

**Nachweis von oxidativem Stress in der permanenten Zelllinie  
*Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) im Zuge der Biotest-  
dirigierten Fraktionierung mariner Sedimentextrakte**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg

aus dem  
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie  
- Abteilung für Lebensmittelchemie -  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Arne Sierts-Herrmann**

aus Husum

Hamburg 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis November 2002 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, an der Universität Hamburg angefertigt.

Die finanzielle Unterstützung der Arbeit erfolgte durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung innerhalb des Verbundvorhabens „ISIS“ – Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe: Toxizitätstest-geleitete Analytik (52/F0271A-C).

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Bisping

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2003

## **Danksagungen**

Für die umfangreiche Unterstützung, die mir während meiner Promotionszeit zuteil wurde, bedanke ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart für die Überlassung des Themas, das Interesse an dieser Arbeit und die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen

Herrn Prof. Dr. B. Bisping für die Übernahme des Koreferates

dem BMBF für die Finanzierung der Arbeit

Frau Angelika Kinder für drei Jahre guter Zusammenarbeit in sehr angenehmer Atmosphäre

Frau Martina Klemm, Herrn Andreas Dausch, Herrn Ferhat Akkaya und Frau Ulrike Kersten für ihre hervorragende Unterstützung, ohne die das vorliegende Werk nicht in diesem Umfang hätte realisiert werden können

allen Mitarbeitern der Abteilung der Lebensmittelchemie

meinen Eltern für ihre vielfältige Unterstützung

Meike



## Abkürzungsverzeichnis

<b>AMT</b>	1,2,4-Aminotriazol
<b>ANTQ</b>	Anthrachinon
<b>AP-ESI-MSD</b>	atmosphere pressure- electrospray ionisation- mass selective detection
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-triphosphat
<b>ARE</b>	antioxidant-responsive element
<b>BCNU</b>	1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitroharnstoff
<b>BDF</b>	Biotest-dirigierte Fraktionierung
<b>BFA</b>	Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Institut für Fischereiökologie
<b>BG</b>	Bestimmungsgrenze
<b>BMBF</b>	Bundesministerium für Bildung und Forschung
<b>BQ</b>	Benzochinon
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>BSH</b>	Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie
<b>BSO</b>	Buthionin-Sulfoximin
<b>BW</b>	Methodenblindwert
<b>CDNB</b>	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
<b>CV</b>	Verfahrensvariationskoeffizient
<b>CYP450</b>	Cytochrom-P450
<b>DC</b>	Dicumarol
<b>DETCA</b>	Diethylcarbaminsäure
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>DTBA</b>	1,3-Diethyl-thiobarbitursäure
<b>DTNB</b>	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
<b>DW</b>	Dosis-Wirkung
<b>EPA</b>	US Environmental Protection Agency
<b>EPC</b>	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i>
<b>FAD</b>	Flavin-Adenin-Dinucleotid
<b>FKS</b>	Fötales Kälbersreum
<b>GPC</b>	Gelpermeationschromatographie
<b>GPx</b>	Glutathion-Peroxidase
<b>GR</b>	Glutathion-Reduktase
<b>GSH</b>	reduziertes Glutathion
<b>GSSG</b>	oxidiertes Glutathion
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>GSx</b>	Gesamtglutathion
<b>HF</b>	Hauptfraktion
<b>HH</b>	Hansestadt Hamburg
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>ISIS</b>	Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe

<b>KAT</b>	Katalase
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>KW</b>	Kontrollwert
<b>LC</b>	Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
<b>LDH</b>	Lactatdehydrogenase
<b>MÄ</b>	Menadion-Äquivalent
<b>MD</b>	Menadion
<b>MDA</b>	Malondialdehyd
<b>N</b>	Gesamtstickstoff
<b>NAD</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
<b>NADPH</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduzierte Form
<b>NBT</b>	Nitroblue-Tetrazolium
<b>NF</b>	Nachfraktion
<b>NG</b>	Nachweisgrenze
<b>NP</b>	Normalphase
<b>NQ</b>	Naphthochinon
<b>OC</b>	Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie
<b>PAK</b>	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
<b>PHE</b>	Phenanthren
<b>PHEQ</b>	9,10-Phenanthrenchinon
<b>PUFA</b>	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
<b>RP</b>	Umkehrphase
<b>S<sub>8</sub></b>	elementarer Schwefel
<b>SN</b>	Signifikanzniveau
<b>SOD</b>	Superoxiddisumtase
<b>SORA</b>	Superoxidradikalanion
<b>TBA</b>	Thiobarbitursäure
<b>TBAB</b>	Tetrabutylammoniumbromid
<b>TBAH</b>	Tetrabutylammoniumhydroxid
<b>TBARS</b>	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
<b>TC</b>	Gesamtkohlenstoff (total carbon)
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TIE</b>	toxicity identification evaluation
<b>TNB</b>	5-Thio-2-nitrobenzoat
<b>TOC</b>	Gesamt-organischer Kohlenstoff (total organic carbon)
<b>Trp-EDTA</b>	Trypsin-Ethylendiamintetraacetat
<b>UKE</b>	Universität Hamburg, Universitätskrankenhaus Eppendorf
<b>UTE</b>	Ultraturrax-Kaltextraktion
<b>UVD</b>	Detektion im ultravioletten Spektralbereich
<b>VF</b>	Vorfraktion
<b>WG</b>	Wassergehalt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN</b>	<b>5</b>
2.1	BIOTEST-DIRIGIERTE FRAKTIONIERUNG BDF	5
2.2	BIOLOGISCHE TESTSYSTEME	6
2.2.1	ANWENDUNG	6
2.2.2	TESTORGANISMEN	6
2.3	OXIDATIVER STRESS	8
2.4	REDOX-CYCLING	10
2.5	ENZYMATISCHE SCHUTZMECHANISMEN	11
2.5.1	SUPEROXIDDISMUTASE SOD	11
2.5.2	KATALASE KAT	12
2.5.3	GLUTATHIONPEROXIDASE GPX	12
2.5.4	GLUTATHION-S-TRANSFERASE GST	13
2.5.5	GLUTATHION-REDUKTASE GR	13
2.6	NICHT-ENZYMATISCHE SCHUTZSYSTEME	14
2.6.1	GLUTATHION GSX	14
2.7	LIPIDPEROXIDATION	15
2.8	ZYTOTOXIZITÄT	16
2.8.1	LACTATDEHYDROGENASE LDH	17
2.9	BEURTEILUNG VON <i>IN VITRO</i> TOXIZITÄTSTESTS	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
3.1	EPC-ZELLEN	18
3.2	SEDIMENTPROBEN	18
3.2.1	PROBENNAHME	18
3.2.2	EXTRAKTION DER MARINEN SEDIMENTE ISIS 1-7	20
3.2.3	EXTRAKTION DER ELBSEDIMENTE UND DER SEDIMENTE HAMBURGER HAFEN	21
3.2.3.1	Überprüfung der Extraktionsausbeute	22
3.3	ZELLAUFARBEITUNG UND INKUBATION	22
3.4	KALIBRIERSTANDARDS	24
3.5	SOD-BESTIMMUNG	24
3.6	KAT-BESTIMMUNG	25
3.7	GPX-BESTIMMUNG	26
3.8	GR-BESTIMMUNG	26
3.9	GST-BESTIMMUNG	27
3.10	BESTIMMUNG VON GSH-KONJUGATEN	27
3.11	GSX-BESTIMMUNG	27
3.12	BESTIMMUNG VON THIOBARBITURSÄURE-REAKTIVEN SUBSTANZEN (TBARS)	29
3.13	BESTIMMUNG VON MDA MITTELS IONENPAAR-HPLC	30
3.14	LDH-BESTIMMUNG	30
3.15	PROTEINBESTIMMUNG	31
3.16	STATISTISCHE AUSWERTUNG	32

