser Befund jedoch mit insgesamt zehn Funden sehr selten und in sonst keinem mehrfach zu beobachten.

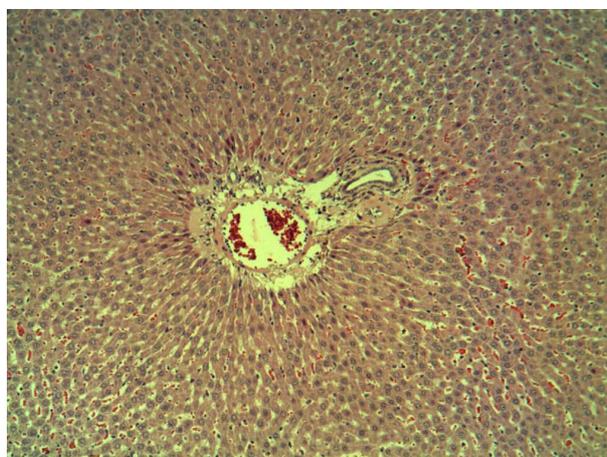


Abb. 21: Periportalfeld des Caudalen Leberlappens (100x) nach Behandlung mit 2 mg/ kg bw. Die Leberlobuli zeigen keine Beeinträchtigung.

Die Abbildung 21 zeigt einen Schnitt durch ein Periportalfeld, diesmal mit dem umliegenden Gewebe. Es sind deutlich die strahlenförmig abgehenden Sinusoide zu erkennen, die die Funktion der Leber mit dem Transport des Pfortader- und Arterienblutes gewährleisten. Diese Kanäle sind in allen Schnitten deutlich zu erkennen und in keiner Probe sichtbar gestört oder beeinträchtigt. In den verabreichten Dosen kann Furan die Struktur der Leberlobulie nicht erkennbar beeinflussen.

Deutlich ist in der Abbildung auch die Abgrenzung von hellerem Epithelgewebe um das Periportalfeld zu den dunkleren Hepatozyten im umgebenden Gewebe zu erkennen, die auf eine unterschiedlich starke Affinität zum verwendeten Farbstoff Hematoxylin zurückzuführen ist. So lassen sich die in einzelnen Proben vorliegenden Epithelveränderungen leichter erkennen. In dem hier gezeigten Beispiel einer Ratte der hochdosierten Gruppe sind jedoch keine Anomalien zu erkennen. In den histologischen Schnitten mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung kann kein Zusammenhang zwischen den epithelialen Veränderungen und einer Gabe von Furan erkannt werden. Dies wird auch durch die durchgeführten PCNA-Antikörper-Färbungen belegt. Sie zeigen einzelne durchaus vorkommende Zellteilungen, wie in Abbildung 22 a und b durch die vereinzelt tief braun gefärbten Zellkerne zu erkennen ist. Deren Häufigkeit ist jedoch in keiner Weise in ein Verhältnis zur Furan-Dosierung zu setzen.

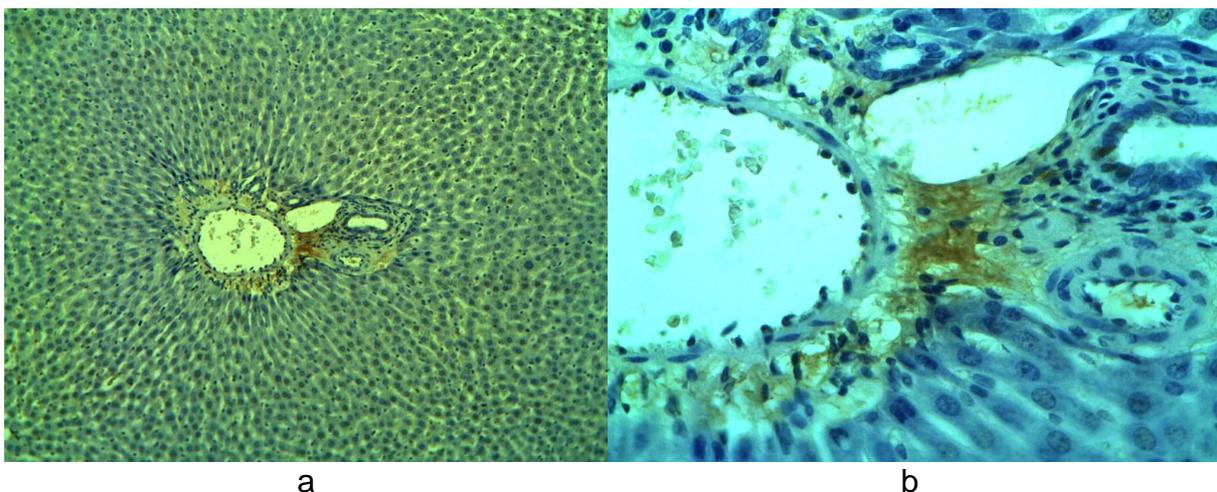


Abb. 22: Kaudaler Leberlappen (100x / 400x) eines Tiers der Dosisgruppe 2 mg/ kg bw. Die radiale, funktionelle Anordnung der Hepatozyten war nie beeinträchtigt.

Generell sind die gefundenen Anomalien, vor allem Hyperplasien, Apoptosen, seltener Hypertrophien und Infiltrationen neutrophiler Granulozyten, sehr vereinzelt und nie gemeinsam in mehreren Tieren einer Dosisgruppe zu finden. Auch innerhalb eines Tieres waren die Läsionen selten mehr als einmal anzutreffen und kaum in den verschiedenen Leberlappen. Dies wurde durch die Auswertung der randomisierten Proben sehr deutlich, da allein anhand der pathologischen Befunde keine Zuordnung der Objekte zu einer Dosisgruppe möglich war.

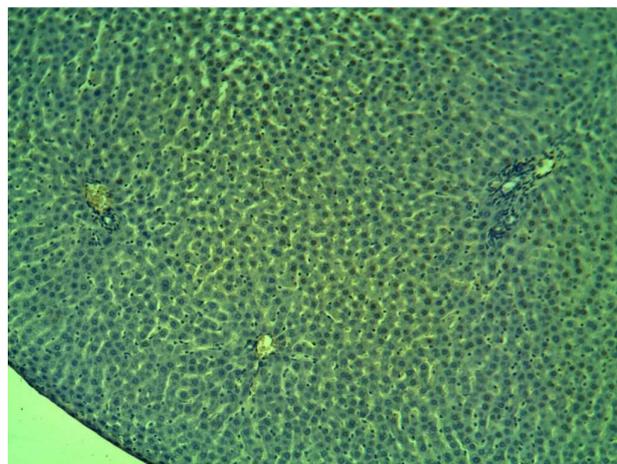


Abb. 23: PCNA-Färbung der Randzone des Kaudalen Leberlappens (100x) nach Behandlung mit 2 mg/ kg bw für 28 Tage. Zwischen Randzonen und zentralen Zellen war keine Unterscheidung möglich.

Zuletzt wurde noch ein besonderes Augenmerk auf die Randzonen der Leberlappen gerichtet. Projektpartner fanden dort eine erhöhte Proliferation in einigen Proben von Bromdesoxyuridin (BrdU)-markierten Tieren, doch auch in diesem Bereich konnten keine Veränderungen in den HE- und PCNA-gefärbten Präparaten gefunden werden.

10.2 Zellkultur

Durch Versuche an Zellkulturen wurde die zytotoxischen Einflüsse von Furan und seinen Metaboliten bestimmt. Jede Substanz zeigt mehr oder weniger starke Einflüsse auf unterschiedliche Assays, daher bedurfte es einer ganzen Reihe von

Versuchen, in denen die optimalen Parameter für die Bestimmung der Zytotoxizität ermittelt wurden. Zum Einsatz kamen Tests der Lactate Dehydrogenase-Leakage (LDH), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Neutralrot, Proteinmessung nach Bradford, Resazurin und Trypan Blau. Die letzten Beiden zeigten sich dabei als am zuverlässigsten und vor allem in den Wiederholungen als den anderen an Konstanz der Ergebnisse überlegen. Der MTT-Test war dem Resazurin in den Ergebnissen sehr ähnlich.

10.2.1 Furan in vitro

Furan als eine extrem flüchtige Substanz, vor allem mit seinem Siedepunkt deutlich unter der üblichen Inkubationstemperatur von 37°C erforderte eine ganze Reihe von Vorversuchen, um die durch Furan verursachten Effekte klar von systembedingten trennen zu können. Im Folgenden sind auch die wichtigsten Ergebnisse dieser Tests dargestellt.

10.2.1.1 Inkubation im offenen System

Zunächst wurde die im Arbeitskreis übliche Inkubation in 24- oder 48-Well-Platten, und üblichen 60 mm-Petrischalen durchgeführt. In diesen Vorversuchen wurden Zellen der Typen H4IIE, HepG2 und auch Primäre Hepatozyten eingesetzt. Furan wurde in Konzentrationsreihen von 0,1 bis maximal 100mM im Inkubationsmedium eingesetzt. Es zeigten sich keine reproduzierbaren Effekte, die auf Furan zurück zu führen waren. Der Resazurintest ergab keine konzentrationsabhängigen Zytotoxizitäten. Auch die optische Kontrolle unter dem Mikroskop ließ keine Unterscheidung zwischen unbehandelten und behandelten Zellen erkennen.

10.2.1.2 Inkubation im geschlossenen System

Im Folgenden wurden Petrischalen ohne Lüftungsnocken eingesetzt. In diesem System färbte sich das Medium in den ersten Proben schon nach 4 Stunden Inkubation orange. Unter dem Mikroskop war nach 6 Stunden deutliches Ablösen der Zellen zu erkennen. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei den Primären Hepatozyten, gefolgt von den HepG2 Zellen. Die H4IIE-Zellen erreichten einen vergleichbaren Schädigungsgrad erst nach 8 Stunden Inkubation.

Um eine ausreichende Vitalität über die gesamten 24 Stunden zu erreichen war eine Vergrößerung des Gasraumes also unvermeidlich. Zur Verwendung kamen 250 ml fassende Kulturgefäße, die durch eine Gummidichtung im Metalldeckel (siehe Abbildung 24) für einen sicheren luftdichten Verschluss sorgten.

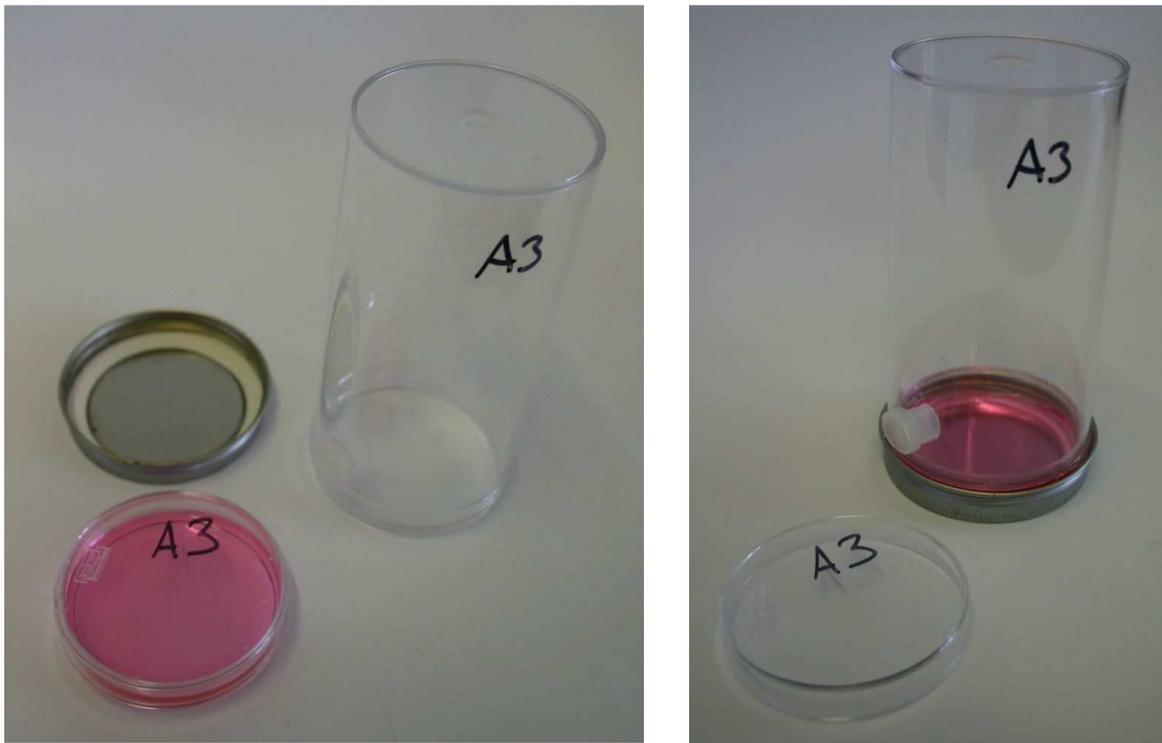


Abb. 24: Die verwendeten Gefäße mit gasdichtem Raum über der Petrischale, einmal vor und einmal während der Inkubation

Mit diesen Gefäßen wurden dann Langzeittests durchgeführt und es konnte bei den Zelltypen HepG2, H4IIE und den Primären Hepatozyten keine Beeinträchtigung des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe frei im Brutschrank ermittelt werden. Erst nach 48 Stunden begann eine Säuerung des Mediums bei Primäre Hepatozyten, nach 60 Stunden bei den HepG2 und nach 72 Stunden bei den H4IIE. Es zeigten sich trotz des großen Gasraumes jedoch vereinzelte Petrischalen, in denen der PH-Wert deutlich gekippt war. Dies trat mit einer Häufigkeit von ca. 1 Probe unter 20 auf und war darunter etwas häufiger bei den Inkubationen der Primären Hepatozyten. Interessant daran war, dass es eigentlich nur die Proben gab, die entweder ganz in Ordnung oder eben vollständig im sauren Bereich lagen. Eine Abstufung dazwischen wurde nicht beobachtet. Dieser Fehler konnte aber problemlos über die technischen Triplikate abgefangen werden, in dem diese Proben nicht in die Auswertung einbezogen

wurden. Eine zur Sicherheit stets mitgeführte offene Kontrolle zeigte in allen folgenden Versuchen mit den aufgezählten Zelltypen keine merkliche Abweichung zur Kontrolle im geschlossenen Gefäß.

Für die Inkubationen in diesen großen Gasräumen mussten entsprechend hohe Anfangskonzentrationen von bis zu 100 mM erreicht werden, was sich nur noch über Zugabe von reinem Furan erreichen ließ. Es zeigte sich, dass mit den vorhandenen Eppendorf-Pipetten ein genaues Abmessen des reinen Furans nicht möglich war. Sobald das Furan in Kontakt mit den relativ warmen Pipettenspitzen kam, begann es sich aus dieser heraus zu drücken. Die Mischung 1:1 mit DMSO (8 molare Furan-Lösung) verhinderte dies, ließ aber gleichzeitig eine maximale Konzentration von 32 mM in den Petrischalen zu.

Unter diesen Bedingungen wurden die oben genannten Zelltypen mit Furan getestet. Die Hepatomzelllinien zeigten anfangs keine konzentrationsabhängigen Effekte.

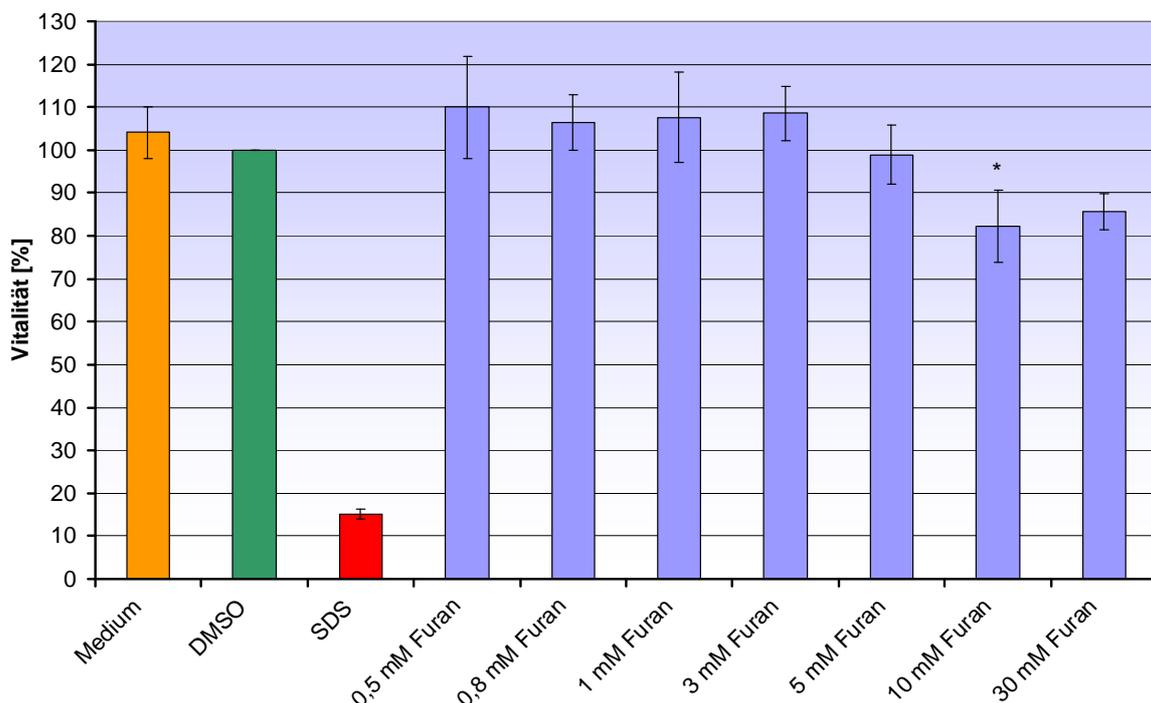


Abb. 25: Zytotoxizität von Furan (24 h) an H4IIE im geschlossenen System, nach 2 h Präinkubation mit 30 mM Aceton. (n=3)

Erst durch eine zweistündige Vorinkubation mit 30 mM Aceton konnten ab einer 5 mM Furan-Inkubation leichte Effekte ausgemacht werden. Bei 10 mM war eine

signifikante Abnahme auf $82,2\% \pm 8,5\%$ zu erkennen, bei 30 mM konnte dies allerdings mit $85,6\% \pm 4,3\%$ nicht weiter bestätigt werden.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die Positivkontrolle mit verbleibenden $15,2\% \pm 1,2\%$ Vitalität noch deutlich zu hoch war. In den folgenden Versuchen wurde die Konzentration des SDS daher von 0,5 auf 1 mM erhöht, um ein Absterben aller Zellen sicher zu stellen.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Artur Kessler wurde die Cyp2E1 Aktivität von Hepatomzelllinien mit Primären Hepatozyten verglichen. In Abbildung 26 sieht man im Ergebnis, dass in einem Versuch, bei dem die Umsetzung von 7-Methoxytrifluoromethylcoumarin (7-MFC) gemessen wurde, die Hepatozyten eine deutlich höhere Metabolisierungsrate zeigen.