<b>4</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>METHODENENTWICKLUNG</b>	<b>35</b>
5.1	TOXIZITÄT DES LÖSUNGSVERMITTLERS	35
5.2	SENSITIVITÄTSPRÜFUNG DER AUSGEWÄHLTEN BIOLOGISCHEN MARKER	35
5.3	KOMPATIBILITÄT DER VERWENDETEN LÖSUNGSMITTEL	38
5.4	METHODENENTWICKLUNG KATALASE	40
5.4.1	VALIDIERUNG DER BESTIMMUNGSMETHODE	40
5.4.2	OPTIMIERUNG DER INKUBATIONSZEIT UND INKUBATIONSART	40
5.4.3	ANWENDUNG AUF OXIDATIVE STRESSOREN	42
5.5	METHODENENTWICKLUNG GLUTATHION	44
5.5.1	VALIDIERUNG DER BESTIMMUNGSMETHODE	44
5.5.2	OPTIMIERUNG DER INKUBATIONSZEIT UND INKUBATIONSART	44
5.5.3	FESTLEGUNG DER POSITIVKONTROLLE FÜR DEN GSx-TEST	45
5.5.4	UMRECHNUNG DER GSSG-INDUKTION IN MD-ÄQUIVALENTE	47
5.5.5	EINFLUSS DER ANTIOXIDATIVEN ENZYME AUF DIE WIRKUNG VON MD	50
5.6	PROTEINGEHALT ALS NACHWEIS ZUR ZYTOTOXIZITÄT	52
5.7	ÜBERPRÜFUNG DER PRÄZISION DER ANGEWANDTEN METHODEN	54
5.7.1	BESTIMMUNG DER SIGNIFIKANZNIVEAUS DER METHODEN	54
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
6.1	UNTERSUCHUNG DER SEDIMENTROHEXTRAKTE	56
6.1.1	NORDSEE (ISIS-1, ISIS-2 UND ISIS-5)	56
6.1.2	OSTSEE (ISIS-3, ISIS-4, ISIS-6 UND ISIS-7)	57
6.1.3	ELBE HAMBURG (SEEMANNSHÖFT UND BLANKENESE)	58
6.1.4	INDUSTRIEHAFEN HAMBURG (VERINGKANAL UND SEEHAFEN-4)	59
6.1.5	VERGLEICH DER ROHEXTRAKTE	60
6.2	UNTERSUCHUNG MARINER SEDIMENTEXTRAKTE MITTELS BDF	61
6.2.1	KAT-INDUKTION	61
6.2.2	REDOXSYSTEM GSx (ISIS-2, ISIS-3 UND ISIS-6)	63
6.3	VERIFIZIERUNG DER EFFEKTE DER BDF-UNTERSUCHUNGEN	67
6.3.1	9,10-PHENANTHRENCHINON PHEQ	69
6.3.2	ELEMENTARER SCHWEFEL S <sub>8</sub>	70
6.3.3	NACHSTELLUNG DER ZELLINKUBATION DURCH EIN MODELLSYSTEM	70
6.3.4	EINFLUSS VON PHEQ AUF DAS ENZYMSYSTEM GR	73
6.4	UNTERSUCHUNG VON NAPHTHOCHINONDERIVATEN	76
6.4.1	SUBSTITUENTENEINFLUSS AUSGEWÄHLTER NAPHTHOCHINONDERIVATE AUF DIE GSSG-BILDUNG	76
6.4.2	NACHWEIS VON CHINON-THIOETHERKONJUGATEN MITTELS HPLC-AP-ESI-MSD	79
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>81</b>
7.1	EIGNUNG DER EPC-ZELLINIE ZUM NACHWEIS VON OXIDATIVEM STRESS	81
7.1.1	ANTIOXIDATIVE ENZYMSYSTEME	81
7.1.2	REDOXSYSTEM GSx	85
7.1.2.1	Empfindlichkeit der Methode	85
7.1.2.2	Positivkontrolle	86



7.1.2.3	GSH-Konjugation	87
7.1.2.4	Einfluss einzelner Enzymsysteme auf die GSSG-Bildung	88
7.1.3	UNTERSUCHUNG VON NAPHTHOCHINONDERIVATEN	90
7.2	NACHWEIS VON OXIDATIVEN STRESSOREN IN MARINEN SEDIMENTEXTRAKTEN MITTELS BDF	95
7.2.1	ROEXTRAKTE	95
7.2.2	PLAUSIBILITÄTSPRÜFUNG DER EFFEKTE VON PHEQ UND S <sub>8</sub>	96
7.2.3	SCHWEFELSENSITIVITÄT DES REDOXSISTEMS GSX	98
7.3	EIGNUNG DES REDOXSISTEMS GSX ALS BIOTEST FÜR DIE BDF	102
7.4	BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	104
8	ZUSAMMENFASSUNG	106
9	ANHANG	110
9.1	ZELLAUFARBEITUNG	110
9.2	INKUBATION DER ZELLEN	110
9.3	SOD-BESTIMMUNG	111
9.4	KAT-BESTIMMUNG	113
9.5	GPX-BESTIMMUNG	115
9.6	GR-BESTIMMUNG	117
9.7	GST-BESTIMMUNG	119
9.8	HPLC-MSD-BESTIMMUNG VON CHINON-THIOETHERKONJUGATEN	121
9.9	GSx-BESTIMMUNG	124
9.10	MDA-HYDROLYSE	128
9.11	TBARS-BESTIMMUNG	128
9.12	HPLC-BESTIMMUNG VON MDA	130
9.13	LDH-BESTIMMUNG	133
9.14	PROTEINBESTIMMUNG	134
9.15	EXTRAKTIONSVERGLEICH ULTRASCHALL UND SOXHLET	136
9.16	EINZELERGEBNISSE DER DURCHGEFÜHRTEN UNTERSUCHUNGEN	139
9.17	CHEMIKALIENLISTE	149
9.18	GERÄTE, HILFSMITTEL UND CHROMATOGRAPHISCHE TRENNMITTEL	151
10	LITERATURVERZEICHNIS	152



## 1. Einleitung

Der im Zuge der fortschreitenden weltweiten Industrialisierung zunehmende anthropogene Schadstoffeintrag in die marine Umwelt stellt für die marine Lebensgemeinschaft ein beträchtliches und nicht zu vernachlässigendes Gefährdungspotential dar. Als Eintragsquellen der Schadstoffe ins Ökosystem Meer gelten vor allem die diffusen Einträge über Flüsse und den Kontinent, aber auch Punktquellen (Fabriken, Schiffshavarien, Verklappung) und die atmosphärische Deposition (Emissionen).

Zu den prioritären Schadstoffen, die Gegenstand nationaler und internationaler Monitoringprogramme sind, zählen in erster Linie chlorierte Kohlenwasserstoffe, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Schwermetalle (HAARICH und HARMS, 1997). Die Kenntnisse der Schadstoffkonzentrationen allein lassen jedoch keine Rückschlüsse auf den Zustand des Ökosystems Meer zu. Hierzu ist es vielmehr erforderlich, Informationen über die toxische Wirkung auf marine Organismen zu gewinnen. Die Zielsetzung dieser Umweltforschung liegt in der Vorhersage der zukünftigen Entwicklung des Ökosystems im Zuge der Schadstoffauswirkungen (LANGE und LAMBERT, 1995).

Als Untersuchungskompartiment für entsprechende Studien wird neben Meerwasser, Schwebstoffen und Porenwasser das Sediment gewählt (HO et al., 2002; HEEMKEN et al., 1997; THEOBALD et al., 1995). Sedimente sind sowohl eine Senke als auch eine Quelle für Schadstoffe im marinen Ökosystem. Es gilt als erwiesen, dass persistente organische Schadstoffe an partikuläres Material wie organische Schwebstoffe adsorbieren und sedimentieren. Das Sediment stellt somit für die Organismen des Benthos, insbesondere Detritus-Konsumenten, aufgrund von Schadstoffremobilisierung ein Gefährdungspotential dar.

Die ständig steigende Zahl von emittierten chemischen Verbindungen in das sensible Ökosystem Meer erhöht die Ungewissheit, welche Substanzklassen bzw. Substanzen toxische Wirkungen in aquatischen Organismen induzieren. Wurden 1930 weltweit nur eine Million t organische Chemikalien produziert, so beläuft sich deren Produktion mittlerweile auf über 400 Millionen t (RÄBIGER, 2002).

Mittlerweile sind über 100.000 organische Substanzen im täglichen Gebrauch und jedes Jahr kommen zwischen 200 – 1000 synthetische Stoffe neu auf den Markt. In marinen Sedimenten wurden bislang jedoch erst ca. 300 Einzelstoffe nachgewiesen (BISELLI, 2001; MORIARTY, 1993).

Ohne die genaue Kenntnis der toxischen Effekte kann das Ziel der Meeresforschung, Aussagen über den Zustand des Ökosystems zu treffen, nicht erreicht werden

(KAMMANN, 1995). Das Vorliegen komplexer Schadstoffgemische, die Akkumulation und die Wirkung von Metaboliten sowie der nicht abzuschätzende Einfluss synergistischer und antagonistischer Effekte im komplexen Schadstoffgemisch lässt eine Untersuchung der Toxizität von Sedimenten mit rein chemischer Analytik nicht zu (BRACK et al., 1999; FERNANDEZ et al., 1992; BABICH und BORENFREUD, 1991). Hierzu ist vielmehr ein kombinierter Ansatz aus Biologie und Chemie notwendig.

Eine Möglichkeit, sich diesem Problem zu nähern, besteht darin, Umweltproben bzw. daraus gewonnene Extrakte zu fraktionieren und die toxische Wirkung der einzelnen Fraktionen zu testen. Dieser Idee folgt das „Toxicity Identification Evaluation (TIE)-Konzept“, das von der U.S. Environmental Protection Agency (EPA) standardisiert wurde. Es ist sowohl für Oberflächenwasser als auch für Sedimente anwendbar (HO et al., 2002; EPA, 1996; ANKLEY und SCHUBAUER-BERIGAN, 1995; EPA 1993a,b, 1991). Nach einer groben Fraktionierung werden die Extrakte mittels eines geeigneten Biotests auf allgemeine Toxizität überprüft. Toxisch relevante Proben werden erneut fraktioniert und getestet, im Optimum bis zur Identifizierung der toxischen Einzelsubstanzen. Die letztendliche Zielsetzung dieser Untersuchung liegt in der Implementierung dieser toxischen Substanzen in laufende Monitoringprogramme zum Schutze des Ökosystems Meer.

Diesem Konzept folgt das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Projekt „Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe (ISIS)“. Hierbei kommt die Biotest-dirigierte Fraktionierung (BDF) zum Einsatz, die eine modifizierte Form des TIE-Konzeptes darstellt und für die zu untersuchenden Sedimente aus dem Raum der Nord- und Ostsee bislang noch nicht angewandt wurde. Die Sedimente wurden so ausgewählt, dass Sedimente mit unterschiedlichen Belastungsstärken, Belastungsquellen und unterschiedlicher Zusammensetzung untersucht werden.

Ermöglicht werden diese Untersuchungen durch eine enge Zusammenarbeit zwischen Arbeitsgruppen aus den Bereichen Biologie (biologische Testsysteme), Chemie (Analytik, Synthese) und Sedimentprobennahme. Hierbei ist anzumerken, dass erst durch die enge Kooperation der einzelnen Teilprojekte die Grundlage zum Erreichen der Zielsetzung des Projektes möglich wird. In Tabelle 1 sind die im ISIS-Projekt beteiligten Projektpartner beschrieben.

Die biologischen Testsysteme beruhen auf grundsätzlich unterschiedlichen Wirkprinzipien und ermöglichen somit, ein weites Spektrum toxikologischer Wirkungen zu detektieren. Es handelt sich bei der Mehrzahl der Tests um einfache Screening- und Kurzzeittests. Eine Auflistung der verwendeten biologischen Testsysteme zeigt Tabelle 2.

**Tabelle 1: Am ISIS-Projekt beteiligte Institute und deren Aufgaben**

<b>Projektpartner</b>	<b>Aufgabe</b>
Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH)	Probenahme der Sedimente Extraktion der Sedimente Feinfraktionierung (HPLC)
Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie (OC)	Fraktionierung der Rohextrakte Biotests chemische Analytik Synthese von Referenzsubstanzen
Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie (LC)	Biotests chemische Analytik
Universität Hamburg, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Allgemeine Toxikologie (UKE)	Biotests
Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Institut für Fischereiökologie (BFA)	Biotests

**Tabelle 2: Verwendete biologische Testsysteme im ISIS-Projekt**

<b>Wirkung</b>	<b>Biologisches Testsystem</b>	<b>Projektpartner</b>
Energiestoffwechsel	Leuchtbakterientest	OC
Oxidativer Stress	Enzymaktivität Redoxsystem Glutathion	LC
Proteotoxizität	Hsp70-Induktion	
Mutagenität	Arabinose-Resistenztest	
AH-Rezeptor-Aktivität Hormonelle Wirksamkeit	Luciferase-Reporter-Gen-Assay	UKE
Embryotoxizität	Fischeitest Mortalität und Missbildung	BFA
Genotoxizität Neurotoxizität	Comet-Assay Acetylcholinesterase-Hemmtest	

Im Rahmen der Arbeit sollten Substanzen, die im biologischen System oxidativen Stress verursachen, anhand der BDF identifiziert werden. Der Einsatz geeigneter biologischer Marker zur Detektion von oxidativem Stress in komplexen Proben in Kombination mit der BDF wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Ein Beispiel für biologische Marker zur Detektion von oxidativem Stress auf zellulärer Ebene stellen die Enzyme der oxidativen Stressabwehr dar. Hierzu zählen die primären Schutzenzyme Superoxiddismutase (SOD), Katalase (KAT) und

Glutathionperoxidase (GPx) ebenso wie sekundäre Systeme Glutathion-Reduktase (GR) und Glutathion-S-Transferase (GST). In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zum Nachweis von oxidativem Stress, welche auf der Bestimmung der Aktivitäten dieser Schutzenzyme beruhen (LUSHCHAK et al., 2001; ERDEN-INAL und KAHRAMAN, 2000; ZIELINSKI und PORTNER, 2000; VAN DER OOST et al., 1996). Des Weiteren ist das Redoxsystem Glutathion (GSx) Gegenstand von Studien zum oxidativen Stress (CHIOU und TZENG, 2000; THOM et al., 1997; GOKSOYR et al., 1996; SIES, 1985). Untersuchungen zum Nachweis zellulärer Schädigungen im Verlauf von induziertem oxidativen Stress finden ebenfalls Anwendung. Als Beispiel sei die Bildung von Nebenprodukten der Lipidperoxidation wie Malondialdehyd (MDA) genannt (PEDRAJAS et al., 1998; THOM et al. 1997).

Die Ziele der Untersuchungen lagen zunächst auf der Auswahl geeigneter zellulärer Marker zur Detektion von oxidativem Stress. Nach erfolgter Sensitivitätsprüfung des verwendeten biologischen Untersuchungsmaterials – der permanenten Zelllinie *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) – auf bekannte oxidative Stressoren, schließt sich die Methodenoptimierung aller relevanten Testparameter an.

Ferner sind die Testsysteme an die Methode der BDF anzupassen, wobei primär die Kompatibilität der Tests mit den verwendeten Lösungsmitteln, aber auch eine minimale Testdauer bei maximaler Testantwort (=Effekt) im Vordergrund stehen.

Daran schließt sich die Anwendung der optimierten Testsysteme an. Hierzu wurden Sedimente mit variierenden Belastungsniveaus anthropogener Schadstoffe (Hamburger Industriehafen, Elbe, Nord- und Ostsee) ausgewählt, um Aussagen über die Fähigkeit der Testsysteme treffen zu können, diese differierende Schadstoffbelastung in die entsprechenden Effekte zu übersetzen.