Leider wurde der Versuch nur in technischen Replikaten erstellt, so dass eine statistische Aussage nicht möglich ist. Im Ergebnis konnte man aber erkennen, dass die Primären Hepatozyten nach einer Stunde mit $204\% \pm 24\%$ eine ungefähr doppelt so hohe Umsatzrate erreichten, wie die als Referenz untersuchten Hepatomzellen. In einer weiteren Stunde schafften sie noch $71\% \pm 20\%$, also in jedem Fall noch über 50% der Ausgangsleistung der Hepatomzellen. Deren Umsatz ging dagegen mit $39\% \pm 45\%$ auf Null oder knapp darüber zurück.

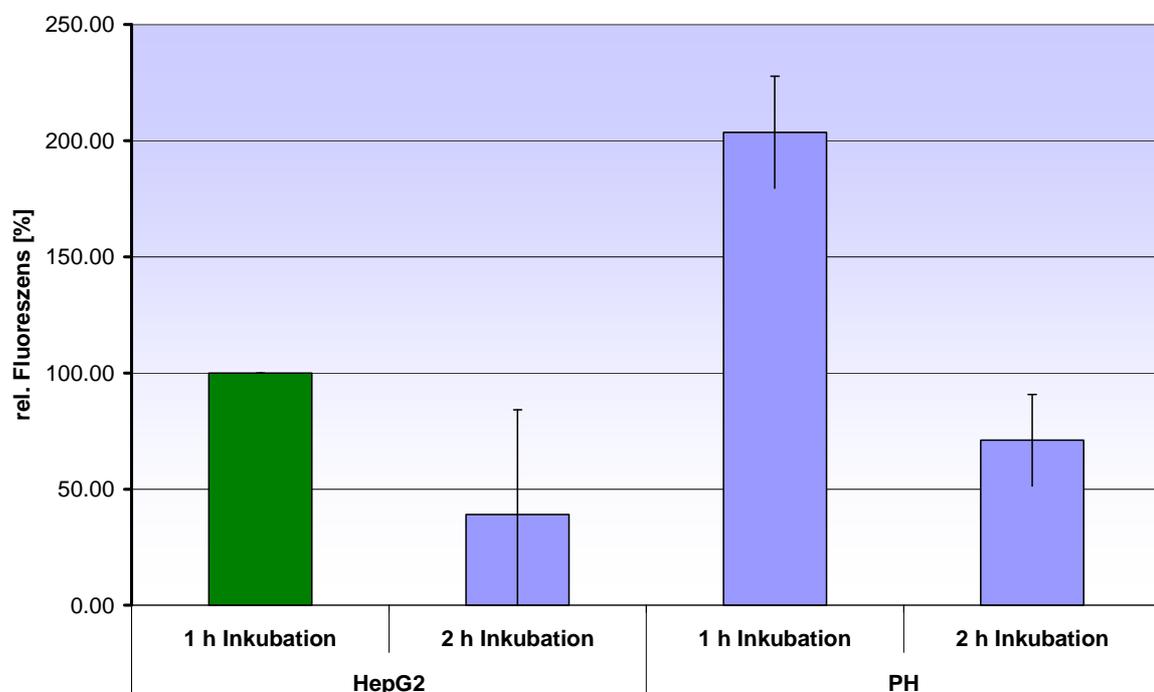


Abb. 26: Umwandlung von 7-MFC durch Cyp2E1 relativ zur Leistung von HepG2 nach 1 Stunde Inkubation

Der Test der Primären Hepatozyten mit Furan im geschlossenen Gasraum zeigte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit. Bei 2 mM Furan initial zeigten die Zellen mit $104,3\% \pm 9,8\%$ noch uneingeschränkte Vitalität. Bei 4 mM lag diese schon nur noch bei $54,2\% \pm 13,6\%$ und nahm im Verlauf der Konzentrationsverdopplungen auf minimal $22,0\% \pm 7,4\%$ konstant ab. Dieser Befund deckte sich vollständig mit den zur Kontrolle ausgezählten, Trypsin-angefärbten Proben, die im Anschluss an die Messung zufällig ausgewählt wurden. Die SDS-Kontrolle erreichte mit $5,5\% \pm 4,2\%$ nur minimale Vitalitätswerte und zeigte unter dem Mikroskop keine Anzeichen für verbliebene vitale Zellen. Verbleiben noch die beiden zur Sicherheit mitgeführten Mediumproben. Der in Abbildung 27 orange eingefärbte Wert für das reine Medium im Gefäß zeigte mit $110,9\% \pm 1,4\%$ keine statistischen, wie auch optischen Unterschiede zur DMSO-Kontrolle. Auch die zur Überprüfung des Einflusses des geschlossenen Gasraumes mitgeführte offene Probe war mit $111,4\% \pm 6,5\%$ nicht von der Negativkontrolle zu differenzieren.

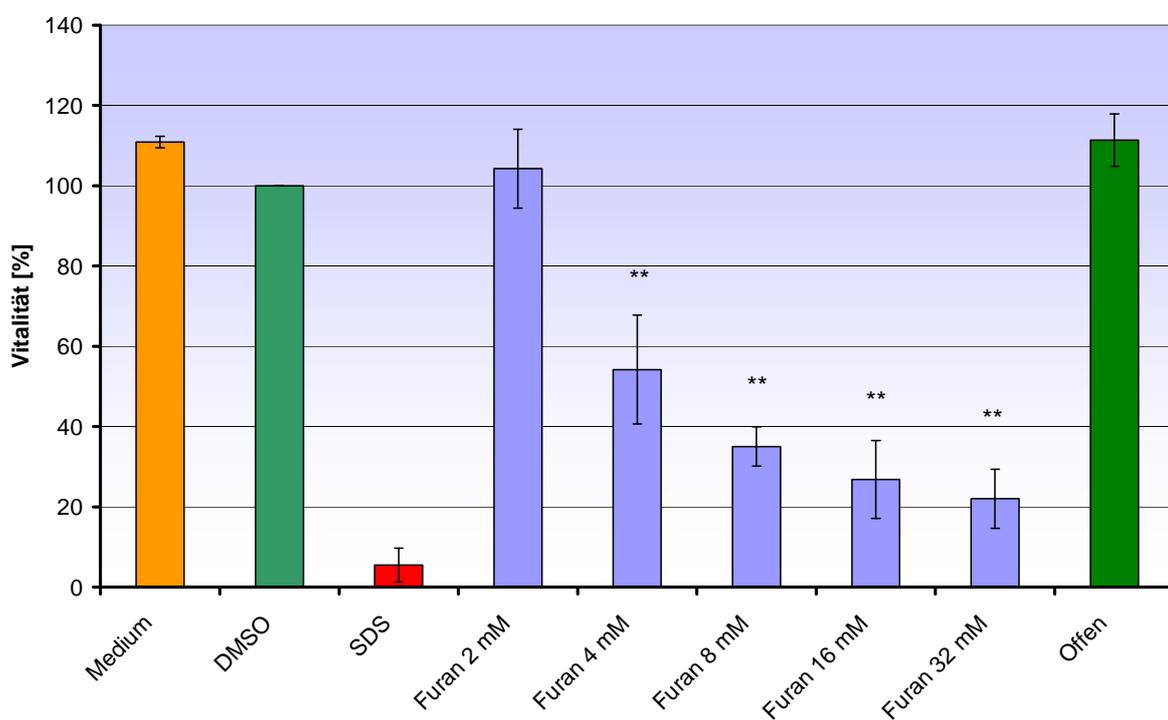


Abb. 27: Zytotoxizität von Furan (24 h) im geschlossenen System an Primären Ratten-Hepatocyten (n=5)

Aus diesen Daten ließ sich im Folgenden die Konzentration bestimmen, bei der ein Effekt von 50% (EC50) erreicht wurde. Hierzu wurde die berechnete Letalität

gegen die zugehörige Konzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen und an die so erhaltenen Punkte eine sigmoidale Funktion angepasst.

Dies ergab einen EC50-Wert von 3,98 mM initial für primäre Hepatozyten im geschlossenen Gasraum.

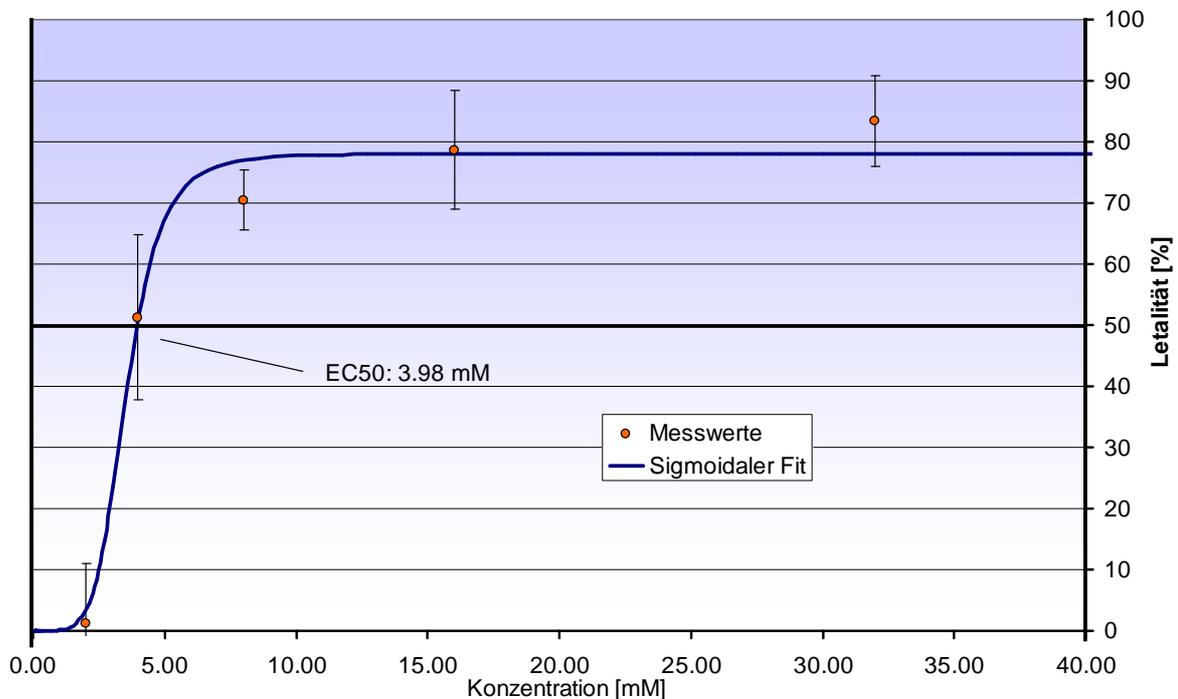


Abb. 28: Ermittelte Effektive initiale Konzentration (50%) für Furan an Primären Hepatozyten

Der gefundene EC50 stellte allerdings lediglich für eine sehr kurze Phase zu Anfang der Inkubation einen absoluten Wert dar. Mit Einstellung des Gleichgewichts zwischen Gasphase und flüssiger Phase änderte sich auch die an den Zellen wirkende Konzentration. Um diese Änderung verfolgen zu können, wurden bei den Messungen jeweils Proben des Mediums entnommen und die Konzentration des Furans darin am GC-MS ermittelt.

Nach Optimierung der quantitativen Analytik konnte mit der beschriebenen Methode GC-MS ein Limit of Detection (LOD) von 0,3 μM (20ng/g) erreicht werden. Mit dem entsprechenden Limit of Quantification (LOQ) von 1 μM war die Voraussetzung zur Ermittlung und Quantifizierung von Furanspuren in den Medien eingehalten.

Gerade in den ersten Minuten der Inkubation fiel die Konzentration im Medium sehr schnell und deutlich ab. So war nach 5 Minuten nur noch 1/7 der

zugegebenen Furanmenge im Medium nachweisbar. Dieser Wert fiel dann in den folgenden Stunden wiederum auf ca. 1/3 dieses Wertes.

Nimmt man nun ein zwei Phasen-Modell als Grundlage für diesen Zusammenhang, so kann man eine kinetische Gleichung für den zeitlichen Verlauf erstellen:

$$C_1(t) = C_0 \left(1 - \frac{k_{12}}{k_{12} + k_{21}} \left(1 - e^{-(k_{12} + k_{21})t} \right) \right)$$

$C_1(t)$ war hierbei die Konzentration im Medium zur Zeit t ist, die sich aus der Anfangskonzentration C_0 mit den Geschwindigkeitskonstanten für Medium zu Gas k_{12} und Gas zu Medium k_{21} ergab. Diese Gleichung diente zur Regression der gemessenen Konzentrationen und man erhielt ein Bild über den gesamten Inkubationszeitraum. Der Verlauf in Abbildung 29 zeigte deutlich, dass es sich nicht nur um einen anfänglichen starken Konzentrationsabfall handelte, sondern dieser auch anschließend schnell in einem konstanten Gleichgewicht endete. So war für alle eingesetzten Konzentrationen nach spätestens 7 Stunden ein Gleichgewicht zwischen Gas- und Mediumsphase erreicht und damit für den überwiegenden Zeitraum der Inkubation konstant.

So ergaben sich für die Inkubation von 32 mM initial eine Dauerkonzentration im Gleichgewicht von lediglich 0,1291 mM und für die halbe Initialkonzentration von 16 mM auch ungefähr die halbe Gleichgewichtskonzentration mit 0,0690 mM. Dies setzt sich mit 0,0296 mM für 8 mM initial so fort. Die so dicht beim EC50 liegende Konzentration von 4 mM entsprach im Inkubationsverlauf einem Wert von 0,0188 mM. Die niedrigste Dosis und gleichzeitig die einzige ohne signifikanten Effekt entsprach somit 0,0066 mM.

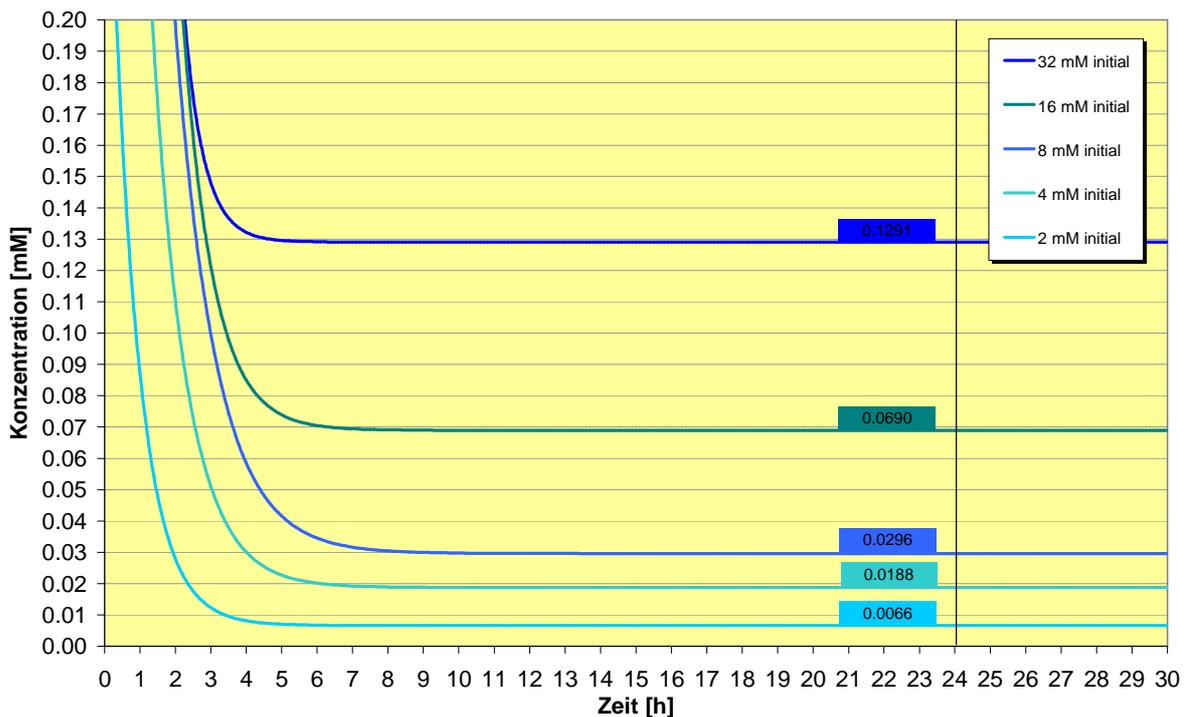


Abb. 29: Bestimmung der effektiven Inkubationskonzentrationen für die anfangs berechneten, eingesetzten Konzentrationen anhand von kinetischen Berechnungen der HS-GC-MS Messungen.