Abschließend galt es, die Fragestellung zu klären, ob der Ansatz der BDF zur Identifizierung von Schadstoffen mit einem klar zuzuordnenden oxidativen Potential aus marinen Proben geeignet ist. Hierzu wurden einige marine Sedimente aus der Nord- und Ostsee mit der BDF untersucht. Über einen statistischen Vergleich der Ergebnisse zum oxidativen Stress mit acht weiteren biologischen Testsystemen der ISIS-Biotestbatterie der Projektpartner erfolgt die Bewertung der verwendeten Testsysteme für die BDF mariner Sedimentextrakte.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Biotest-dirigierte Fraktionierung BDF

Die Frage, welche Substanzen bzw. Substanzklassen in komplexen Umweltproben mit beobachteten Effekten an marinen Organismen in Verbindung gebracht werden können, stellt sehr hohe Anforderungen an die wissenschaftliche Gemeinschaft. Ein möglicher Ansatz, sich diesem Problem zu nähern, besteht darin, die Komplexität der Umweltproben zu verringern und die an Stoffmenge reduzierten Proben in geeigneten biologischen Testsystemen zu untersuchen. So wird der/die verursachende Stoff-(klasse) eingekreist, und es kann die chemische Identifizierung der Substanzen und die Verifizierung der toxischen Effekte im Biotest erfolgen.

Das Konzept der BDF (Abbildung 1) beruht auf der Fraktionierung von Umweltproben, kombiniert mit der toxikologischen Untersuchung der erhaltenen Fraktionen. Es basiert auf dem von der EPA entwickelten und standardisierten Konzept der TIE und wurde ursprünglich für Abwasser entwickelt, ist jedoch auch für Fragestellungen im Sedimentbereich anwendbar (HO et al., 2002; BURGESS et al., 2000; EPA 1996; ANKLEY und SCHUBAUER-BERIGAN, 1995; EPA, 1993a,b, 1991).

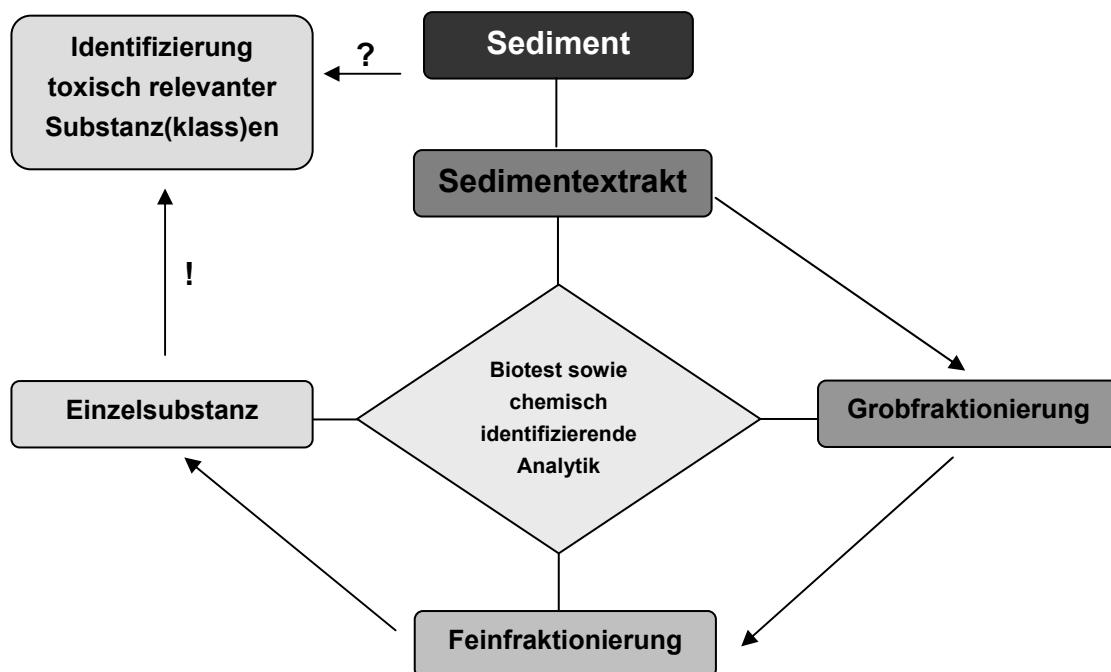


Abbildung 1: Schema der BDF zur Identifizierung unbekannter, toxisch relevanter Substanzen in Umweltproben

Die BDF wurde bereits erfolgreich im Süßwasserbereich durchgeführt und leistete wesentliche Beiträge zur Entwicklung von Sanierungskonzepten für Gewässer (BRACK et al., 1999; ENGWALL et al., 1996; BURGESS et al., 1995; CASTANO et al., 1994; ANKLEY et al., 1992; BRUNSTRÖM et al., 1992). Für den marinen Bereich ist die eindeutige Zuordnung von Kontaminanten zu beobachteten Effekten bisher nicht erreicht worden, da es sich um vergleichsweise schwach kontaminierte Proben handelt (CARR et al., 2001; BURGESS, 2000). Für die Nord- und Ostsee wurden bislang keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt.

## **2.2 Biologische Testsysteme**

### **2.2.1 Anwendung**

Für Untersuchungen zum Schutz von Mensch und Umwelt bietet sich der Einsatz biologischer Testsysteme für toxikologische Studien an. So kann gewährleistet werden, dass Substanzwirkungen komplexer Stoffgemische summarisch erfasst und synergistische und antagonistische Effekte sowie die Metabolisierung und Biotransformation im Organismus berücksichtigt werden (BRAUNBECK et al., 1997b; HOLLERT und BRAUNBECK, 1997).

Routine- und Screening-Untersuchungen von Sedimenten aus limnischen und marinen Ökosystemen erlangen zentrale Bedeutung, da sie Voraussagen über potentiell gefährdete Regionen ermöglichen (LONG et al., 2001; BURGESS et al., 1993).

Um die Gefährdung für aquatische Organismen mittels der BDF abschätzen zu können, ist es notwendig, Eluate oder Extrakte aus den Sedimenten herzustellen, damit darin enthaltene Schadstoffe den biologischen Testsystemen, welche i.d.R. als wässrige Suspension vorliegen, besser verfügbar gemacht werden (HOLLERT et al., 1996).

### **2.2.2 Testorganismen**

Nach der Rahmenabwasserverwaltungsvorschrift finden hauptsächlich Fische, Daphnien, Leuchtbakterien und Algen als Testorganismen für die biologischen Testsysteme Verwendung (BRAUNBECK et al., 1995; SCHULZ et al., 1995). Laut Angaben des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft werden in Deutschland über 200.000 Fische pro Jahr für den akuten *in vivo* Fischttest (DIN 38412) verwendet. Hierbei werden Konzentrationen eingesetzt, die weit über den in der Umwelt existierenden Schadstoffmengen liegen. Der Test gilt als sehr unempfindlich, da weder subletale noch chronische Effekte erfasst werden, weil einzig auf den Parameter Letalität geprüft wird. Ferner ist es aufgrund



individueller Variabilität und Einflüsse durch die biologischen Cyclen der Versuchstiere problematisch, Tests auf Ebene von Organismen zu standardisieren. Die Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit der Befunde ist oft nicht möglich. Hohe Kosten und ein immenser Arbeitsaufwand machen - neben ethischen Aspekten - deutlich, dass Alternativen zum klassischen Fischtest notwendig sind (BABICH et al., 1986, BRAUNBECK et al., 1997b; HOLLERT und BRAUNBECK, 1997; SEGNER und LENZ, 1993). Tabelle 3 zeigt eine Auswahl verschiedener Alternativen zum akuten Fischtest.

**Tabelle 3: Alternativen zum akuten Fischtest**

Testorganismus	Effekt	Literatur
Fischeier	Embryotoxizität	LANGE et al., 1995
Algen, Wasserlinsen	Wachstumshemmung	HUANG et al., 1995; MUNOZ und TARAZONA, 1993
Leuchtbakterien	Biolumineszenzhemmung	JOHNSON und LONG, 1998
Bakterien	Mutagenität	VAHL et al., 1997
Muscheln	Enzymaktivität	REGOLI et al., 1998
Schnecken	Endokrine Effekte	TILLMANN et al., 2000
Wasserflöhe	Immobilität	BRACK et al., 1999
Zellkulturen	Verschiedene Effekte	DESCAMPIAUX et al., 1999; KAMMANN et al., 2001

Durch Verwendung niederer Organismen wie Schnecken oder Muscheln ist die ethische Problematik von Tierversuchen nicht gelöst. Bei der Verwendung von Fischeiern oder Embryonen ist die Belastung durch die Schadstoffexposition auf Lebensstadien beschränkt, denen noch keine Lebensfähigkeit zugesprochen wird (BRAUNBECK, 1997a).

Neben den klassischen *in vivo*-Biotests an Organismen unterschiedlichster Lebensstadien existiert eine Vielzahl von *in vitro*-Tests. Eine weit verbreitete und etablierte Methode stellt der Leuchtbakterientest dar. Er beruht auf der Biolumineszenzänderung von Leuchtbakterien; es wird die durch einen Schadstoff verursachte Hemmung der Leuchtkraft nach definierter Kontaktzeit bestimmt (JOHNSON und LONG, 1998).

In den letzten Jahren haben vor allem *in vitro* Toxizitätstests an kultivierten Fischzellen stetig an Bedeutung gewonnen (DESCAMPIAUX et al., 1999; FERNANDEZ et al., 1993; KAMMANN et al., 2001). Hierbei sind primäre und permanente Zellkulturen voneinander zu unterscheiden.

Primäre Zellkulturen werden frisch aus den entsprechenden Organen gewonnen und direkt angezchtet. Hierbei eignen sich primäre Hepatozyten besonders gut für

Metabolismenstudien von Schadstoffen, da sie noch die volle metabolische Kapazität des Ausgangsorgans aufweisen. Diese ist jedoch laut GAGNE und BLAISE (2000) zeitlich stark begrenzt (7-10 Tage). Durch den Einsatz primärer Zelllinien reduziert sich der Verbrauch an Versuchstieren um 90%, da aus dem gewonnenen Organ mehrere Testreihen durchführbar sind (BRAUNBECK et al., 1997a).

Werden statt primärer permanente Zelllinien verwendet, so reduziert sich der Verbrauch an Versuchstieren nahezu vollständig. Permanente Zelllinien werden aus verschiedenen Geweben (Haut, Schuppe, Muskel, Gonaden) einmalig gewonnen und über viele Generationen weitergezüchtet. Der Umgang mit permanenten Zelllinien zeichnet sich neben den Gründen der Tierschutzethik vor allem durch die einfache Handhabung, die Robustheit der Zellen und vergleichsweise geringe Kosten aus. Durch standardisierte Versuchsbedingungen wird die Aufnahme von Dosis-Wirkungsbeziehungen möglich (ZAHN et al., 1995; BAKSI und FRAZIER, 1990).

Der Nachteil permanenter Zelllinien liegt im Verlust der metabolischen Kapazität mit fortschreitender Generationszahl. Durch die Supplementierung mit artfremden, isolierten Enzymsystemen, wie das Cytochrom-P450 (CYP450), wird diese künstlich wieder erhöht (FERNANDEZ et al., 1992; HIGHTOWER und RENFRO, 1988).

Dienten permanente Zelllinien ursprünglich zur Untersuchung von Fischviren (BJÖRKLUND et al., 1997; FIJAN et al., 1983), so werden sie heute ebenfalls für Toxizitätsstudien verwendet. Tabelle 4 zeigt häufig verwendete permanente Fischzelllinien.

**Tabelle 4: Auswahl permanenter Fischzelllinien**

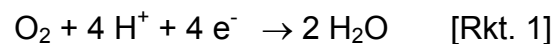
Zelllinie	Fischart	Gewebe	Literatur
<b>BF-2</b>	Bluegill Sunfish	Muskel	BABICH und BORENFREUD, 1987
<b>EPC</b>	Karpfen	Haut	KAMMANN et al., 2001; MOLINA et al., 2001; TEERIJOKI et al., 2001; GEORGE et al., 2000; NIELSEN und BUCHMANN 2000; WRIGHT et al., 2000; FIJAN et al., 1983
<b>FHM</b>	Dickkopf- elritze	Haut	SEGNER und LENZ, 1993
<b>GSF</b>	Goldfisch	Schuppe	SAITO et al., 1993
<b>RTG-2</b>	Regenbogen- forelle	Gonade	CASTANO et al., 1996; BABICH et al., 1986

### 2.3 Oxidativer Stress

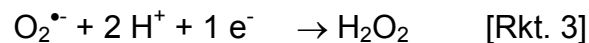
Oxidativer Stress ist ein unvermeidbares Nebenprodukt aeroben Lebens. Aufgrund von metabolischen und biochemischen Reaktionen (z.B. Zellatmung, Biotransformation) werden in lebenden Zellen ständig reaktive Sauerstoffspezies

(ROS, reactive oxygen species) gebildet. Unter dem Begriff ROS werden Radikale mit einem oder mehrfach ungepaarten Elektronen an einem Sauerstoffatom zusammengefasst. Deren Bildung erfolgt durch schrittweise Addition von Elektronen an Sauerstoff, zum Teil mit Hilfe von Enzymen (z.B. Cytochromoxidase), in den Mitochondrien, den Mikrosomen, im Endoplasmatischen Retikulum und im Nukleus (BABICH et al., 1993).

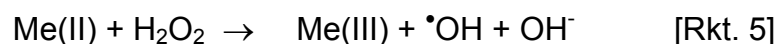
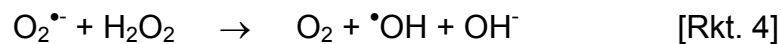
Während der Zellatmung in den Mitochondrien geht Sauerstoff eine konzertierte vier Elektronen Reduktion zu Wasser ein [Rkt. 1] (AHMED, 1999; WINSTON und DI GIULIO, 1991).



Möglich ist auch die Teilreduktion. Die Reduktion mit einem einfachen Elektronentransfer liefert hierbei das Superoxidradikalanion (SORA,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) [Rkt. 2], welches durch erneute einfache Reduktion in Wasserstoffperoxid umgewandelt wird [Rkt. 3].



Die reaktivste Spezies der ROS stellt mit Abstand das Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) dar, das sowohl durch die Haber-Weiss-Reaktion direkt aus SORA [Rkt. 4], als auch unter Beteiligung von katalytisch wirksamen Eisen- oder Kupferionen in der Fenton-Reaktion [Rkt. 5] aus Wasserstoffperoxid gebildet werden kann (AHMED, 1999; WINSTON und DI GIULIO, 1991).



Das Hydroxylradikal ist aufgrund seiner enormen Reaktivität in der Lage, kritische, die zelluläre Homeostase aufrecht erhaltende Zellbestandteile sofort anzugreifen; ein effektiver Schutz auf zellulärer Basis gegen das Hydroxylradikal existiert nicht. Aus diesem Grund hat die Wasserstoffperoxid-Entgiftung eine besondere Bedeutung beim Schutz der Zelle vor oxidativer Schädigung (BUDDE, 1996).

Obwohl nur ein geringer Prozentsatz der gebildeten ROS aus der Elektronentransportkette freigesetzt wird, stellen sie eine potentielle Gefährdung für das Zellsystem dar. Anthropogene Schadstoffe vermögen die Bildung von ROS über den Prozess des „Redox-Cycling“ in der Zelle zu steigern (KAPPUS, 1986). Ist die Bildungsrate der ROS größer als die Schutzfunktion der antioxidativen Systeme der Zelle, so spricht man von oxidativem Stress (SIES, 1985). Die Folgen sind irreparable Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA (primäre Schäden), die zu schweren Folgeschäden, wie Störungen in Stoffwechselprozessen, Enzyminaktivierungen und Mutationen bis hin zum Zelltod (sekundäre Schäden) führen können (STORZ und IMLAY, 1999; BABICH et al., 1993; WINSTON, 1991).