Um schädliche Effekte der hohen Anfangskonzentration ausschließen zu können, wurde eine Inkubation unter obigen Bedingungen, mit Ausnahme eines Mediumswechsels nach 2 Stunden durchgeführt. Bei diesen Zellen konnten keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen werden und auch unter dem Mikroskop konnten keine Unterschiede zwischen hohen und niedrigen Konzentrationen, sowie der Kontrolle festgestellt werden.

10.2.2 Butendial in vitro

Den ersten Schritt in der Metabolisierung des Furans untersuchte Thomas Schneider im Rahmen seiner Diplomarbeit. Er ermittelte die Zytotoxizität von Butendial, dem wichtigsten Phase I Metaboliten des Furans, an Rattenhepatomzellen H4IIE und Primären Rattenhepatozyten.

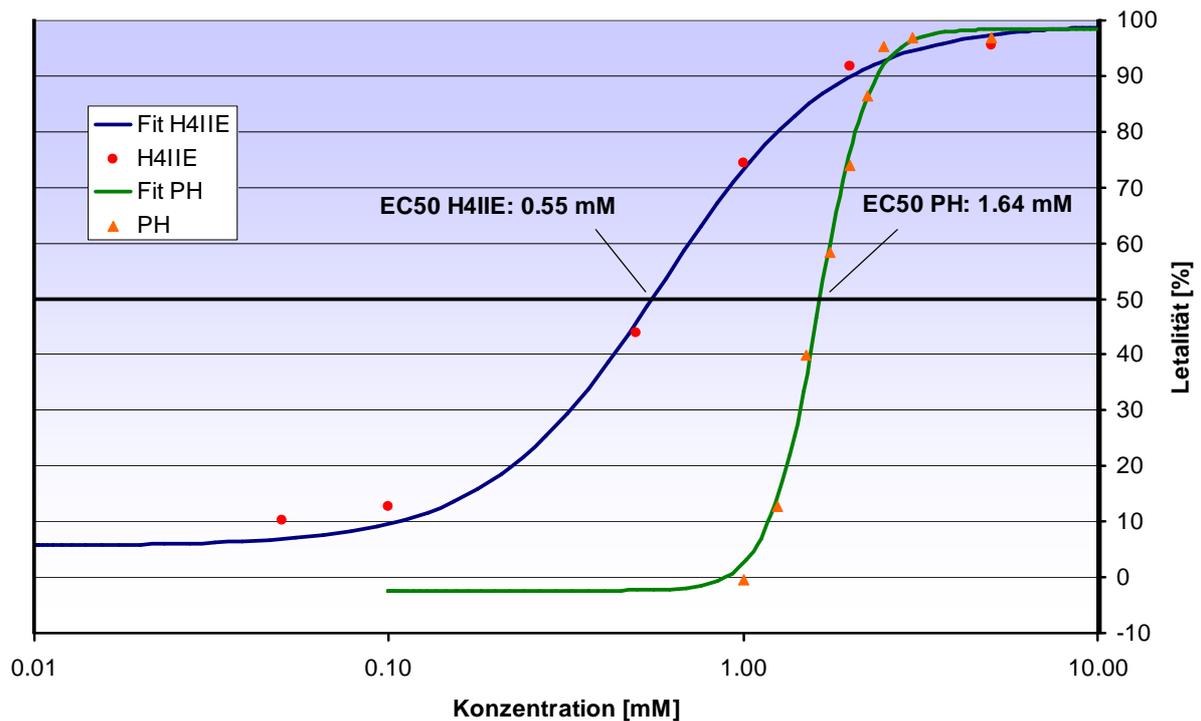


Abb. 30: Bestimmung der zytotoxischen EC₅₀ von BDA für H4IIE und Primäre Hepatozyten

Aus diesen Daten wurde mittels einer sigmoidalen Regression der EC₅₀ für die beiden Zelltypen berechnet. Es ergab sich ein EC₅₀ von 0,55 mM für die H4IIE und von 1,64 mM für die Primären Hepatozyten.

10.2.3 Butendial-GSH-Addukte

Der nächste wichtige Schritt in der Metabolisierung des Furans bzw. Butendials war dann die Konjugation. Hier wurde der Einfluss von Butendial-Glutathion-Addukten (BDA-GSH-Add) auf lebende Zellen getestet.

Als Testlösung diente ein Reaktionsansatz von BDA mit einem 10-fachen Überschuss von GSH. Nach der Reaktionszeit von einer Stunde bei

Raumtemperatur wurden die Inkubationslösungen auf 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 und 0,4 mM BDA in bidestilliertem Wasser eingestellt. Der Zytotoxizitätstest zeigte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit für diese Lösungen.

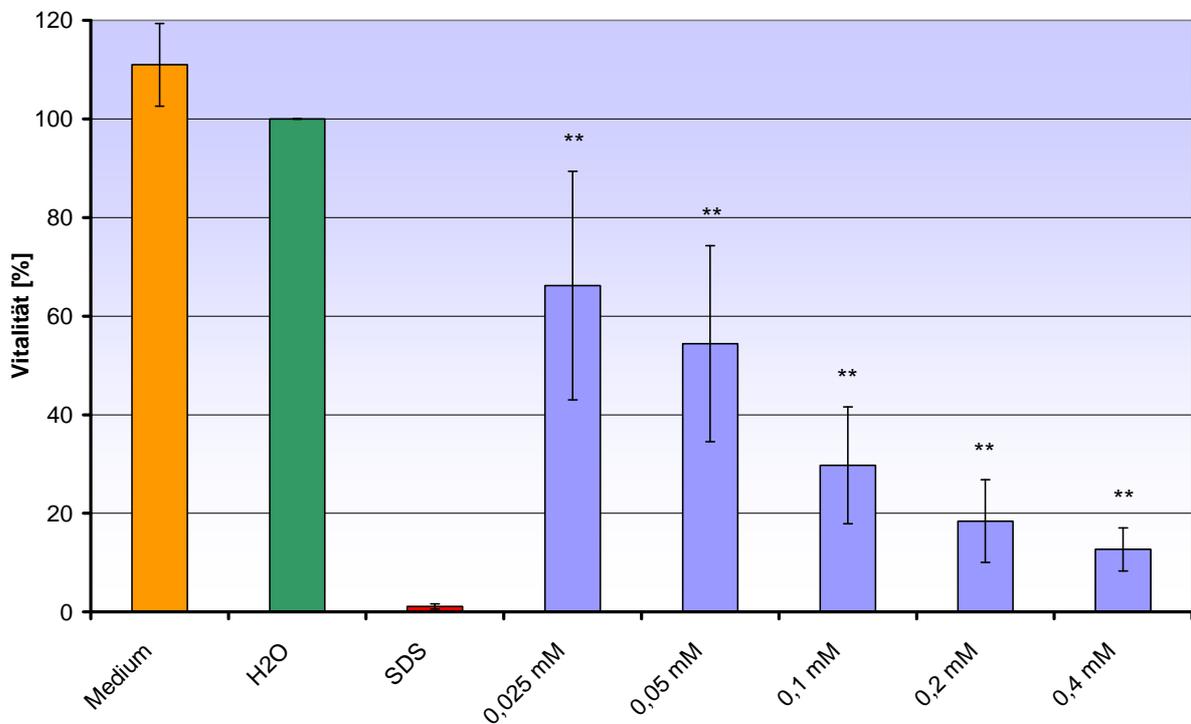


Abb. 31: Zytotoxizität eines BDA-GSH-Gemisches im Reaktionsverhältnis 1:10 an HepG2 (n=8)

Zur Kontrolle wurde eine Inkubation mit reinem bidest. H₂O und eine Mediumskontrolle mit geführt. Definiert man die Lösungsmittelkontrolle als 100% so zeigten die mit GSH-Butendial-Addukten inkubierten HepG2-Zellen geringere Vitalitäten. Während bei der niedrigsten Adduktkonzentration von 0,025 mM eine Vitalität von $77,71\% \pm 23,82\%$ festgestellt werden konnte, lag die der höchsten Konzentration 0,4 mM nur bei $12,29\% \pm 3,20\%$. Auch dazwischen war deutlich zu erkennen, dass die Abnahme der Vitalität mit der Adduktkonzentration korrelierte. Ein ca. 50-prozentiger Effekt (genau $54,50\% \pm 19,8\%$) konnte bei 0,05 mM festgestellt werden.

Um sicher zu gehen, dass dieser Effekt nicht auf das im Überschuss vorhandene GSH zurückzuführen war, wurde dieses entsprechend den vorangegangenen Konzentrationen getestet. Es zeigte sich, dass die in den Reaktionen eingesetzten

Mengen des GSH keine signifikanten Einflüsse auf die Zellvitalitäten hatten. Selbst für die höchste eingesetzte Konzentration von 4 mM konnte bei keiner Messung eine Vitalität unter 85% nachgewiesen werden.

Nachdem so ein Orientierungswert für die Toxizität ermittelt war, wurde der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf diesen Effekt bestimmt. Dazu wurden zum Vergleich fünf verschiedene Ansätze mit Verhältnissen von 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; 1:10 *cis*-2-Buten-1,4-dial zu GSH erstellt. Diese wurden bei gleicher Adduktkonzentration von 0,05 mM auf ihre Zytotoxizität überprüft. Es wurde angenommen, dass das Butendial vollständig umgesetzt wurde und somit die Gesamtkonzentration aller entstandenen Addukte der des eingesetzten BDA entspricht.

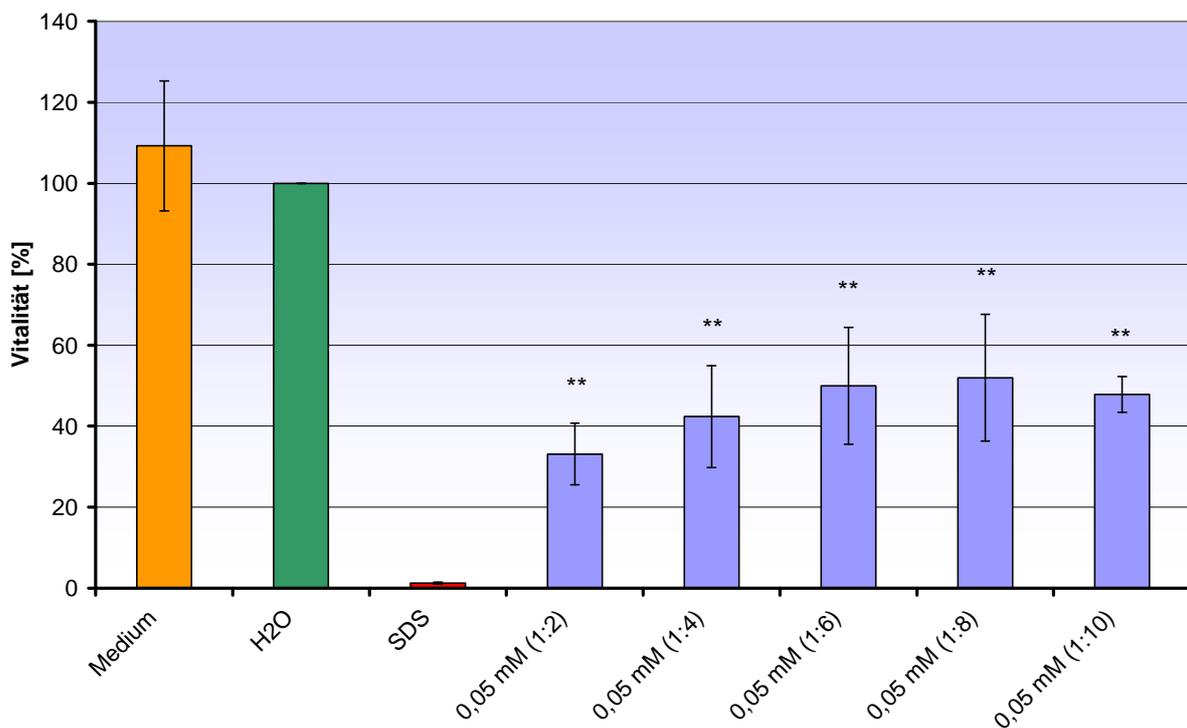


Abb. 32: Vergleich des zytotoxischen Effektes unterschiedlicher Reaktionsansätze auf HepG2 (n=4)

Für die so erhaltenen Reaktionsansätze konnte durchweg eine signifikante Reduktion der Zellvitalität festgestellt werden. Mit 47,84% \pm 4,45% konnte auch der vorher ermittelte Wert für den Ansatz 1:10 bestätigt werden. Zwischen den Ansätzen von 1:2 bis hin zu 1:6 ließ sich deutlich eine Steigerung der Vitalität

beobachten. Bei lediglich doppeltem GSH-Überschuss konnten nur $33,10\% \pm 7,6\%$ der Zellen überleben, wohingegen ein 6-facher Überschuss immerhin für $49,97\% \pm 14,44\%$ der Zellen zum Überleben reichten. Mit 8-fachem Überschuss ist mit $51,94\% \pm 15,64\%$ keine so deutliche Steigerung mehr zu beobachten.

Um eingrenzen zu können, auf welche Substanzen diese Effekte zurückzuführen waren, wurde eine Analyse der Reaktionsgemische durchgeführt. Die vorgefundenen Moleküle, die auf BDA und GSH-Verbindungen zurückgeführt wurden, sind in Abbildung 33 dargestellt. Wie man sieht bildeten dabei ein, zwei oder drei Butendial-Moleküle eine Brücke für wiederum ein bis drei GSH-Moleküle. Darauf beziehen sich im Folgenden die Bezeichnungen für die Verbindungen.

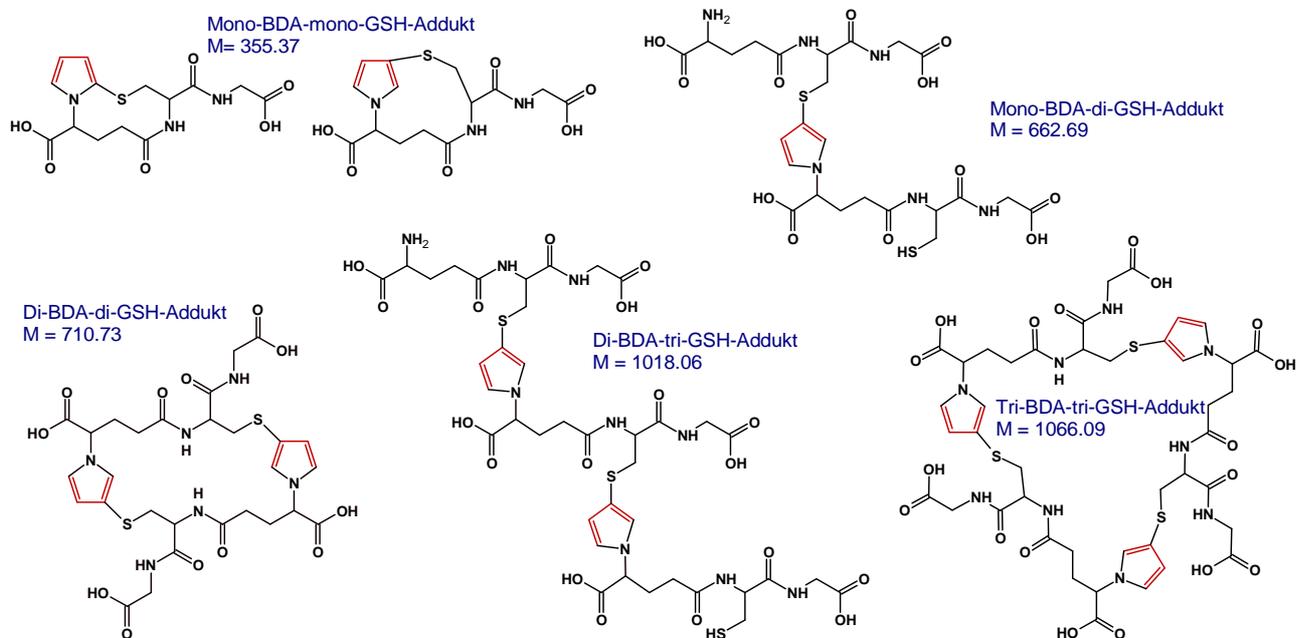


Abb. 33: In den Reaktionsgemischen durch HPLC-MS-MS nachgewiesene Verbindungen zwischen Butendial und Glutathion

Im Chromatogramm (siehe Abbildung 34) ließen sich diese Verbindungen bis auf wenige Ausnahmen zeitlich trennen. Oft konnten sie schon aufgrund ihrer Masse zugeordnet werden, spätestens jedoch nach Isolierung der vorkommenden Massen und Fragmentierung konnte die Struktur der Moleküle ermittelt werden.