## 2.4 Redox-Cycling

Aus dem vergleichbaren strukturellen Aufbau organischer Schadstoffe mit endogenen, zellulären Substanzen resultiert die Integration der Schadstoffe in den Zellmetabolismus und deren Biotransformation. Dadurch vermögen zur Metabolisierung befähigte Schadstoffe toxische Effekte zu induzieren, die im weiteren oxidativen Stress zur Folge haben (WINSTON und DI GIULIO, 1991). Durch die Biotransformation der hydrophoben Xenobiotika über die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-(NADPH)-abhängigen Redoxreaktionen des CYP450 der Zelle, werden einerseits die Schadstoffe als polare Metabolite über die Ausscheidungsorgane ausgeschleust, andererseits vermehrt ROS gebildet (KAPPUS, 1987; MATHER-MIHAICH und DI GIULIO, 1986). Hierbei spielen Substanzen, die direkt oder deren Metabolite Redox-Cyclen generieren, eine zentrale Rolle. Zu den bekanntesten Redox-Cyclern zählen u.a. Schwermetalle wie Kupfer-(II)-Ionen (CHRISTIE und COSTA, 1984), aromatische Chinone (ÖLLINGER und BRUNMARK, 1991; LIVINGSTON et al., 1989; COHEN und D'ARCY DOHERTY, 1987), Nitroaromaten oder Bipyridile (WINSTON, 1991).

Im ersten Schritt des Redox-Cyclings erfolgt eine Ein-Elektronen-Reduktion, katalysiert durch NADPH-abhängige Flavoprotein-Reduktasen der CYP450-Familie (KAPPUS, 1986). Das resultierende Radikalanion reagiert mit Sauerstoff zur Ausgangssubstanz und einem SORA nach Abbildung 4. Es entstehen somit zwei potentielle Gefährdungsquellen des Zellsystems durch Redox-Cyclen: zum einen die Bildung von ROS, zum anderen der Abbau von Redoxequivalenten. So wird ein Ungleichgewicht zwischen den antioxidativen Schutzsystemen und dem prooxidativen Potential in der Zelle verursacht, was die Ursache für oxidativen Stress darstellt (SIES, 1985).

## 2.5 Enzymatische Schutzmechanismen

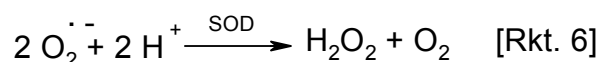
Zu den enzymatisch antioxidativ wirksamen Schutzmechanismen sind die primären Schutzenzyme SOD, KAT und GPx zu zählen.

Um einem oxidativen Stressmilieu entgegenzuwirken, exprimieren Zellen die primären antioxidativen Schutzenzyme SOD, KAT und GPx ebenso wie die entsprechenden sekundären Schutzsysteme GST und GR (EDSON et al. 1996; LOPRASERT et al., 1996). Die Induktion der SOD, KAT und GPx stellt neben der von sekundären Schutzenzymen wie GR und GST einen wichtigen Parameter zur Beurteilung von oxidativem Stress dar (LUSHCHAK et al., 2001; DESCAMPIAUX et al., 1999; VAN DER OOST et al., 1996). Abbildung 4 stellt die bei der Metabolisierung von Xenobiotika, der Entstehung sowie der Entgiftung von ROS beteiligten zellulären Systeme dar.

Des Weiteren wurden die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten, hier MDA, sowie die Akkumulation von oxidiertem Glutathion (GSSG) als mögliche biologische Marker daraufhin untersucht, einen induzierten oxidativen Stress nachzuweisen.

### 2.5.1 Superoxiddismutase SOD

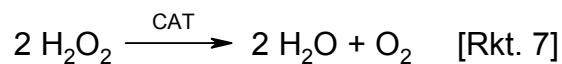
Der Abbau des SORA zu Wasserstoffperoxid [Rkt. 6] wird von der SOD (EC 1.15.1.1) katalysiert. Der weitere Wasserstoffperoxidabbau wird von verschiedenen Enzymen, von denen die KAT und die GPx am besten charakterisiert sind, beschleunigt.



Die SOD wurde erstmals 1969 beschrieben und stellt das einzig bekannte Enzym dar, welches die Umsetzung eines radikalischen Eduktes katalysiert (McCORD und FRIDOVICH, 1969). In eukaryotischen Zellen existieren drei Isoformen der SOD: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD und EC-SOD. Die Cu/Zn-SOD weist ein Molekulargewicht von 32 kDa auf, besteht aus zwei identischen Untereinheiten und ist im Zytosol lokalisiert. Die Mn-SOD (88 kDa) besteht aus vier identischen Untereinheiten und ist in den Mitochondrien lokalisiert (FRIDOVICH, 1975). Die sogenannte „extrazelluläre“ SOD (EC-SOD; 135 kDa), eine Cu/Zn-haltige SOD, ist im extrazellulären Raum vorhanden und besteht ebenfalls aus vier nicht kovalent miteinander verknüpften Untereinheiten (MARKLUND, 1984; MARKLUND et al., 1982).

### 2.5.2 Katalase KAT

KAT (EC 1.11.1.6) ist eine Peroxidase, die in tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Geweben, besonders in der Leber, vorkommt. Die KAT stellt das am längsten bekannte antioxidative Enzym dar und wurde 1901 erstmals erwähnt. Sie katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff [Rkt. 7], und dient dadurch der Entgiftung der Zelle. Chemisch gesehen ist KAT ein tetrameres Eisenprotein (245 kDa) mit 4 Häm-Molekülen in Form von Ferriprotoporphyrin mit Eisen (III). Der Hauptanteil der KAT ist in den Peroxisomen und ein geringerer Teil im Zytosol lokalisiert (PERCY, 1984).



### 2.5.3 Glutathionperoxidase GPx

Die GPx (EC 1.11.1.9) entgiftet neben Wasserstoffperoxid auch durch die Lipidperoxidation gebildete organische Hydroperoxide (ROOH) [Rkt. 8] mit Hilfe von reduziertem Glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycin, GSH) als Substrat, wobei GSSG entsteht. Für die GPx, zuerst von MILLS (1957) beschrieben, unterscheidet man zum einen die Selen-abhängige und zum anderen die Selen-unabhängige GPx voneinander. Die Selen-abhängige Form stellt ein tetrameres Protein (84 kDa) dar, welches im Zytosol und in den Mitochondrien vorkommt.



In Abbildung 2 ist der Redoxcyclus der Selen-abhängigen GPx dargestellt. Die unter physiologischen Bedingungen in der Selenolatform vorliegende Glutathionperoxidase ( $\text{E-Se}^-$ ) reagiert mit dem Hydroperoxid unter Entstehung der Selenosäure ( $\text{E-Se-OH}$ ), welche mit einem Glutathionmolekül ein gemischtes Selenosulfid ( $\text{E-Se-SG}$ ) bildet. Durch Reaktion mit einem weiteren Glutathionmolekül wird wieder der Ausgangspunkt des Redoxcyclus erreicht. Die Nettogleichung des Redoxcyclus ist in Reaktion 8 dargestellt (KELLY et al., 1998 ; BUDDE, 1996; WINSTON und DI GIULIO, 1991).

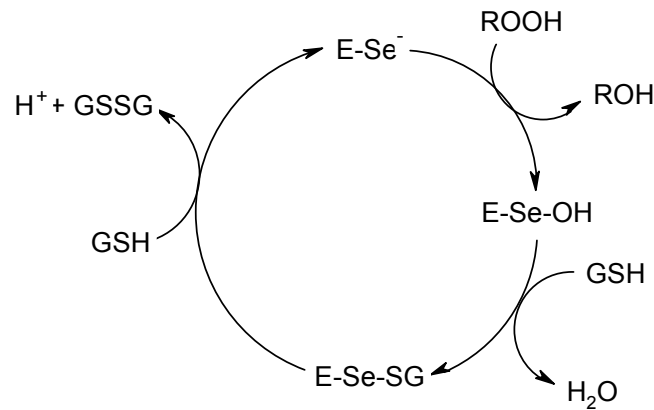


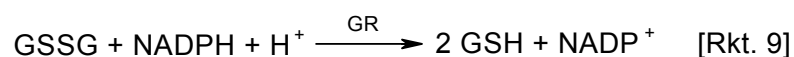
Abbildung 2: Modell des Redoxzyklus der GPx

### 2.5.4 Glutathion-S-Transferase GST

Zu den Selen-unabhängigen Formen der GPx zählen die GST-Isomere (EC 2.5.1.18). Hierbei handelt es sich um dimere Proteine, deren Untereinheiten molekulare Massen zwischen 23 und 27 kDa aufweisen. Die GST sind im Zytosol und in den Mitochondrien der Zellen lokalisiert (SUN, 1989). Da sie wesentlich an der Biotransformation von Xenobiotika und an der Detoxifizierung von Kanzerogenen beteiligt sind, stellen sie einen sekundären Schutz gegen die durch Xenobiotika vermittelte ROS-Bildung dar (JAKOBY, 1978; SMITH et al., 1977). Die durch GST katalysierte Konjugation elektrophiler Xenobiotika mit GSH über die freie Sulfhydrylgruppe des Tripeptides dient der Entgiftung durch aktive Ausschleusung der Mercapto-Verbindungen aus der Zelle (WHEATLY et al., 1994).

### 2.5.5 Glutathion-Reduktase GR

Neben GST stellt die GR (GR, EC 1.6.4.2) ein wichtiges sekundäres Schutzenzym dar. GR katalysiert in Gegenwart von NADPH die Reduktion von GSSG zu GSH [Rkt. 9] und hält so das zelluläre GSx-Gleichgewicht auf Seiten des GSH aufrecht (RODRIGUEZ-ARIZA et al., 1993; WINSTON und DI GIULIO, 1991; MEISTER und ANDERSON, 1983). Die GR ist im Zytosol und den Mitochondrien lokalisiert, hat ein Molekulargewicht von ca. 120 kDa und ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut, die Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) im aktiven Zentrum gebunden haben. (RAY und PRESCOTT, 1975). GR wurde 1932 erstmals aus Kaninchenleber isoliert (MANN, 1932).



## 2.6 Nicht-enzymatische Schutzsysteme

Wichtige nicht-enzymatisch antioxidativ wirksame Substanzen sind  $\beta$ -Carotin (Provitamin A),  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), sowie Ascorbinsäure (Vitamin C) und L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin (GSH). Letztere Verbindung gilt als das wirksamste Antioxidans im zellulären System und kommt im Konzentrationsbereich mehrerer mM vor (ANDERSON, 1998).

### 2.6.1 Redoxsystem GSx

Der zelluläre Gehalt an Gesamtglutathion (GSx) setzt sich aus den Gehalten aus GSH und GSSG zusammen. GSH ist ein Tripeptid der Aminosäuren  $\gamma$ -Glutamin, Cystein und Glycin. Die Synthese von GSH erfolgt durch die Verknüpfung von L-Glutaminsäure mit L-Cystein und der darauffolgenden Kondensation mit Glycin unter Beteiligung der Adenosin-5'-triphosphat-(ATP)-abhängigen Enzyme  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (EC 6.3.2.2) und Glutathionsynthetase (EC 6.3.2.3) (BERGMEYER et al., 1985).

Unter natürlichen Bedingungen liegt GSx zu über 98 % im reduzierten Status vor (ANDERSON, 1998). Aus zwei Molekülen GSH wird bei der Inaktivierung von Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden GPx-katalysiert [Rkt. 8] GSSG gebildet. Die Strukturen beider Formen zeigt Abbildung 3.

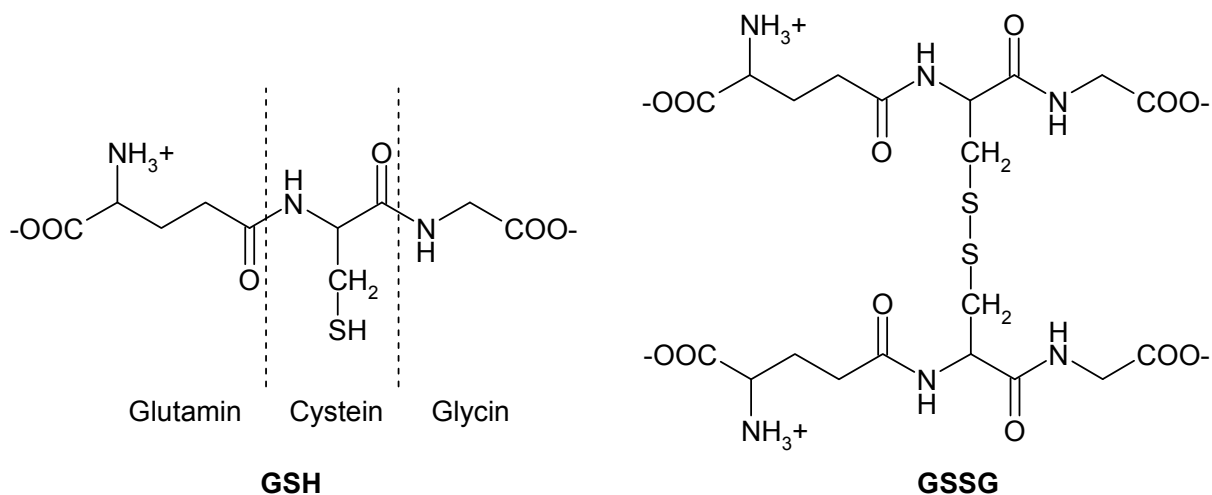


Abbildung 3: Strukturformeln von GSH und GSSG

GSH ist an zahlreichen biochemischen Prozessen beteiligt. Durch Übertragung von  $\gamma$ -L-Glutamyl-Resten auf Aminosäuren bzw. bestimmte Dipeptide bewirkt GSH den Transport von Aminosäuren und niedermolekularen Peptiden durch die Zellmembran. Zudem spielt GSH eine Rolle bei der Proteinsynthese und dem



Proteinabbau, reguliert sowohl direkt als auch indirekt die Aktivität vieler Enzyme und ist an verschiedenen metabolischen Reaktionen beteiligt (MEISTER und ANDERSON, 1983).

Die vermutlich wichtigste Aufgabe des GSx liegt in seiner Fähigkeit, oxidativ wirksame Stressoren zu inaktivieren und somit die Zelle vor Schäden zu schützen. Setzt dieser Mechanismus (siehe Abbildung 2 und Rkt. 8) ein, so führt dies zu einer Abnahme des zellulären GSH-Gehaltes und zum Anstieg des GSSG-Gehaltes. Da intrazelluläres GSSG in höheren Konzentrationen toxisch wirkt, schleust die Zelle den größten Teil des GSSG aus, so dass bei kultivierten Zellen GSSG hauptsächlich im Nährmedium nachgewiesen wird (SALNIKOW et al., 1994; MEISTER und ANDERSON, 1983).

## 2.7 Lipidperoxidation

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung von oxidativem Stress ist die Detektion bereits entstandener oxidativer Schäden im zellulären System. MDA entsteht durch Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA) und die MDA-Bildung wird als Indikator für oxidativ bedingte Toxizitätswirkungen und entsprechende Schädigungen *in vivo* und *in vitro* genutzt (PEDRAJAS et al., 1995; TOMITA und OKUYAMA, 1990).

Abbildung 4 stellt die in den Kapiteln 2.3 – 2.7 beschriebenen Zusammenhänge zum oxidativen Stress, verursacht durch den Einfluss von Xenobiotika im zellulären System, dar. Es sind die drei Faktoren der ROS-Bildung, ROS-Entgiftung und ROS-Wirkung schematisch aufgeführt.