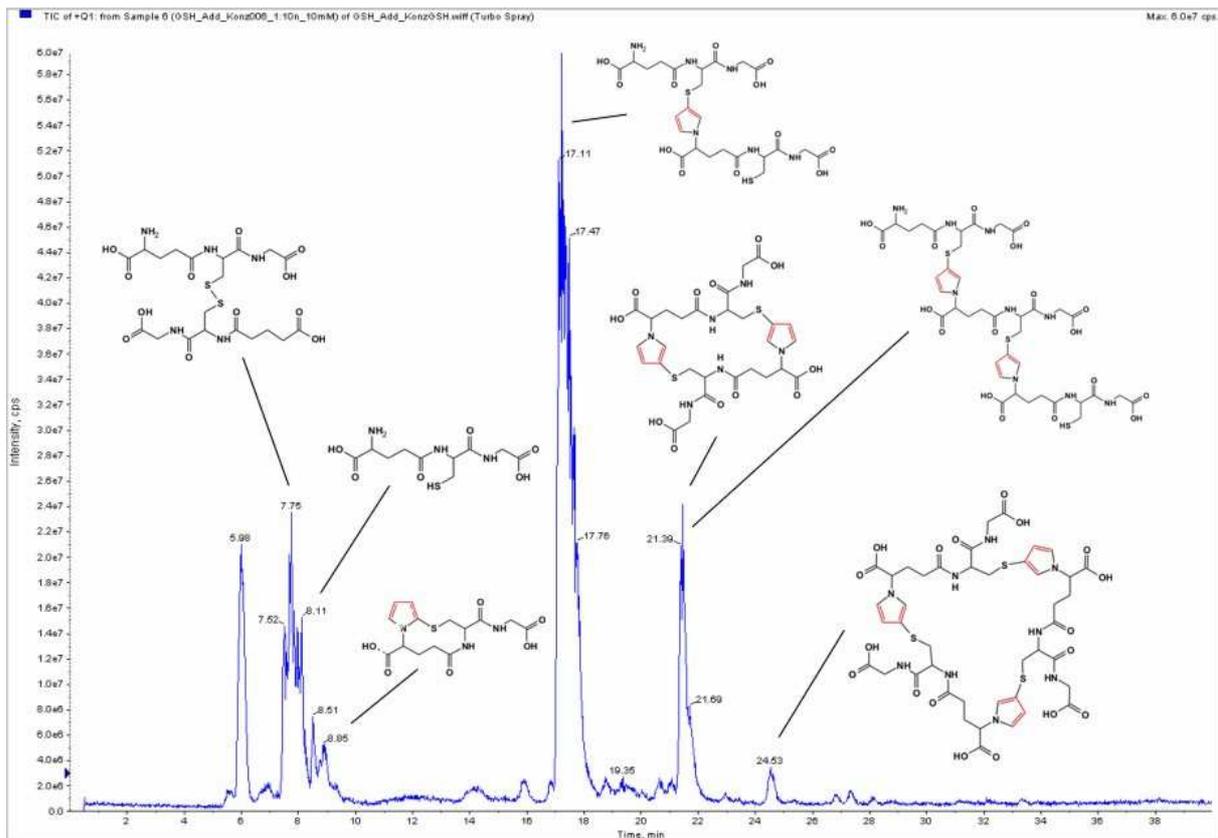


Abb. 34: Chromatogramm des Reaktionsansatzes von BDA mit GSH im Verhältnis 1:10

Im Reaktionsansatzes 1:10 ging als Hauptprodukt das Mono-BDA-bi-GSH-Addukt mit einem Masse/ Ladungsverhältnis von 663 ($[M+H]^+$; R_T ca. 17 min) hervor. Wie in allen Spektren konnten auch hier hohe Intensitäten der m/z -Verhältnisse 308 (R_T ca. 8 min) und 613 (R_T ca. 7,8 min) festgestellt werden. Diese konnten den Molekülonen von GSH selbst ($M= 307,3$) und seiner oxidierten Form GSSG ($M= 612,6$) zugeordnet werden. Weitere gefundene Verbindungen waren das Mono-BDA-Mono-GSH mit m/z 356 (R_T ca. 8,7 min), die beiden Bi-BDA-Addukte mit m/z 711 bzw. 1019 gemeinsam mit einer Retentionszeit von 21,4 Minuten und letztendlich das Tri-BDA mit m/z 1067 nach weiteren 3 Minuten (R_T ca. 24,5 min).

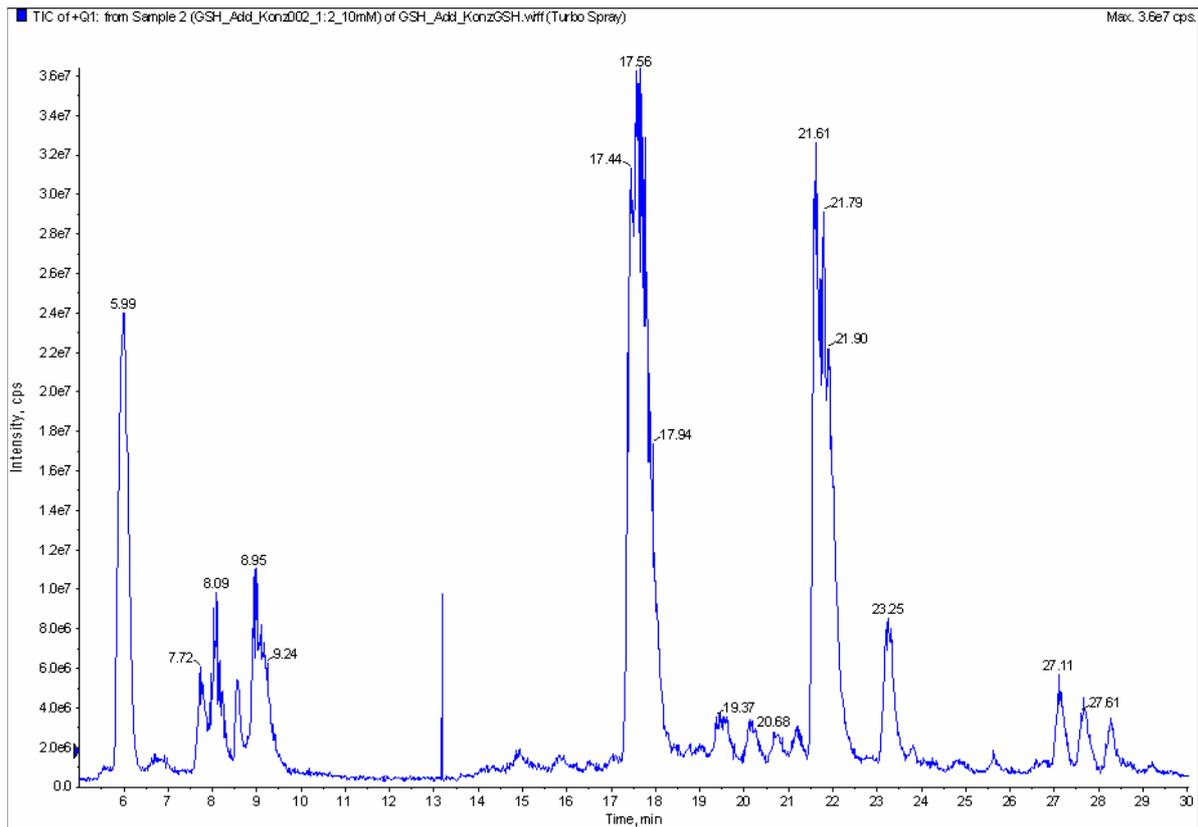


Abb. 35: Chromatogramm des Reaktionsansatzes von BDA mit GSH im Verhältnis 1:2

Vergleicht man die Chromatogramme der Reaktionen von BDA mit GSH in den Verhältnissen 1:10 und 1:2, so fiel zunächst die deutlich geringere Intensität in letzterem auf. Erreichte das Mono-BDA-bi-GSH im ersten Chromatogramm (Abbildung 34) noch eine maximale Intensität von $6 \cdot 10^7$ counts per second (cps) so wurden im zweiten (Abbildung 35) zur vergleichbaren Zeit von 17 Minuten nur noch maximal $3,6 \cdot 10^7$ cps erreicht. Auch die Peakbasis ist deutlich schmaler, so dass man für dieses Produkt etwa von einer Halbierung der Menge ausgehen konnte. Gleichzeitig war eine drei- bis vierfache Zunahme der höhermolekularen Verbindungen bei 22 bzw. 23 Minuten zu verzeichnen. Beim entstehenden Mono-mono-Produkt (R_T ca. 9 min) konnte eine Verdopplung beobachtet werden und die Eduktmenge (R_T ca. 8 min) nahm deutlich ab.

Um nun die zytotoxischen Effekte genauer zuordnen zu können sollten die entstandenen Produkte mit Hilfe einer preparativen HPLC isoliert werden. Die Methodik der HPLC-MS/MS wurde absichtlich möglichst genau übernommen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Es stellte sich heraus, dass die

Produktmenge aus einem HPLC-Lauf für die Zellversuche bei weitem nicht ausreichte, daher wurden 5 Reaktionsansätze (1:10 BDA zu GSH) nacheinander aufgetrennt und die aufgefangenen Fraktionen anschließend vereint. Wie man in Abbildung 36 gut sehen kann konnten acht unterschiedliche Fraktionen getrennt werden.

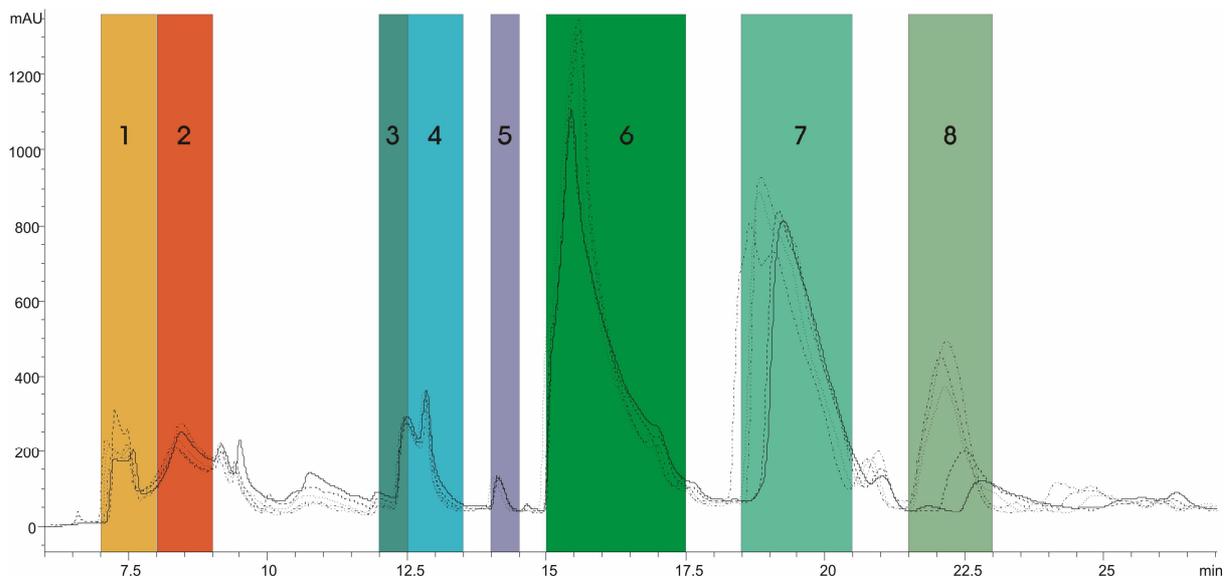


Abb. 36: Trennung der BDA-GSH-Produkte in einzelne Fraktionen

Die systembedingt unterschiedlichen Voraussetzungen der analytischen und der preparativen HPLC ließen eine direkte Zuordnung nicht zu. Gerade am Anfang des Chromatogramms war eine Zuordnung schwierig, so dass die ersten in Tabelle 13 angegebenen Verbindungen nur aufgrund der Reihenfolge dem analytischen Ergebnis entsprachen. Aufgrund der Retentionszeiten konnte allerdings mit großer Wahrscheinlichkeit die Fraktion 6 dem Mono-BDA-bi-GSH, die Fraktion 7 den beiden Bi-BDA-Addukten und die Fraktion 8 dem Tri-BDA-tri-GSH zugeordnet werden.

Alle Fraktionen wurden im Vakuum soweit möglich eingeeengt und aus dem öligen Rückstand wurden die für die zytotoxischen Untersuchungen benötigten Konzentrationsreihen hergestellt. Wie man in Tabelle 13 sieht war die Ausbeute der Fraktionen drei und vier so gering und zusätzlich konnte keine klare Trennung zwischen ihnen ermittelt werden, dass sie später zu einer Probe zusammengelegt werden mussten.

Tab. 13: Resultierende Fraktionen aus der Präparativen Trennung des Gemisches aus der Reaktion von GSH und BDA

Fraktion	Ret.zeitanf [min]	Ret.zeitende [min]	Masse [m/z]	vermutete Struktur	Ausbeute [g]
1	7.0	8.0	308	GSH	0.077
2	8.0	9.0		GSSG	0.134
3	12.0	12.5			0.014
4	12.5	13.5	356	Mono-BDA-mono-GSH	0.036
3+4					0.050
5	14.0	14.5			0.009
6	15.0	16.5	663	Mono-BDA-bi-GSH	0.228
7	18.5	20.5	711 / 1018	Bi-BDA-bi/tri-GSH	0.099
8	21.5	23.0	1066	Tri-BDA-tri-GSH	0.043

Die weitere Analytik der einzelnen Fraktionen mittels NMR schlug leider fehl, da anscheinend keine ausreichend hohe Reinheit der Proben erreicht werden konnte. Im Zellkulturversuch zeigten weder die HepG2, noch die Primären Hepatozyten eine erkennbare zytotoxische Reaktion auf eine der Fraktionen. Auch mit einer Konzentration von 1 mM fiel die Vitalität nie unter 85%.

11 Diskussion

Mit einer umfassenden Studie des NTP im Jahr 1993 begann eine verstärkte Diskussion über die Risiken des Furans. Diese Untersuchung ließ jedoch noch keine Beurteilung der Lage zu, unter anderem lag dies daran, dass auch die niedrigste untersuchte Dosis von 2 mg/kg KG signifikante Effekte zeigte (NTP, 1993). Das Furan RA Projekt der EU, zu dem diese Arbeit beisteuerte, sollte genau diesen Dosisbereich unterhalb von 2 mg/kg KG untersuchen und möglichst eine Korrelation zwischen beobachteten Effekten und der verabreichten Dosis aufzeigen. Die in dieser Arbeit untersuchten makroskopisch-histologischen und mikroskopisch-zytotoxischen Effekte des Furans sollten diese Lücke im Niedrigdosis-Bereich weiter schließen.

11.1 Histologie

Als Versuchstier für die Untersuchung der organischen Beeinträchtigungen, die durch Furan verursacht werden, wurde die Ratte gewählt. Ihr Stoffwechsel ist sehr genau bekannt und dem menschlichen in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich. Besonders die hier relevante Ausstattung mit Cytochromen P450 und noch genauer dem 2E1 und dessen Metabolisierungsfähigkeiten sind bekanntermaßen mit dem des Menschen vergleichbar (Martignoni *et al.*, 2006). Die Tierhaltung wurde an der Universität Würzburg durchgeführt und richtete sich nach den Vorgaben der OECD Guideline 407, die ein gängiges und häufig eingesetztes Modell für subakute Belastungen ist. Dabei konnte bei keinem der Tiere eine Abweichung durch Krankheit oder sonstige Schwäche beobachtet werden, was zu einem Ausschluss dieses Individuums geführt hätte. Daher konnten alle 50 Tiere ihrer Dosisgruppe und ihrem Körpergewicht entsprechend behandelt werden und zum Ergebnis der Untersuchung beitragen (OECD, 1995; Okazaki *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2006).

Die Leber der Ratte stellte bei der Dispositionsstudie von Burka das wichtigste Zielorgan für den Verbleib von Furan in den untersuchten Ratten dar. Auch die in mehreren Studien beobachteten Karzinome fanden sich hier, daher wurde dieses Organ als das Ziel der pathologischen Untersuchungen im Projekt gewählt (Burka *et al.*, 1991; Maronpot *et al.*, 1991; NTP, 1993).

Die Aufteilung der Leber in die einzelnen Schnitte erfolgte nach dem Plan der Arbeitsgruppe Dekant, die auch die Leitung der Tiersektion übernahm. Durch die im Plan (siehe Abbildung 13) vorgesehene feste Einteilung der Proben und die Durchführung in festen Teams konnte eine sehr hohe Homogenität der Schnitte erzielt werden. Dies stellte die im Verlauf wichtige Vergleichbarkeit von Dosisgruppe und Kontrollgruppe sicher.

Die für die Parafineinbettung bestimmten Leberteile konnten direkt in Formalinlösung fixiert werden und so eine gute, gleichmäßige Konservierung erhalten. Diese zeitnahe Aufarbeitung ermöglichte letztendlich auch, aus den Formalinproben wieder Material für die Antikörperfärbung zu gewinnen. Die Schritte der Aufarbeitung mit den einzelnen Entwässerungs- und Paraffinierungsschritten wurde zuvor an anderen Leberproben in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Gauer vom „Pathologischen Institut Kaiserslautern“ optimiert, und die in den Methoden erläuterte Vorgehensweise stellte sich unter gegebenen Bedingungen als am effektivsten heraus. Mit der erreichten Durchtränkung der Proben konnten Schnittdicken von bis minimal 2 μm erzielt werden, was die Erkennbarkeit von Artefakten gegenüber Läsionen vereinfachte und somit die spätere Auswertung erleichterte. In den Abbildungen 19 - 22 kann man keine sich überlappenden Kerne erkennen, was ein Zeichen für sich überlagernde Zellschichten wäre.

Zur Kontrastierung wurde die H&E-Färbung gewählt, die eine Standardfärbung in der Pathologie darstellt und sich zur Identifizierung von zellulären Veränderungen an Kernen und Membranen eignete. Nach erfolgreichem Testen der in den Methoden beschriebenen Vorgehensweise stellte sie sich als leicht zu handhaben und gut reproduzierbar heraus. Die gelegentlich schwächere Färbung der Kerne spielte bei der Betrachtung der Schnitte unter dem Mikroskop keine entscheidende Rolle. Die Lage zueinander konnte immer bestimmt und so relevante Ansammlungen oder Streuungen erkannt werden.

In Abbildung 19 a und b ist eine solche Ansammlung in Nachbarschaft zu einem Gallengang zu erkennen. Zum Vergleich kann man Abbildung 22 heranziehen, die die übliche gleichmäßige Verteilung der Zellkerne rund um die Lumen im Periportalfeld zeigt. Diese Veränderung beruhte jedoch nicht auf dem Einfluss von Furan, da dieses Tier der Kontrollgruppe angehörte. Ein vermehrtes Vorkommen in den Dosisgruppen wäre nach den Ergebnissen von Sirica und Elmore allerdings

zu erwarten gewesen, konnten aber nicht bestätigt werden. Die durch die Randomisierung wahllos betrachteten Objekte konnten in keinem Fall einer Dosisgruppe korrekt zugeordnet werden. Dies wurde für eine reduzierte Probenzahl auch von den Pathologen Frau Dr. Gröters und Herrn Dr. Gauer bestätigt (Elmore and Sirica, 1993; Sirica, 1996).

Es wäre jedoch möglich gewesen, dass sich eine Hyperplasie erst anbahnte und im pathologischen Bild noch nicht ausgeprägt war. Dies hätte aber bereits eine Proliferation vieler Zellen auf kleinem Raum vorausgesetzt. Um diese erkennen zu können wurde die immunologische Färbung des Proliferating Cell Nuclear Antigens gewählt. Mit dieser ließen sich proliferierende Zellkerne anfärben und dies sogar aus den bereits fixierten Proben. Das hatte den Vorteil, dass ein und derselbe Bereich, z.B. ein bestimmtes Periportalfeld, mit H&E- wie auch mit PCNA-Färbung untersucht werden konnte. Die Vorgehensweise wurde auch vorher schon mehrfach erfolgreich an älteren Paraffinproben angewendet und konnte auch hier mit der in den Methoden beschriebenen Antigen Reaktivierung über Citrat erfolgreich angewandt werden (Greenwell *et al.*, 1993; Dietrich *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 2003).

Auf diese Weise konnten erhöhte Zelldichten in proliferierendes (z.B in Abbildung 20 b und d) und in nicht-proliferierendes Gewebe, wie in Abbildung 19 eingeteilt werden. Nahm man nun das Beispiel oben mit der Ansammlung von Epithelzellen, ohne eine deutlich erkennbare Proliferation, hätte es sich um ein abheilendes Granulom handeln können, das z.B. aus den Einschluss eines endogenen oder exogenen Fremdkörpers entstand. Monozyten sind in dieses Gewebe eingedrungen und haben diese Noxe eingeschlossen. In der Abbildung 19 a und b zeigten sich Epitheloidzellen mit dem gebogenen Zellkern links des Gallengangs nach der Umwandlung aus Makrophagen. Dies stellt eine abheilende Läsion dar, die keine präneoplastische Veränderung ist.

Ganz anders war die Lage in Abbildung 20 einzuschätzen, da hier die erhöhte Zellkerndichte in a und b mit einer, aus der PCNA-Anfärbung in c und d hervorgehenden, deutlich gesteigerten Proliferation des Gewebes einherging. Dieser Befund hätte schon eher auf eine sich anbahnende ernsthafte Beeinträchtigung in Form von Fibrosen bis hin zu Carzinomen hindeuten können, zumal sich 3 weitere Stellen in der Leber dieses Tieres fanden. Hier könnte man durchaus auf einen Zusammenhang mit Furan schließen, hätte es sich nicht auch

hier zufälligerweise um ein Tier der Kontrollgruppe gehandelt. So aber musste diese Disregulierung des Zellwachstums eine andere unbekannte Ursache haben. Bei weiteren gefundenen Läsionen handelte es sich um einzelne Apoptosen und vereinzelt Zonen mit hypertrophen Zellen. Hinweise auf Vorstadien von Krebs, wie sie in der Zusammenfassung von Namara zu sehen sind, die sich auch mit der Ausbildung von Cholangiokarzinomen beschäftigte, waren bis auf das bereits angesprochene Tier, nicht zu finden (Narama *et al.*, 2003).

Eine statistische Auswertung der aufgetretenen Änderungen war somit obsolet, da hierfür zumindest eine Häufung in einer behandelten Probe nötig gewesen wäre. Diese konnte jedoch nirgends gefunden werden, womit schon eine Vergleichsgrundlage fehlte.

Auch das in einem BrdU-behandelten Tier beobachtete gesteigerte Zellwachstum im Randzonenbereich der Leber konnte hier nicht bestätigt werden. Die PCNA-Färbung, wie in Abbildung 23 zu sehen, zeigte keinen Unterschied zum dahinter liegenden Gewebe. Wie neuere Studien zeigen, könnte dies daran liegen, dass es sich bei diesen Randzonen um direkt am Magen anliegende subkapsuläre Bereiche handeln muss. Eventuell bestand bei den gewählten Schnitten des Caudalen und linken Leberlappens bereits ein zu großer Abstand zum Magen (Mally *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2010).

Aus den gemachten Erfahrungen und Beobachtungen lässt sich schließen, dass die angewandte Methode grundsätzlich zum Auffinden von proliferierendem Gewebe, wie in Abbildung 20 erfolgt, geeignet war. Es konnte jedoch absolut kein Zusammenhang mit der Furandosis gefunden werden. Sieht man sich die bereits durchgeführten Studien zur Bildung von Cholangiocarcinomen in Ratten genauer an, so stellt man schnell fest, dass stets eine deutlich höhere Dosis als 2 mg/kg KG angewendet wurde. Meist lag diese sogar über 8 mg/kg KG über mehrere Tage bzw. über 30 mg/kg KG für eine Einzeldosis. Man kann also davon ausgehen, dass diese höchste Dosis von 2 mg/kg KG für eine subakute Studie nicht ausreichte. Zumindest hätte eine weitere Gruppe mit deutlich höherer Dosis bessere Vergleichsmöglichkeiten gegeben (Maronpot *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1992; Sirica, 1996; Narama *et al.*, 2003; Hickling *et al.*, 2010; McDaniel *et al.*, 2012).

Alternativ dazu wäre eine deutlich längere Behandlungsdauer zumindest als subchronische oder gar chronische Studie vonnöten gewesen, um im

untersuchten Dosisbereich eine besser abgesicherte Aussage treffen zu können. So konnte man aus den gewonnenen Ergebnissen nur schließen, dass Furan im untersuchten Dosisbereich nach 28 Tagen zu keinen pathologisch erkennbaren Schäden in der Leber führte. Die Proliferation von Hepatozyten oder Epithelgewebe konnte durch immunohistologische PCNA-Färbung zusätzlich ausgeschlossen werden.

11.2 Zellkultur

Im zweiten Teil des Furan RA-Projektes sollte der Einfluss von Furan auf Leberzellen mit Hilfe einfacher zytotoxischer Methoden durchgeführt werden. Dass diese Untersuchungen letztendlich doch nicht so einfach waren, konnte man sich schon bei Betrachtung der physikalischen Daten des Furans klar machen. Mit seinem sehr niedrigen Siedepunkt und einem Dampfdruck, der noch mal 70 hPa höher ist, als der vom als sehr flüchtig bekannten Diethylether, deuteten sich Probleme in der Zellkultur bereits an.

Daher überraschte es auch wenig, dass eine Inkubation unter Standardbedingungen, also in Petrischalen bzw. Wellplatten zu keinem Ergebnis führte. Aus den später durchgeführten Berechnungen der Konzentrationen im geschlossenen Gefäß (siehe Abbildung 29) konnte man folgern, dass die Konzentration in den offenen Gefäßen bereits nach wenigen Minuten auf Null gesunken sein muss. Begünstigt wurde dies mit Sicherheit noch durch die Luftzirkulation und den Luftaustausch im Inkubator. Daher wurden diese offenen Versuche auch nur anfänglich durchgeführt.

Die Inkubation in geschlossenen Petrischalen stellte sich ebenfalls als problematisch heraus, da der eingeschlossene Luftraum für die Zellen offensichtlich nicht für längere Zeit ausreichte. Damit war nicht unbedingt zu rechnen, da die Sauerstoffversorgung der Leber auch unter regulären Bedingungen geringer ist als im Großteil des Körpers. Dies wird innerhalb der Leber noch gesteigert durch einen deutlichen Sauerstoffgradienten entlang der Sinusoide. Daher sind Hepatozyten durchaus an hypoxische Bedingungen angepasst und können diesen über einige Stunden sogar entgegenwirken (Jungermann, 1988; Katz, 1992; Rosser *et al.*, 1998).

Die Zellen in den durchgeführten Versuchen in geschlossenen Petirschalen und Well-Platten zeigten jedoch auch ohne Einfluss jeglicher Testsubstanzen schon nach kurzer Zeit die typischen Anzeichen für Sauerstoffmangel mit einhergehender Anreicherung des Kohlendioxids. Dies ging bis hin zum Zelltod, was natürlich für die vorgesehenen Untersuchungen, und sei es auch nur in geringem Umfang, absolut inakzeptabel war.

Hinzu kam noch ein weiterer Punkt, der für die hier durchgeführte metabolismusabhängige Studie von großer Bedeutung war. Es ist bekannt, dass die Sauerstoffsättigung durchaus bedeutende Effekte auf die Aktivität der CYP-Enzyme hat. Sinkt sie zu stark, nimmt auch deren metabolische Aktivität deutlich ab. Dies hat dann zur Konsequenz, dass sich auch andere Metabolite und Reaktionswege ergeben (Costa and Trudell, 1989; Maier *et al.*, 1994).

Daher war ein ausreichend groß dimensionierter Gasraum Voraussetzung für die realitätsnahe Durchführung der Tests. Gleichzeitig mussten natürlich die Bedingungen in der Zellkultur eingehalten werden. Vor allem zu nennen wäre da Sterilisation, Handhabbarkeit besonders unter zeitlichen Gesichtspunkten, Gasdichte auch im Brutschrank und Auswertbarkeit der Probe. Mit den in den Ergebnissen vorgestellten Biogefäßen (siehe Abbildung 24) war eine Inkubation über 48 Stunden ohne erkennbare zytotoxische Effekte für die Zelltypen H4IIE, HepG2 und die Primären Hepatozyten möglich. Dies galt jedoch nicht für andere getestete Zellen, wie die transfizierten CYP2E1-überexprimierenden HepG2-E47-Zellen und die indifferenten HepaRG-Zellen. Diese Beobachtung kann durchaus in der höheren CYP2E1-Ausstattung dieser Zellen begründet sein. Sie waren von vorn herein sensibler und anfälliger für oxidativ bedingten Stress. Außerdem stieg auch der Sauerstoffbedarf im entsprechenden Zellkulturmodell, da dieses Enzym für den oxidativen Metabolismus zuständig war. Dies sollte auch für die Primären Hepatozyten gelten. In diesen noch vorhandene Schutzmechanismen gegen zu hohen Sauerstoffverbrauch kamen hier jedoch wahrscheinlich zum Tragen (Jimenez-Lopez and Cederbaum, 2005; Zhuge and Cederbaum, 2006; Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 2008; Wu and Cederbaum, 2008; LeCluyse *et al.*, 2012).

Da dieser Gasraum für die doppelte Inkubationszeit (48 Stunden) ausreichend war, konnte davon ausgegangen werden, dass auch die oben angesprochene Beeinträchtigung des oxidativen Metabolismus in der Versuchszeit nicht

beeinträchtigt war. Eine genauere Kontrolle des O₂-Status während der Inkubation war nicht verfügbar, wäre aber für kommende Studien zu überlegen. Wahrscheinlich könnten dann auch die gelegentlich aufgetretenen aziden Medien erklärt werden, da dieses Phänomen wohl auf eine ungewöhnlich hohe Atmung der Zellen zurückzuführen sein dürfte.

Der für die Zellen benötigte große Gasraum stellte für die Inkubation mit Furan eine weitere Herausforderung dar. Das größere Volumen erforderte auch eine größere Menge Furan, die sich im Gasraum verteilte. Die Gabe von reinem Furan direkt in den Gasraum ergab keine reproduzierbaren Konzentrationen im Medium. Allein der Umgang mit ungelöstem Furan bildete dabei schon eine große Fehlerquelle, daher wurde in Folge nur noch eine gekühlte DMSO-Lösung verwendet. Im Vergleich mit Wasser war diese deutlich besser mischbar und es konnten die benötigten hohen Stammlösungskonzentrationen erstellt werden (siehe auch Furan Eigenschaften). Zusätzlich ließ sie sich verlustfrei pipettieren und mit Medium mischen. Allerdings wurde die maximale Furan-Konzentration durch diese Verdünnung auf höchstens 32 mM im Inkubationsmedium begrenzt, da sonst eine für die Zellen kritische DMSO-Konzentration von 0,5% erreicht wurde. Um dennoch auftretende toxische Effekte des DMSO vollständig ausschließen zu können, wurden stets eine Medium-, sowie eine DMSO-Kontrolle mit geführt. Sie zeigten jedoch nie bedeutende Unterschiede (Sumida *et al.*, 2011).

Die ersten Versuche mit Hepatomzelllinien zeigten jedoch eine sehr hohe Toleranz dieser gegenüber Furan. Auch bei teilweise sehr hohen Konzentrationen von ungefähr 100mM konnten keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden. Da es aber einen deutlichen Unterschied zu Primären Hepatozyten gab, musste es an der Enzymausstattung besonders des CYP2E1 liegen. Diese wurde in der Diplomarbeit von Artur Kessler untersucht. Wie man in Abbildung 26 sieht, ist für die Primären Hepatozyten im Vergleich zu den HepG2 eine mindestens doppelte so hohe Aktivität zu erkennen. Da die Umsatzrate der HepG2 mit der Zeit zudem noch deutlich stärker abfiel, könnte es sein, dass sie einer höheren Substratkonzentration (hier des 7-MFC) bedürfen, die im Niedrigdosisbereich des Furans wohl nicht erreicht wurde. Die Cyp2E1 Aktivität in Primären Hepatozyten wurde jedoch nur am Rand getestet, daher können diese Messwerte nur zur Orientierung dienen. Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit lag auf dem Vergleich

transfizierter HepG2 Zellen C34 und den CYP2E1 überexprimierenden HepG2 E47, die sich aber im geschlossenen Gasraum als nicht kultivierbar herausstellten. (Zhuge *et al.*, 2003; Wu and Cederbaum, 2008; Kessler, 2009)

CYP 2E1 ist bekanntlich der Hauptkatalysator für die Umwandlung von Furan zu seinem Metaboliten Butendiol. Es ist bekannt, dass HepG2 und auch H4IIE dieses Enzym nur in geringem Maße exprimieren. Dem wurde begegnet, indem diese Zellen transfiziert wurden, um dennoch einfach handhabbare *in vitro* Methoden zur Verfügung zu haben. Generell mag das ja auch funktionieren, in diesem speziellen Fall war es jedoch, wegen der weiter oben erklärten mangelnden Sauerstoffversorgung nicht der Fall (Moore and Weiss, 1982; Zhukov and Ingelman-Sundberg, 1997; Zhukov and Ingelman-Sundberg, 1999; Jimenez-Lopez and Cederbaum, 2005; Boysen *et al.*, 2007). Daher sollte dieses Enzym in den ursprünglichen Leberhepatomzellen H4IIE und HepG2 über Vorinkubationen induziert werden. Zum Einsatz kamen sowohl Ethanol, als auch Aceton, deren Effektivität bereits hinreichend bekannt war. Erst durch diese Maßnahme konnten auch in den H4IIE-Hepatomzellen der Ratte leichte Effekte erzeugt werden. Oberhalb einer Konzentration von 10 mM führte Furan zu signifikanten Effekten, die sich jedoch bei 30 mM als nicht Konzentrationsabhängig erwiesen (Kedderis *et al.*, 1993; McGehee *et al.*, 1994).

Ganz anders zeigten sich die Versuche mit den Primären Hepatozyten. Schon bei einer Konzentration von 4 mM zeigte sich eine hochsignifikante Halbierung der Vitalität, die sich deutlich konzentrationsabhängig verhielt. Hier hat offensichtlich die natürliche Enzymausstattung der Leberzellen für die Umwandlung des Furans in BDA gesorgt. Mit diesem Unterschied zu den Hepatomzellen konnte dann auch bestätigt werden, dass die zytotoxischen Effekte zumindest hauptsächlich auf den Metaboliten zurückzuführen waren und Furan an sich wohl keinen Zelltod in diesem Konzentrationsbereich hervorruft (Peterson *et al.*, 2000).

In Abbildung 27 sieht man auch sehr schön, dass die Kultivierung der Primären Hepatozyten in den geschlossenen Gefäßen keinen negativen Einfluss auf die Zellen hatte. Nach der Inkubationszeit zeigten die Kontrollen mit reinem Medium im geschlossenen Gasraum genau die gleichen Vitalitäten wie in der offenen Petrischale.

Trägt man die Kehrwerte der Vitalitäten als logarithmischen Graphen auf, so erhält man die Konzentration, bei der 50% der Zellen sterben. Durch den hierfür üblichen

sigmoidalen Fit wurde eine Konzentration von 3,98 mM für diesen Punkt berechnet. Dieser Wert scheint vergleichbar mit dem EC50 des Acetaminophen mit 7,6 mM, der ebenfalls in Primären Hepatozyten der Ratte und auch nach 24 Stunden ermittelt wurde. Dieser Vergleich des Acetaminophen als ein typisches Beispiel eines Lebertoxins, berücksichtigt allerdings nicht den Bezug der hier gemessenen Werte auf die Konzentrationsabsenkung im Medium. Was dieser Wert tatsächlich bedeutet wird später erörtert (Jemnitz *et al.*, 2008).

Dass die sigmoidale Kurve die 100% Letalität nicht erreicht, könnte man auf das Verfahren zurückführen, da der Resazurintest mit Zellen und Testsubstanzen interagieren kann. Die Interaktionen sollten im Vorfeld soweit möglich ausgeschlossen werden. Das war für das Furan auch möglich, für die vielen entstehenden Metabolite jedoch nicht. Die Fluoreszenz von Furanmetaboliten könnte durchaus die Messung der Resorufin-Fluoreszenz beeinflusst haben. Butendial sollte dabei jedoch keine Rolle gespielt haben, da bei den Tests mit dieser Substanz der Effekt nicht beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 30). Einzelne verbleibende vitale Zellen konnten bei der höchsten Konzentration jedoch auch in der Zählung mit Trypanblau bestätigt werden, was die Funktion des verwendeten Testsystems verifizierte (Serotec, 2003). Die bereits beobachtete Autoreduktion von Resazurin konnte durch die Positivkontrolle ausgeschlossen werden. Dennoch stellt die Auswahl des richtigen Testsystems mit höherer Komplexität des Untersuchungsobjekts eine steigende Herausforderung dar. Durch den Einsatz einer Positiv-, sowie meist mehrerer Negativkontrollen und dem Einsatz eines zweiten Kontrollsystems (Trypan Blau) konnten die Unwägbarkeiten jedoch ausgeschlossen werden (O'Brien *et al.*, 2000; McKim, 2010; Rampersad, 2012; Riss *et al.*, 2013).

Daher musste das Phänomen der ungewöhnlich langsamen Annäherung an die 100% Letalität mit Furan an sich zusammenhängen. So könnte es durchaus sein, dass die Metabolisierung bei Furanmengen unterhalb des EC50 noch ungehindert stattfindet, bei steigenden Konzentrationen jedoch ein Maximum erreicht. Dann käme es auf die Geschwindigkeit der Eliminierung der gebildeten Metabolite an, ob die Zelle überlebensfähig bleibt. Dieses Verhältnis von metabolischer Aktivierung und Abbau könnte gerade in Primären Hepatozyten recht unterschiedlich ausfallen, je nachdem wo genau sie sich entlang der Sinusoide befanden und an

welche Aufgabe (z.B. aerobe oder eher anaerobe Funktion, Metabolisierung oder Glykogenstoffwechsel) sie angepasst waren (Gebhardt *et al.*, 1998).

Eine große Rolle spielte dabei letztendlich auch der folgende Punkt. Bei den bisher angesprochenen Konzentrationen handelte es sich immer um die initialen Konzentrationen im Medium, vor der Equilibrierung mit dem Gasraum. Die Konzentration fiel aber während dieses Prozesses sehr schnell auf viel niedrigere Werte, wie man aus Abbildung 29 entnehmen kann. Dieser Abfall wurde während der Inkubation zu den drei angegebenen Zeiten kontrolliert. Mehr Zeitpunkte wären wünschenswert, jedoch konnte aus jeder Petrischalen nicht mehr als 1 ml für die Messung entnommen werden, um keine Artefakte aufgrund von Mediumsmangel zu erzeugen.

Die entnommenen Proben wurden mit der am häufigsten angewandten und von der FDA zur Furanquantifizierung empfohlenen, dort beschriebenen HS-GC-MS-Methode analysiert. Anfangs wurde deuteriertes d_4 -Furan als interner Standard verwendet, dies führte jedoch zu einer deutlich schlechteren Konstanz in den Messungen. Daher wurde der vom analytischen Projektpartner Herrn Wegener vorgeschlagene Weg einer unempfindlicheren Referenzsubstanz angewendet. Dies war möglich, da die Proben keine weitere Behandlung durchliefen und zusätzlich die Matrix in allen Proben, wie auch den Standards, identisch waren (Wenzl *et al.*, 2007; Wegener and Lopez-Sanchez, 2010).

Für die Verteilung des Furans im geschlossenen Gasraum wurde ein Zwei-Phasensystem zwischen Flüssigkeit und Gasphase angenommen. Das von Kedderis angewandte Drei-Phasenmodell wurde um den Anteil der Stoffumwandlung in den Zellen gekürzt, da dieser als hinreichend klein im Vergleich zum Furanaustausch zwischen Gas und Flüssigkeit angesehen wurde. Aus der sich so ergebenden Gleichung konnte der zeitliche Verlauf der Konzentration im Medium ermittelt werden. Es zeigt sich, dass von den initialen Konzentrationen schon nach 5 Minuten nur noch 1/7 im Medium zu finden war, die Zellen kamen also quasi gar nicht mit der berechneten Konzentration in Kontakt, vielmehr verteilte sich das Furan in kürzester Zeit von der Mediumoberfläche in den Gasraum. Dies bestätigten auch Versuche, mit denen ausgeschlossen wurde, dass lediglich diese Anfangskonzentration für den zytotoxischen Effekt verantwortlich war. Doch nach 2 Stunden konnten noch keinerlei Einflüsse auf die Vitalität beobachtet werden, auch wenn die Zellen die gesamten 24 Stunden

weiter im Gefäß ohne weitere Furaneinwirkung verbrachten. Das heißt, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf die Langzeitwirkung des Furan nach den zwei Stunden zurück zu führen waren. Zu dieser Zeit lag die Konzentration schon im Bereich von 0,25 mM und stellte sich nach spätestens 7 Stunden auf den in Abbildung 29 angegebenen Wert ein. Die jeweilige Initialkonzentration kann somit lediglich als „Titel“ für die tatsächlich einwirkende Konzentration bezeichnet werden.

Mit dieser Erkenntnis ergab sich für den EC50 ein Wert von 0,0188 mM. Das heißt aber auch, dass sich der getestete Konzentrationsbereich nicht von 2-32 mM erstreckte, sondern lediglich zwischen 0,0066 und 0,1291 mM. Unter diesen Umständen kann man sich schon eher vorstellen, dass die weiter oben angesprochene, leicht abweichende Enzymausstattung der einzelnen Zellen für Unterschiede in der Überlebensfähigkeit sorgen konnte. Bei der höchsten Konzentration konnten noch 22% der Zellen überleben, der Testbereich hätte also nach oben erweitert werden müssen, um auch die weniger anfälligen Zellen mit einzubeziehen. Dies war jedoch wegen der bereits angesprochenen Einschränkung durch das DMSO in diesem System nicht möglich. Es müsste also für die Handhabbarkeit des Furans eine andere Lösung gefunden werden.

Für den EC50 hatte dieses Ergebnis jedoch wenig Bedeutung, da sich diese Problematik in Konzentrationen oberhalb abspielte und sich dieser Wert genau mit der Testkonzentration von 4 mM initial, also 0,02 mM im Gleichgewicht ergab.

Um diese Konzentration in ihrer toxischen Wirkung einzuordnen, kann man die Modellberechnungen von Langdon heranziehen. Während sie die Grenze für zytotoxisch aktive Substanzen zwischen 3 mM und 23 mM anlegten, wurden verschiedenste Verbindungen mit einem EC50 \geq 10 μ M als lediglich moderat toxisch eingeordnet. Mit einem EC50 von 20 μ M liegt Furan also in dieser Spanne schon sehr nahe an der dort ermittelten Konzentration für hochtoxische Substanzen. Diese Werte sind jedoch keineswegs als Schwellenwerte zu verstehen. Sie dienen lediglich der Einordnung von Substanzen nach ihrem toxischen Potential (Langdon *et al.*, 2010).

Bisher beobachtete Einflüsse des Furans gehen überwiegend auf seinen Metaboliten Butendial zurück. Daher wurde dieses durch CYP 2E1 katalysierte Produkt ebenfalls an Zellen getestet. Diese Untersuchung wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von Thomas Schneider durchgeführt. Da hier die Verfügbarkeit des

Enzyms keine Rolle mehr spielte, kamen neben den Primären Hepatozyten auch Hepatomzellen zum Einsatz. Es zeigte sich für beide Zellarten eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit und es konnte ein EC50 von 1,64 mM bzw. 0,55 mM über die Dosis-Wirkungs-Kurve bestimmt werden. Der höhere Wert der Primären Hepatozyten hängt wahrscheinlich mit deren besserer Phase-II-Metabolisierung zusammen. Naturgemäß entspricht ihre Ausstattung z.B. mit der Glutathion-S-Transferase eher den Bedingungen *in vivo* und sie sind daher an xenobiotische Einflüsse besser angepasst (Wang *et al.*, 2002).

Der Vergleich zum EC50 von Furan mit 0,02 mM lässt vermuten, dass die Zytotoxizität mit der Metabolisierung abnimmt, was früheren Studien von z.B. Vu, widersprechen würde. Jedoch muss man bei diesen Versuchen beachten, dass das BDA hier von außen auf die Zellen einwirkte. Daher kann man davon ausgehen, dass ein Großteil der eingesetzten Menge gar nicht in die Zelle gelangte. Man kann sogar noch weiter gehen. Die hohe Reaktivität des BDA lässt es bereits im Zellkulturmedium spontan mit verfügbaren Elektronendonatoren reagieren. So ist davon auszugehen, dass es bereits im Medium zu vielen Adduktbildungen kommt. Diese dürften dann für die Zytotoxizität eine eher untergeordnete Rolle spielen, da das BDA seine Elektrophilie ja bereits verloren hat und mit steigender Molekülgröße die Passage der Zellmembranen erschwert wird. Der ermittelte EC50 ist also eher ein Richtwert, der die unmöglich zu ermittelnde Konzentration innerhalb der Zellen nur tendenziell widerspiegelt (Vu and Peterson, 2005).

Die Konjugation des Butendial, vorwiegend mit Glutathion, stellt den nächsten Schritt in der Metabolisierungskette des Furans dar. Diese Reaktion wird physiologisch durch die Glutathion-S-Transferase (GST) katalysiert, läuft aber bekanntermaßen auch ohne dieses Enzym in hoher Geschwindigkeit ab. Daher konnten die Ansätze von BDA mit GSH selbst bei Raumtemperatur in kürzester Zeit vollständig reagieren. In den aus der HPLC-MS resultierenden Massenspektren wurde in keinem Fall ein BDA-Rest detektiert (Boyd, 1981; Chen *et al.*, 1997).

Da Glutathion in der Leber in recht hohen Konzentrationen vorliegt, wurde auch für die Reaktionsansätze stets ein Überschuss zum BDA hergestellt. Das überschüssige GSH beeinflusste die Zellen nicht, es war natürlich in den Chromatogrammen wieder zu finden, jedoch mit einer geringeren Retentionszeit

als die Konjugate mit BDA. Zunächst wurde eine Versuchsreihe mit 10-fachem GSH-Überschuss an HepG2 Zellen getestet. Alle eingesetzten Konzentrationen bis minimal 0,025 mM zeigten sich signifikant toxisch (Abbildung 31), was nicht unbedingt zu erwarten war. Immerhin dient die Konjugation in der Leber üblicherweise zur Detoxifizierung. In neueren Studien werden aber immer häufiger gegenteilige Beobachtungen gemacht, bei denen GSH als Intermediat einer Toxifizierung auftaucht. Es kommen dabei unterschiedliche Reaktivierungsmechanismen in Frage, welcher davon für Furan zutrifft bleibt zu klären (van Bladeren, 2000; Park *et al.*, 2014).

Ein wichtiger Grund für die deutlich gesteigerte Zytotoxizität der GSH-Addukte gegenüber dem reinen BDA ist in ihrer deutlich erleichterten Verteilung zu sehen. Während das reine BDA in kürzester Zeit mit Mediumsinhaltstoffen, wie verschiedenen Aminosäuren, reagiert, ist es in seiner gebundenen Form länger stabil. So kann es über Diffusion besser verteilt werden, zusätzlich ist auch bekannt, dass für Glutathionkonjugate sehr effektive Transporter zur Verfügung stehen. Diese wirken meist in Richtung des Konzentrationsgefälles, so werden sie unter physiologischen Bedingungen in der Leber selektiv in die Gallengänge transportiert. Das erklärt die hauptsächliche Bildung von den furantypischen Cholangiokarzinomen in der Ratte. Neben dieser bevorzugten Transportrichtung findet aber auch bidirektionaler Austausch ins Blut und die Galle statt. Eine wichtige Rolle spielen dabei auch die Multi-Drug-Resistant-Transporter (MRP1 und MRP2) die beide für den Transport von Glutathionkonjugaten genutzt werden. Durch sie ist es möglich, dass sich BDA-Addukte ubiquitär im Organismus ausbreiten können. (Zaman *et al.*, 1995; Flens *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997).

Interessant war natürlich auch, durch welche Substanzen dieser toxische Effekt überhaupt hervorgerufen wurde. Daher wurde das angesetzte Reaktionsgemisch über eine HPLC aufgetrennt und die Komponenten anschließend am Massenspektrometer identifiziert. Es fand sich ein breites Spektrum von BDA-GSH-Addukten, das alle von Kellert und Chen gefundenen Varianten enthielt. Im Chromatogramm des 1:10-Ansatzes, siehe Abbildung 34, findet sich überwiegend das Mono-BDA-bis-GSH-Addukt, es können jedoch auch alle weiteren Verbindungen für den letalen Effekt an Zellen verantwortlich sein. In Abbildung 33 sind diese zusammengefasst und man sieht schön, wie das Butendial dabei meist

als Brücke zwischen zwei GSH-Molekülen fungiert. (Chen *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2008)

Zum Vergleich sieht man in Abbildung 35 das Chromatogramm des 1:2-Ansatzes. Es sind einige Unterschiede in den Produktmengen zu erkennen. Vor allem der Abfall des Hauptproduktes und der Anstieg der höhermassigen Verbindungen, sowie des Mono-BD-Mono-GSH-Adduktes fallen auf. Es macht also einen deutlichen Unterschied, ob GSH in starkem Überschuss vorhanden ist, oder lediglich in doppelter Menge. Dass sich dieser Unterschied auch an dem Effekt auf die Zellen widerspiegelt, sieht man in Abbildung 32. Mit steigender GSH-Verfügbarkeit nimmt die Zytotoxizität merklich ab. Es muss nicht weiter verwundern, dass diese Tendenz bei einem Verhältnis von 1:8 endet, da ab einer gewissen Konzentration einfach mehr als ausreichende Reaktionspartner vorliegen. Ein weiteres Erhöhen dieser ändert am Produktspektrum dann nichts mehr.

Die beobachtete Tendenz lässt jedoch darauf schließen, dass sich im 1:2-Ansatz mehr der zytotoxischen Verbindung gebildet hat. Geht man nun die Liste der Kandidaten durch, so fällt auf, dass entweder die Mono-BDA-Mono-GSH-Verbindung oder aber die Verbindungen mit 2 und mehr BDA-Brücken anteilig erhöht sind. Erstere wurde bereits im Urin von Ratten identifiziert und ist daher von besonderem Interesse. Eine weitere Eingrenzung war auf diesem Weg jedoch nicht möglich.

Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können wurden die Erfahrungen der HPLC-MS-MS auf eine präparative HPLC übertragen. Die Trennung konnte auch mit vergleichbaren Retentionszeiten eingerichtet werden, wobei die für preparative Trennung typischen Tailings auftraten. Dennoch konnten die Gruppen der BDA-GSH-Metabolite deutlich voneinander getrennt und in einzelnen Fraktionen aufgefangen werden. Die erhaltenen Proben wurden eingeeengt und sollten nach dem Wiegen analysiert werden. Die NMR-Untersuchung schlug jedoch fehl und die Proben waren bereits in den Zellkulturversuchen aufgebraucht. Die Versuche mit Konzentrationsreihen aus den einzelnen Fraktionen zeigten auch keine zytotoxischen Wirkungen. Dafür könnte es mehrere Gründe geben. Es ist durchaus möglich, dass die verantwortliche Verbindung bei der Trennung bzw. der anschließenden Aufarbeitung umgewandelt wurde. Wegen der fehlenden Analytik kann dies nicht ausgeschlossen werden. Eine Umwandlung könnte auch

durch die deutlich erhöhte Lagerzeit der Fraktionen während der Sammlung begünstigt sein. Und letztendlich führte das Eindampfen und Konzentrieren der Proben zu neuen Reaktionsbedingungen und Gleichgewichten, die eine Umwandlung begünstigen könnten.

Es bleibt also letztendlich eine signifikante Zytotoxizität der Addukte erkennbar, die deutlich an das Verhältnis von Gluthation zum BDA gekoppelt ist.

Was sagen diese Ergebnisse letztendlich über Furan aus?

Furan bildet sich bei der Erhitzung von Lebensmitteln, sowohl in der heimischen, als auch in der industriellen Zubereitung. Es kann dabei aus verschiedensten Vorgängern und bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen entstehen. In Abbildung 2 sieht man, wie weit das Spektrum der betroffenen Erzeugnisse ist, das von Gemüse über Kindernahrung bis hin zum hoch belasteten Kaffee reicht. Daher ist davon auszugehen, dass die Bevölkerung täglich mit Furan belastet wird. Die EFSA ermittelte für verschiedene europäische Länder aus den Analysen vieler unterschiedlicher Produkte eine mittlere tägliche Belastung für Erwachsene von 0,34 bis 1,23 µg/kg KG/Tag. Für Kinder wurde sogar eine Belastung von 0,23 bis 1,77 µg/kg KG/Tag berechnet (EFSA, 2010; Minorczyk *et al.*, 2011; Fromberg *et al.*, 2014).

Dies mag im Vergleich zu den in der NTP-Studie als kanzerogen ermittelten Dosen von 2 mg/kg KG sehr wenig erscheinen, berücksichtigt man allerdings die ständige Belastung, so wird ein gesundheitliches Risiko schon deutlich wahrscheinlicher. Genau dieses Risiko um und unter 2 mM sollten die histologischen und zytotoxischen Untersuchungen genauer eingrenzen.

In den histologischen Untersuchungen konnten keine Anzeichen für Gewebeveränderungen durch Furan gefunden werden. Dies heißt jedoch nicht, dass durch diese Dosen keine Schäden hervorgerufen werden können. Es kann lediglich festgestellt werden, dass eine Einwirkzeit von 28 Tagen in diesem Dosisbereich noch nicht zu Läsionen führt. Wie oben bereits erwähnt, spielt für den Menschen jedoch eher eine dauerhafte Exposition und nicht die hier untersuchte subakute Dosierung eine Rolle. Daher kann für den Niedrigdosisbereich hiermit noch keine Entwarnung für Furan gegeben werden. Auch eine neuere 2-Jahresstudie von Ding *et al.* fand eine Dosisabhängigkeit von Nekrosen und Apoptosen lediglich oberhalb von 2 mg/kg KG. Daher wäre eine

weitere Langzeitstudie in einem niedrigeren Dosisbereich von großem Interesse (Ding *et al.*, 2012).

Von der European Chemicals Agency (ECHA) wurde Furan bereits als Substanz mit hohem Risiko (substance of very high concern, SVHC) nach Artikel 57 der REACH Verordnung eingestuft. Als Aufnahmekriterium wurde die hohe Kanzerogenität genannt (ECHA, 2012).

In welcher Weise Furan an der Kanzerogenese beteiligt ist (MOA), ist auch nach neueren Untersuchungen nicht endgültig geklärt. Sicher ist, dass Furan *in vivo* zu DNA-Addukten führt und somit zumindest ein direkt genotoxisches Potential besitzt. Die bereits bekannte Bindung des elektrophilen Butendials an Proteine, Nukleoside und andere Nukleophile in der Leber konnten auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Das dieses Bestreben durch die Reaktion mit Glutathion, wie in dieser Arbeit gezeigt, nicht ganz aufgehoben wird steigert die Wahrscheinlichkeit einer Tumorinitiation jedoch weiter, da hierdurch eine Verteilung beachtlich erleichtert wird. Mit diesem Ergebnis wird die Plausibilität eines direkten genotoxischen Effektes deutlich erhöht (Liebler, 2008; Moro, 2011; Neuwirth *et al.*, 2012).

Nach diesen Daten ist eine Schwellendosis für Furan nicht zu ermitteln. Statt dessen ist eine Risikoabschätzung nach dem Prinzip des „Margin of Exposure“ (MOE) angebracht. Ein für die USA ermittelter Durchschnittswert lag bei 4000 für Erwachsene und sogar 3000 für Kinder im ersten Lebensjahr. Beide Werte liegen somit deutlich unter der von der EFSA vorgeschlagenen Grenze von 10000 für Substanzen mit geringem Risiko für die Gesundheit und es resultiert daraus ein gesteigerter Forschungsbedarf (Benford *et al.*, 2010).

Der tumorpromovierende Einfluss des Furans geht wahrscheinlich aus dessen zytotoxischen Eigenschaften hervor. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie hoch diese Zellschädigung tatsächlich ist. Nach einem *in vivo* Dosismodell wurden von Wilson *et al.* in der Leber Konzentrationen des Furans von 1,6 bis 36 μM je nach verabreichter Menge von 2-8 mg/kg KG erwartet. Mit einem EC50-Wert von 18,8 μM liegt das Ergebnis genau in dieser Spanne und belegt somit zusätzlich, dass Furan in diesem niedrigen Dosisbereich letal wirkt (Wilson *et al.*, 1992).

Es kann natürlich nicht differenziert werden, auf welchem Weg es zu den beobachteten zytotoxischen Effekten kommt. Der primäre Metabolit, Butendial, hat jedoch mit Sicherheit bedeutenden negativen Einfluss. Dieser wird durch die nur

unzulängliche Entgiftung durch Glutathion noch weiter gesteigert. Allein aufgrund dieser Tatsache kann man von einer erhöhten Verweilzeit und einer deutlich größeren Verteilung von Furanmetaboliten im Körper ausgehen. Eine direkte, wie auch indirekt genotoxische Wirkung wird dadurch gesteigert. Allerdings spielt bei letzterer die Dosis eine entscheidende Rolle, was hier z.B. am Verhältnis von Butendial zum Glutathion deutlich wurde.

Egal ob Furan nun direkt oder indirekt genotoxisch wirkt, für beide Fälle konnten Beweise gefunden werden, die eine Wirkung im Bereich der Dosis von 2 mg/kg KG und evtl. auch unterhalb nahe legen. Ob ein Schwellenwert Sinn macht, wird sich wohl erst endgültig klären lassen, wenn der Entstehungsweg von Tumoren durch Furan bekannt ist.

12 Zusammenfassung

Mit der Entdeckung von Acrylamid in Lebensmitteln und seiner krebserzeugenden Wirkung wurde der Fokus auf prozessgebildete Kontaminierungen gelenkt. Weitere hitzebedingte, kanzerogene Substanzen wurden in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln entdeckt, eine davon ist Furan. Studien an Ratten und Mäusen zeigten eindeutig seine Karzinogenität und auch weitere toxikologische Untersuchungen stützen diesen Befund. Dennoch konnte der Weg der durch Furan hervorgerufenen Krebsentstehung noch nicht aufgeklärt werden. So steht nach wie vor zur Debatte, ob es sich um eine direkt genotoxische, oder eine indirekt resultierende Bildungsform handelt.

Als Teil des europäischen Furan-RA-Projektes sollte in dieser Arbeit ein Beitrag zur Beantwortung dieser Frage geleistet werden. Speziell im Niedrigdosisbereich unter 2 mg/kg KG wurde nach Gewebsveränderungen und zytotoxischen Effekten gesucht.

Für histologische Untersuchungen der Leber wurden Ratten in drei Dosisgruppen mit 0,1 sowie 0,5 und 2,0 mg/kg KG jeweils 28 Tage lang behandelt. Neben der Kontrollgruppe zum Vergleich wurde eine weitere Gruppe mit anschließenden zwei Wochen Erholungszeit betrachtet. Die Parafinschnitte der fünf Leberlappen wurden mit Hämatoxylin-Eosin und einem PCNA-Antikörper angefärbt.

Die randomisierte Begutachtung unter dem Mikroskop ließ keine dosisbezogenen Gewebsveränderungen erkennen, und es konnten auch keine Hinweise auf krebspromovierende Proliferationen gefunden werden.

Um einen Einblick auf zellulärer Ebene zu erlangen, wurden Hepatomzellen und Primäre Hepatozyten der Ratte mit verschiedenen Furankonzentrationen inkubiert. Wegen des hohen Dampfdruckes von Furan geschah dies im dafür entwickelten, geschlossenen Gefäß, in dem sich ein Gleichgewicht zwischen dem Medium und dem ausreichend dimensionierten Gasraum einstellen konnte. Die Kontrolle der wirkenden Konzentrationen erfolgte mit Hilfe einer geeigneten Headspace-Gaschromatographie. An Primären Hepatozyten zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Furan mit einem ermittelten EC₅₀ von 0,0188 mM.

Auch die weiteren Metabolite wurden auf ihre Wirkung an Zellen getestet. Der wichtigste Phase-I-Metabolit wies dabei einen EC₅₀-Wert von 1,64 mM an

Primären Hepatozyten und 0,55 mM an H4IIE auf. Die sehr hohe Reaktivität dieses cis-1,2-Butendials deutet darauf hin, dass bereits ein Großteil im Medium abreagiert, bevor es an den Zellen wirken kann. Daher resultiert die im Vergleich zum Furan enorm hohe Wirkkonzentration.

Bei einer weiteren Metabolisierung mit Glutathion stieg die gemessene Zytotoxizität wiederum an. Das Produktgemisch dieser beiden Reaktanden zeigte bereits ab einer Gesamtkonzentration von 0,025 mM signifikante Effekte. Die physiologisch gewollte Entgiftung findet also nicht statt. Wie dieser Effekt zustande kommt konnte leider nicht genau geklärt werden. Mit steigendem Butendial-Anteil stieg die schädigende Wirkung jedoch deutlich an.

Dies zeigt unter anderem, dass eine Verarmung an Glutathion die Wirkung von Furan steigert und die Detoxifizierung mit diesem Schritt noch nicht beendet ist. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Furan an sich und zumindest einige seiner Metabolite in der Leber toxisch wirken. Das gilt auch für Konzentrationen in einem Bereich, der keinen ausreichenden Sicherheitsabstand zur möglichen täglichen Aufnahme des Menschen lässt.

Auch wenn in den histologischen Untersuchungen noch keine Hinweise auf Tumore zu erkennen waren, so deuten die Daten in vitro doch deutlich auf ein hohes Potential vor allem des Furanmetaboliten Butendial hin. In wie weit dieser zur in Ratten beobachteten Krebsentstehung beisteuert, sollte Thema weiterer Untersuchungen sein.

13 Literaturverzeichnis

- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**, 615-616.
- Akerboom, T. P., and Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* **77**, 373-382.
- Anders, M. W. (2008). Chemical toxicology of reactive intermediates formed by the glutathione-dependent bioactivation of halogen-containing compounds. *Chem Res Toxicol* **21**, 145-159.
- Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* **10**, 2-18.
- Banlunara, W., Bintvihok, A., and Kumagai, S. (2005). Immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in duckling liver fed with aflatoxin B1 and esterified glucomannan. *Toxicon* **46**, 954-957.
- Becalski, A., and Seaman, S. (2005). Furan precursors in food: a model study and development of a simple headspace method for determination of furan. *J AOAC Int* **88**, 102-106.
- Benford, D., Bolger, P. M., Carthew, P., Coulet, M., DiNovi, M., Leblanc, J. C., Renwick, A. G., Setzer, W., Schlatter, J., Smith, B., Slob, W., Williams, G., and Wildemann, T. (2010). Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. *Food Chem Toxicol* **48 Suppl 1**, S2-24.
- Bessems, J. G., and Vermeulen, N. P. (2001). Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol* **31**, 55-138.
- Boorman, G. A. (1990). *Pathology of the Fischer Rat: Reference and Atlas*. Academic Press.
- Boyd, M. R. (1981). Toxicity mediated by reactive metabolites of furans. *Adv Exp Med Biol* **136 Pt B**, 865-879.
- Boysen, G., Scarlett, C. O., Temple, B., Combs, T. P., Brooks, N. L., Borchers, C. H., and Swenberg, J. A. (2007). Identification of covalent modifications in P450 2E1 by 1,2-epoxy-3-butene in vitro. *Chem Biol Interact*.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Burka, L. T., Washburn, K. D., and Irwin, R. D. (1991). Disposition of [¹⁴C]furan in the male F344 rat. *J Toxicol Environ Health* **34**, 245-257.
- Byrns, M. C., Vu, C. C., Neidigh, J. W., Abad, J. L., Jones, R. A., and Peterson, L. A. (2006). Detection of DNA adducts derived from the reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial. *Chem Res Toxicol* **19**, 414-420.
- Carfagna, M. A., Held, S. D., and Kedderis, G. L. (1993). Furan-induced cytolethality in isolated rat hepatocytes: correspondence with in vivo dosimetry. *Toxicol Appl Pharmacol* **123**, 265-273.

- Chasseaud, L. F. (1973). The nature and distribution of enzymes catalyzing the conjugation of glutathione with foreign compounds. *Drug Metab Rev* **2**, 185-220.
- Chen, L. J., Hecht, S. S., and Peterson, L. A. (1995). Identification of cis-2-Butene-1, 4-dial as a Microsomal Metabolite of Furan. *Chemical Research in Toxicology* **8**, 903-906.
- Chen, L. J., Hecht, S. S., and Peterson, L. A. (1997). Characterization of amino acid and glutathione adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* **10**, 866-874.
- Cohen, P. A., Mak, K. M., Rosman, A. S., Kessova, I., Mishin, V. M., Koivisto, T., and Lieber, C. S. (1997). Immunohistochemical determination of hepatic cytochrome P-450E1 in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Alcohol Clin Exp Res* **21**, 1057-1062.
- Costa, A. K., and Trudell, J. R. (1989). Interaction of hypoxia and carbon tetrachloride toxicity in hepatocyte monolayers. *Exp Mol Pathol* **50**, 183-192.
- Crews, C., and Castle, L. (2007). A review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat-processed foods. *Trends in Food Science & Technology* **18**, 365-372.
- De Hoffmann, E. (1996). Tandem mass spectrometry: a primer. *Journal of mass spectrometry* **31**, 129-137.
- De Waziers, I., Garlatti, M., Bouguet, J., Beaune, P. H., and Barouki, R. (1995). Insulin down-regulates cytochrome P450 2B and 2E expression at the post-transcriptional level in the rat hepatoma cell line. *Mol Pharmacol* **47**, 474-479.
- Dekant, W., and Vamvakas, S. (2005). *Spektrum Lehrbuch: Toxikologie Eine Einführung für Chemiker, Biologen und Pharamzeuten*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- Dietrich, D. R., Candrian, R., Marsman, D. S., Popp, J. A., Kaufmann, W. K., and Swenberg, J. A. (1994). Retrospective assessment of liver cell proliferation via PCNA: a comparison with tritiated thymidine. *Cancer Lett* **79**, 45-51.
- Ding, W., Petibone, D. M., Latendresse, J. R., Pearce, M. G., Muskhelishvili, L., White, G. A., Chang, C. W., Mittelstaedt, R. A., Shaddock, J. G., McDaniel, L. P., Doerge, D. R., Morris, S. M., Bishop, M. E., Manjanatha, M. G., Aidoo, A., and Heflich, R. H. (2012). In vivo genotoxicity of furan in F344 rats at cancer bioassay doses. *Toxicol Appl Pharmacol* **261**, 164-171.
- Ding, X., and Kaminsky, L. S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 149-173.
- Druckova, A., and Marnett, L. J. (2006). Characterization of the amino acid adducts of the enedial derivative of teucrin A. *Chem Res Toxicol* **19**, 1330-1340.
- Du, L., Hoffman, S. M., and Keeney, D. S. (2004). Epidermal CYP2 family cytochromes P450. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 278-287.
- ECHA (2012). Support Document for Identification of Furan as a substance of very high concern because of its CMR Properties. *REACH Regulation*.

- EFSA (2009). Results on the monitoring of furan levels in food. *EFSA Scientific Report* **304**, 1-23.
- EFSA (2010). Update of results on the monitoring of furan levels in food. *EFSA Journal* **8**, 1702.
- EFSA (2011). Update on furan levels in food from monitoring years 2004-2010 and exposure assessment. *EFSA Journal* **9**, 2347.
- Egle, J. L., Jr., and Gochberg, B. J. (1979). Respiratory retention and acute toxicity of furan. *Am Ind Hyg Assoc J* **40**, 310-314.
- Elmore, L. W., and Sirica, A. E. (1993). "Intestinal-type" of adenocarcinoma preferentially induced in right/caudate liver lobes of rats treated with furan. *Cancer Res* **53**, 254-259.
- EPA (2001). Furan - Proposed Acute Exposure Guideline Levels, Federal Register 12/2000. U. S. Environmental Protection Agency, Office of Pollution Prevention and Toxics.
- Fan, X. (2005). Formation of furan from carbohydrates and ascorbic acid following exposure to ionizing radiation and thermal processing. *J. Agric. Food Chem* **53**, 7826-7831.
- FDA (2009). Exploratory data on furan in food. In *Washington, DC: FDA U.S. Food and Drug Administration*.
- Flens, M. J., Zaman, G. J., van der Valk, P., Izquierdo, M. A., Schroeijers, A. B., Scheffer, G. L., van der Groep, P., de Haas, M., Meijer, C. J., and Scheper, R. J. (1996). Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* **148**, 1237-1247.
- Fromberg, A., Mariotti, M. S., Pedreschi, F., Fagt, S., and Granby, K. (2014). Furan in heat processed food products including home cooked food products. *Czech J. Food Sci.* **32**, 443-448.
- Gates, L. A., Lu, D., and Peterson, L. A. (2012). Trapping of cis-2-butene-1,4-dial to measure furan metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **40**, 596-601.
- Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* **53**, 275-354.
- Gebhardt, R., Schrode, W., and Eisenmann-Tappe, I. (1998). Cellular characteristics of epithelial cell lines from juvenile rat liver: selective induction of glutamine synthetase by dexamethasone. *Cell Biol Toxicol* **14**, 55-67.
- Gill, S., Bondy, G., Lefebvre, D. E., Becalski, A., Kavanagh, M., Hou, Y., Turcotte, A. M., Barker, M., Weld, M., Vavasour, E., and Cooke, G. M. (2010). Subchronic oral toxicity study of furan in Fischer-344 rats. *Toxicol Pathol* **38**, 619-630.
- Green, E. C. (1968). *Anatomy of the Rat*. New York and London Hafner Publishing Company.
- Greenwell, A., Foley, J. F., and Maronpot, R. R. (1993). Detecting proliferating cell nuclear antigen in archival rodent tissues. *Environ Health Perspect* **101 Suppl 5**, 207-209.
- Gstraunthaler, G., and Lindl, T. (2013). *Zell-und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Guillouzo, A., and Guguen-Guillouzo, C. (2008). Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 1279-1294.
- Hickling, K. C., Hitchcock, J. M., Chipman, J. K., Hammond, T. G., and Evans, J. G. (2010). Induction and progression of cholangiofibrosis in rat liver injured by oral administration of furan. *Toxicol Pathol* **38**, 213-229.
- Holzapfel, C. W., and Williams, D. B. G. (1995). A Facile Route to 3a, 8a-Dihydrofuro [2, 3-b] benzofurans. *Tetrahedron* **51**, 8555-8564.
- Inskeep, P. B., Koga, N., Cmarik, J. L., and Guengerich, F. P. (1986). Covalent binding of 1,2-dihaloalkanes to DNA and stability of the major DNA adduct, S-[2-(N7-guanyl)ethyl]glutathione. *Cancer Res* **46**, 2839-2844.
- Ioannides, C. (1996). *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton.
- Isidorov, V. A., Zenkevich, I. G., and Ioffe, B. V. (1985). Volatile organic compounds in the atmosphere of forests. *Atmospheric Environment (1967)* **19**, 1-8.
- Jakoby (1978). The glutathion S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **46**, 383-414.
- Jemnitz, K., Veres, Z., Monostory, K., Kobori, L., and Vereczkey, L. (2008). Interspecies differences in acetaminophen sensitivity of human, rat, and mouse primary hepatocytes. *Toxicol In Vitro* **22**, 961-967.
- Jimenez-Lopez, J. M., and Cederbaum, A. I. (2005). Protein kinase C signaling as a survival pathway against CYP2E1-derived oxidative stress and toxicity in HepG2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 998-1006.
- Jungermann, K. (1988). Metabolic zonation of liver parenchyma. *Semin Liver Dis* **8**, 329-341.
- Junqueira, L. C. U., and Carneiro, J. (2005). *Histologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Katz, N. R. (1992). Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr* **122**, 843-849.
- Kedderis, G. L., Carfagna, M. A., Held, S. D., Batra, R., Murphy, J. E., and Gargas, M. L. (1993). Kinetic analysis of furan biotransformation by F-344 rats in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **123**, 274-282.
- Kellert, M., Wagner, S., Lutz, U., and Lutz, W. K. (2008). Biomarkers of furan exposure by metabolic profiling of rat urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and principal component analysis. *Chem Res Toxicol* **21**, 761-768.
- Kessler, A. (2009). Untersuchung der CYP2E1-Expression und Aktivität in humanen Hepatomzelllinien und der Furan-vermittelten Cytotoxizität. *Diplomarbeit, TU Kaiserslautern*.
- Klinke, R., Pape, H.-C., and Silbernagl, S. (2003). *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Knowles, B. B., Howe, C. C., and Aden, D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**, 497-499.

- Koob, M., and Dekant, W. (1991). Bioactivation of xenobiotics by formation of toxic glutathione conjugates. *Chem Biol Interact* **77**, 107-136.
- Kuballa, T. (2007). Furan in Kaffee und anderen Lebensmitteln. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2**, 429-433.
- Langdon, S. R., Mulgrew, J., Paolini, G. V., and van Hoorn, W. P. (2010). Predicting cytotoxicity from heterogeneous data sources with Bayesian learning. *J Cheminform* **2**, 11.
- Larson, A. M. (2007). Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* **11**, 525-548, vi.
- LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E., and Powers, M. J. (2012). Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol* **42**, 501-548.
- Lee, T. K., Li, L., and Ballatori, N. (1997). Hepatic glutathione and glutathione S-conjugate transport mechanisms. *Yale J Biol Med* **70**, 287-300.
- Lewis (2004). the human cytochrome P450. *Pharmacogenomics* **5**, 305-318.
- Liebler, D. C. (2008). Protein damage by reactive electrophiles: targets and consequences. *Chem Res Toxicol* **21**, 117-128.
- Lu, D., Sullivan, M. M., Phillips, M. B., and Peterson, L. A. (2009). Degraded protein adducts of cis-2-butene-1,4-dial are urinary and hepatocyte metabolites of furan. *Chem Res Toxicol* **22**, 997-1007.
- MacDougall, D., and Crummett, W. B. (1980). Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry* **52**, 2242-2249.
- Maier, P., Saad, B., and Schawalder, H. P. (1994). Effect of periportal- and centrilobular-equivalent oxygen tension on liver specific functions in long-term rat hepatocyte cultures. *Toxicol In Vitro* **8**, 423-435.
- Mally, A., Volkel, W., Amberg, A., Kurz, M., Wanek, P., Eder, E., Hard, G., and Dekant, W. (2005). Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of ochratoxin A to rats. *Chem Res Toxicol* **18**, 1242-1252.
- Maronpot, R. R., Giles, H. D., Dykes, D. J., and Irwin, R. D. (1991). Furan-induced hepatic cholangiocarcinomas in Fischer 344 rats. *Toxicol Pathol* **19**, 561-570.
- Martignoni, M., Groothuis, G. M., and de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**, 875-894.
- Martin, J. W., Chan, K., Mabury, S. A., and O'Brien, P. J. (2009). Bioactivation of fluorotelomer alcohols in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* **177**, 196-203.
- McDaniel, L. P., Ding, W., Dobrovolsky, V. N., Shaddock, J. G., Jr., Mittelstaedt, R. A., Doerge, D. R., and Heflich, R. H. (2012). Genotoxicity of furan in Big Blue rats. *Mutat Res* **742**, 72-78.
- McGehee, R. E., Jr., Ronis, M. J., Cowherd, R. M., Ingelman-Sundberg, M., and Badger, T. M. (1994). Characterization of cytochrome P450 2E1 induction in a rat hepatoma FGC-4 cell model by ethanol. *Biochem Pharmacol* **48**, 1823-1833.

- McKim, J. M., Jr. (2010). Building a tiered approach to in vitro predictive toxicity screening: a focus on assays with in vivo relevance. *Comb Chem High Throughput Screen* **13**, 188-206.
- Minorczyk, M., Goralczyk, K., Strucinski, P., Hernik, A., Czaja, K., Lyczewska, M., Korcz, W., Starski, A., and Ludwicki, J. K. (2011). Risk assessment for infants exposed to furan from ready-to-eat thermally processed food products in Poland. *Rocz Panstw Zakl Hig* **63**, 403-410.
- Monks, T. J., Anders, M. W., Dekant, W., Stevens, J. L., Lau, S. S., and van Bladeren, P. J. (1990). Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicol Appl Pharmacol* **106**, 1-19.
- Moore, E. E., and Weiss, M. C. (1982). Selective isolation of stable and unstable dedifferentiated variants from a rat hepatoma cell line. *J Cell Physiol* **111**, 1-8.
- Moro, S. (2011). Identification of target proteins of furan reactive metabolites in rat liver. *Dissertation*.
- Mugford, C. A., Carfagna, M. A., and Kedderis, G. L. (1997). Furan-mediated uncoupling of hepatic oxidative phosphorylation in Fischer-344 rats: an early event in cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* **144**, 1-11.
- Mutschler, E., Thews, G., Vaupel, P., and Schaible, H.-G. (2007). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Narama, I., Imaida, K., Iwata, H., Nakae, D., Nishikawa, A., and Harada, T. (2003). A Review of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Proliferative Lesions in the Liver of Rats by a Working Group of the Japanese Society of Toxicologic Pathology. *Journal of Toxicologic Pathology* **16**, 1-17.
- Neuwirth, C., Mosesso, P., Pepe, G., Fiore, M., Malfatti, M., Turteltaub, K., Dekant, W., and Mally, A. (2012). Furan carcinogenicity: DNA binding and genotoxicity of furan in rats in vivo. *Mol Nutr Food Res* **56**, 1363-1374.
- Novak, R. F., and Woodcroft, K. J. (2000). The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Arch Pharm Res* **23**, 267-282.
- NTP (1993). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Furan (CAS No. 110-00-9) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). In *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* (C. J. Alden, Ed.). NIH publication.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**, 5421-5426.
- OECD (1995). Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. In *OECD 407 Guideline for the Testing of Chemicals*.
- Okazaki, K., Okazaki, S., Nishimura, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Nakamura, A., Tsuda, T., Katsumata, T., Nishikawa, A., and Hirose, M. (2001). A repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol* **75**, 513-521.
- Park, Y. C., Lee, S., and Cho, M. H. (2014). The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be

- Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? *Toxicol Res* **30**, 179-184.
- Parmar, D., and Burka, L. T. (1993). Studies on the interaction of furan with hepatic cytochrome P-450. *J Biochem Toxicol* **8**, 1-9.
- Penzlin, H. (2005). *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Elsevier, München.
- Perez Locas, C., and Yaylayan, V. A. (2004). Origin and mechanistic pathways of formation of the parent furan--a food toxicant. *J Agric Food Chem* **52**, 6830-6836.
- Peterson, L. A. (2006). Electrophilic intermediates produced by bioactivation of furan. *Drug Metab Rev* **38**, 615-626.
- Peterson, L. A., Cummings, M. E., Chan, J. Y., Vu, C. C., and Matter, B. A. (2006). Identification of a cis-2-butene-1,4-dial-derived glutathione conjugate in the urine of furan-treated rats. *Chem Res Toxicol* **19**, 1138-1141.
- Peterson, L. A., Cummings, M. E., Vu, C. C., and Matter, B. A. (2005). Glutathione trapping to measure microsomal oxidation of furan to cis-2-butene-1,4-dial. *Drug Metab Dispos* **33**, 1453-1458.
- Peterson, L. A., Naruko, K. C., and Predecki, D. P. (2000). A reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial, is mutagenic in the Ames assay. *Chem Res Toxicol* **13**, 531-534.
- Pitot, H. C., Peraino, C., Morse, P. A., Jr., and Potter, V. R. (1964). Hepatomas in Tissue Culture Compared with Adapting Liver in Vivo. *Natl Cancer Inst Monogr* **13**, 229-245.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., Tata, V. D., and Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* **66**, 1499-1503.
- Rafter, J. J., Gustafsson, J., Bakke, J. E., Larsen, G. L., Norin, K. E., and Gustafsson, B. E. (1983). Studies on the re-establishment of the intestinal microflora in germ-free rats with special reference to the metabolism of N-isopropyl- \pm -chloroacetanilide (propachlor). *Xenobiotica* **13**, 171-178.
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* **12**, 12347-12360.
- Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug metabolism reviews* **34**, 83-448.
- Reuber, M. D. (1961). A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J Natl Cancer Inst* **26**, 891-899.
- Richling, E., and Habermeyer, M. (2014). Ist Kaffeetrinken gesund? *Chemie in unserer Zeit* **48**, 12-20.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., and Minor, L. (2013). Cell Viability Assays.
- Roempp (2009). Thieme Roempp Online.
- Rosser, D. M., Manji, M., Cooksley, H., and Bellingan, G. (1998). Endotoxin reduces maximal oxygen consumption in hepatocytes independent of any hypoxic insult. *Intensive Care Med* **24**, 725-729.

- Ruzo, L. O., Casida, J. E., and Holden, I. (1985). Direct NMR detection of an epoxyfuran intermediate in peracid oxidation of the fungicide methfuroxam. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1642-1643.
- Sauermost, R., and Freudig, D. (2002). *Lexikon der Biologie*. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg.
- Schiebler, T. H. (2005). *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, Makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Springer DE, Heidelberg.
- Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**, 29-83.
- Serotec (2003). Alamarblue Datasheet.
- Sheftel, V. O. (2000). *Indirect food additives and polymers: migration and toxicology*. CRC Press.
- Shen, L. J., Zhang, H. X., Zhang, Z. J., Li, J. Y., Chen, M. Q., Yang, W. B., and Huang, R. (2003). Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* **9**, 459-462.
- Shi, S. R., Imam, S. A., Young, L., Cote, R. J., and Taylor, C. R. (1995). Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* **43**, 193-201.
- Shin, J. H., Moon, H. J., Kang, I. H., Kim, T. S., Kim, I. Y., Park, I. S., Kim, H. S., Jeung, E. B., and Han, S. Y. (2006). Repeated 28-day oral toxicity study of ketoconazole in rats based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline No. 407" to detect endocrine effects. *Arch Toxicol* **80**, 797-803.
- Sirica, A. E. (1996). Biliary proliferation and adaptation in furan-induced rat liver injury and carcinogenesis. *Toxicol Pathol* **24**, 90-99.
- Slatter, J. G., Rashed, M. S., Pearson, P. G., Han, D. H., and Baillie, T. A. (1991). Biotransformation of methyl isocyanate in the rat. Evidence for glutathione conjugation as a major pathway of metabolism and implications for isocyanate-mediated toxicities. *Chem Res Toxicol* **4**, 157-161.
- Sumida, K., Igarashi, Y., Toritsuka, N., Matsushita, T., Abe-Tomizawa, K., Aoki, M., Urushidani, T., Yamada, H., and Ohno, Y. (2011). Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. *Hum Exp Toxicol* **30**, 1701-1709.
- Takakusa, H., Masumoto, H., Makino, C., Okazaki, O., and Sudo, K. (2009). Quantitative assessment of reactive metabolite formation using ³⁵S-labeled glutathione. *Drug Metab Pharmacokinet* **24**, 100-107.
- Tateishi, M., Suzuki, S., and Shimizu, H. (1978). Cysteine conjugate beta-lyase in rat liver. A novel enzyme catalyzing formation of thiol-containing metabolites of drugs. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 8854-8859.
- van Bladeren, P. J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* **129**, 61-76.
- Vranov, J., and Ciesarov, Z. (2009). Furan in Food—a Review. *Editorial Board* **27**, 1-10.
- Vu, C. C., and Peterson, L. A. (2005). Synthesis of a 2'-deoxyguanosine adduct of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* **18**, 1012-1017.

- Wachtler, F. (2005). *Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Facultas Verlag, Wien.
- Wang, K., Shindoh, H., Inoue, T., and Horii, I. (2002). Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. *J Toxicol Sci* **27**, 229-237.
- Wegener, J. W., and Lopez-Sanchez, P. (2010). Furan levels in fruit and vegetables juices, nutrition drinks and bakery products. *Anal Chim Acta* **672**, 55-60.
- Wenzl, T., Lachenmeier, D. W., and Gokmen, V. (2007). Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Anal Bioanal Chem* **389**, 119-137.
- Wexler, P., Anderson, B., de Peyster, A., Gad, S. C., Hakkinen, P. J. B., Kamrin, M., Locey, B., Mehendale, H. M., Pope, C., and Shugart, L. (2005). *Encyclopedia of toxicology*. Elsevier Ltd., Oxford.
- Wilson, D. M., Goldsworthy, T. L., Popp, J. A., and Butterworth, B. E. (1992). Evaluation of genotoxicity, pathological lesions, and cell proliferation in livers of rats and mice treated with furan. *Environ Mol Mutagen* **19**, 209-222.
- Wu, D., and Cederbaum, A. I. (2008). Development and properties of HepG2 cells that constitutively express CYP2E1. *Methods Mol Biol* **447**, 137-150.
- Zaman, G. J., Lankelma, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., Oude Elferink, R. P., Baas, F., and Borst, P. (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7690-7694.
- Zhuge, J., and Cederbaum, A. I. (2006). Increased toxicity by transforming growth factor-beta 1 in liver cells overexpressing CYP2E1. *Free Radic Biol Med* **41**, 1100-1112.
- Zhuge, J., Luo, Y., and Yu, Y. N. (2003). Heterologous expression of human cytochrome P450 2E1 in HepG2 cell line. *World J Gastroenterol* **9**, 2732-2736.
- Zhukov, A., and Ingelman-Sundberg, M. (1997). Selective fast degradation of cytochrome P-450 2E1 in serum-deprived hepatoma cells by a mechanism sensitive to inhibitors of vesicular transport. *Eur J Biochem* **247**, 37-43.
- Zhukov, A., and Ingelman-Sundberg, M. (1999). Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem J* **340 (Pt 2)**, 453-458.

14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

- ... Herrn Prof. Dr. Dr. Schrenk für die unbegrenzte Betreuung und Ermöglichung der Arbeiten zu dieser Dissertation. Insbesondere auch für die vielen Ratschläge und Diskussionen in diesem herausfordernden Themengebiet.
- ... Frau Prof. Dr. Richling für die Übernahme des zweiten Gutachtens und die Bereitstellung von zusätzlichen Arbeitsplätzen in ihrem Arbeitskreis.
- ... Herrn Prof. Dr. Thiel für die Durchführung des Prüfungsvorsitzes bei einem Thema, das recht fern seiner eigenen Forschung liegt.
- ... dem Arbeitskreis Dekant in Würzburg, der mich während der Dissertation herzlich in seine Reihen aufgenommen hat. Zu nennen sind besonders Hannelore für die tolle Projektorganisation, sowie Eva und Ute für die gemeinsame Zeit im Labor und darum herum.
- ... Herrn Dr. Gauer und seinem gesamten Team für seine Unterstützung bei der Methodenentwicklung und der abschließenden Beurteilung der histologischen Präparate.
- ... Frau Dr. Gröters für ihre hervorragenden Erklärungen von Läsionen und deren Einordnung, sowie ihre Betrachtung der histologischen Schnitte.
- ... Anita für ihren unersetzbaren Durchblick vor allem in organisatorischen oder finanziellen Problemen und Fragen.
- ... Moni und Wilja, die mir jederzeit mit ihrer unbegrenzten Tatkraft zur Verfügung standen und uns durch ihre viele Arbeit im Hintergrund den Rücken frei gehalten haben.
- ... dem gesamten Arbeitskreis Schrenk für die vielen kleinen oder auch größeren Hilfen im Labor und den fachlichen Diskussionen zwischendurch.
- ... dem Arbeitskreis Richling, Andreas, Aribert und Rainer für ihre technische Unterstützung vor allem an störrischen Geräten und ihren Tricks.

- ... Mathias, Peter für den Erhalt meiner Fitness und den perfekten Ausgleich zum Alltag im Labor.
- ... Hannah, Gudi, Helena und Robert für ihren Rückhalt und die vielen gemeinsam verbrachten, wunderschönen Stunden vor allem an „unseren“ Dienstagen.
- ... Luki für seine moralische Unterstützung und seine Rolle als wichtigen, ruhigen Gesprächspartner in unruhigeren Zeiten.
- ... allen anderen an der TU Kaiserslautern, die mich und meine Arbeit dort voran gebracht haben.
- ... meinen Eltern und Geschwister für ihre unbegrenzte Unterstützung und einfach nur weil sie immer da waren, auch wenn sie nicht direkt da waren.
- ... bestimmt nicht zuletzt meiner Freundin Dilyana für ihren unerschütterlichen Glauben in meine Fähigkeiten und das Ertragen von unverschuldeten Verstimmungen.

Vielen Dank!

15 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Jens Brück
Geburtsort: Koblenz
Nationalität: deutsch

Ausbildung:

- 2007-2010 Promotion an der Universität Kaiserslautern
Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie
Professor Dr. Dr. D. Schrenk

Thema "Einflüsse von niedrig dosiertem Furan auf die Leber in vivo und in vitro"
- 2006 Diplomarbeit im Studiengang Chemie
Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie
Professor Dr. Dr. D. Schrenk

Thema "AhR-Antagonisten in Faeces der Ratte"
- 1999 – 2006 Studium der Chemie
Abschluss: Diplom-Chemiker
- 1989 – 1998 Besuch des Eichendorff-Gymnasiums Koblenz
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