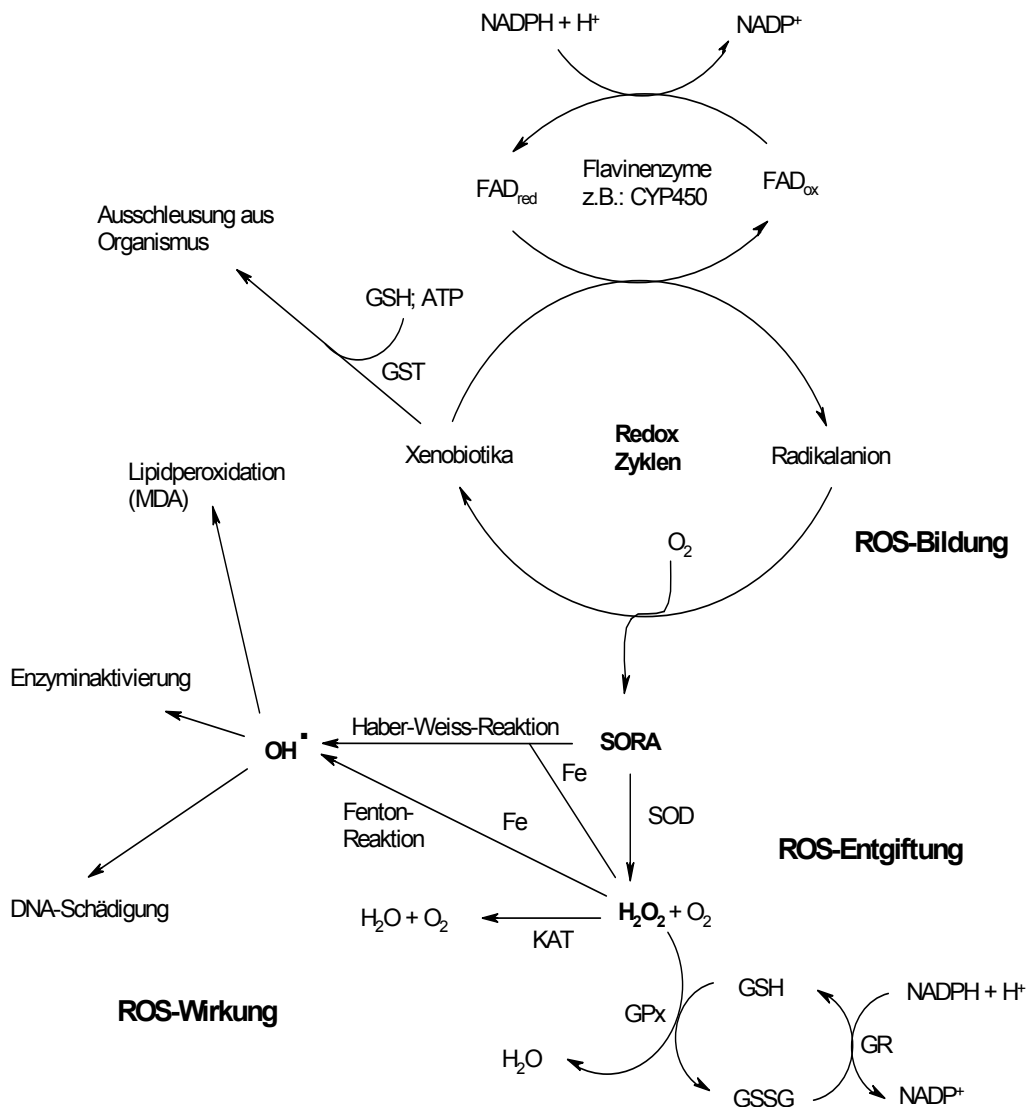


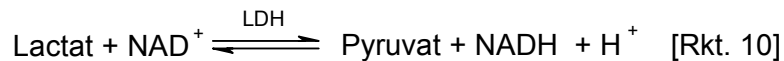
Abbildung 4: Entstehung und Wirkung von oxidativem Stress, ausgelöst durch Xenobiotika

## 2.8 Zytotoxizität

Das zytotoxische Potential der Proben auf das verwendete biologische Untersuchungsmaterial wird parallel bei jeder Inkubationsreihe bestimmt, um falsch positive Ergebnisse durch die Überlagerung zytotoxischer Effekte auszuschließen. In der Literatur werden vor allem die Neutralrot-, Kristallviolett-, Trypanblau- und Alamar-Blue-Färbung (HOLLERT et al., 2000; FRANZBLAU et al., 1998; GENELL et al., 1997; LANGE et al., 1995; CASTANO et al., 1994; BABICH und BORENFREUND, 1987), sowie die enzymatische Bestimmung von freigesetzter Lactatdehydrogenase (LDH) (ARECHABALA et al., 1999; DECKER und LOHMANN-MATTHES, 1988) beschrieben. Der Nachteil der erstgenannten Färbungen ist, dass die Zellen direkt gefärbt werden und somit ein Weiterarbeiten mit diesen nicht mehr möglich ist. Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis der Zytotoxizität über die Freisetzung der LDH.

### 2.8.1 Lactatdehydrogenase LDH

LDH (EC Nr. 1.1.1.27) ist eine Oxidoreduktase, die die Übertragung von Wasserstoff [Rkt. 10] katalysiert. Die von dem Substrat (Lactat) abgegebenen Reduktionsäquivalente werden von LDH stereospezifisch und stereoselektiv auf das Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>) übertragen. Diese Reaktion ist reversibel.



Das Enzym LDH ist im Zytoplasma lokalisiert. Es weist ein Molekulargewicht von 140 kDa auf und liegt als Tetramer vor (LE VAN und GOLDBERG, 1991). Eine Membranschädigung der Zellen, wie sie unter anderem durch Schadstoffe induziert werden kann, führt zu einer verstärkten Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile und somit zu einer Anreicherung des relativ stabilen Enzyms LDH im umgebenden Nährmedium. LEGRAND et al. (1992) zeigten, dass extrazelluläres LDH mit der Zahl der toten Zellen korreliert und somit einen Parameter für Zellzerstörung bzw. Zelltod darstellt. Die LDH-Bestimmung gilt als ein etablierter Endpunkt für die Zytotoxizität.

### 2.9 Beurteilung von *in vitro* Toxizitätstests

Zur Beurteilung von *in vitro* Toxizitätstests kann neben dem sogenannten EC<sub>50</sub>-Wert die Benchmark-Konzentration herangezogen werden (mündliche Mitteilung WOSNIOK).

Analog zum LC<sub>50</sub>-Wert wird im *in vitro* Toxizitätstest eine 50 %-ige Effektkonzentration, der sogenannte EC<sub>50</sub>-Wert festgelegt. Es handelt sich dabei um die Schadstoffkonzentration, bei der 50 % des maximalen Effektes messbar ist. Um diese oft angewandte Auswertemethode (Leuchtbakterientest, Algenhemmtest) durchführen zu können, muss der maximale Effekt auf 100% begrenzt sein. Toxizitätstests, bei denen der maximale Effekt nicht begrenzt ist, können über die Benchmark-Konzentration beurteilt werden. Die Benchmark-Konzentration ist eine bei einem bestimmten Effekt gegebene Konzentration der Probe, anhand der die Messergebnisse eines Toxizitätstests untereinander verglichen werden können.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 EPC-Zellen**

Die EPC-Zellen stammen vom Karpfen (*Caprinus carpio L.*), auf deren Haut eine durch Herpesviren induzierte hyperplastische Lesion (Warze) entstanden ist.

EPC-Zellen wachsen über einen weiten Temperaturbereich von 15 bis 33 °C, sind in der Lage zwischen 7 und 10 °C für mehrere Monate ohne Änderung ihrer Wachstumseigenschaft zu überleben und sterben ab einer Temperatur von 37 °C ab. Die epitheloiden Zellen wachsen adhärent und bilden einen einlagigen Zellrasen aus, bevor die Zellteilung eingestellt wird. Die EPC-Zellen stellen aufgrund ihrer guten Temperaturresistenz und einer Teilungsrate von 1 zu 10 ein geeignetes Material für toxikologische Untersuchungen dar (FIJAN et al., 1983). Zudem reagieren sie auf Veränderungen in den osmotischen Bedingungen relativ unempfindlich, wie HASHIMOTO et al. (1999) zeigten.

Die EPC-Zellen weisen generell, wie viele andere permanente Kulturen auch, keine ausreichende Stoffwechselaktivität mehr auf. Um diese zu erhöhen, kann man den EPC-Zellen isolierte Enzymsysteme zusetzen (KAMMANN et al., 2001).

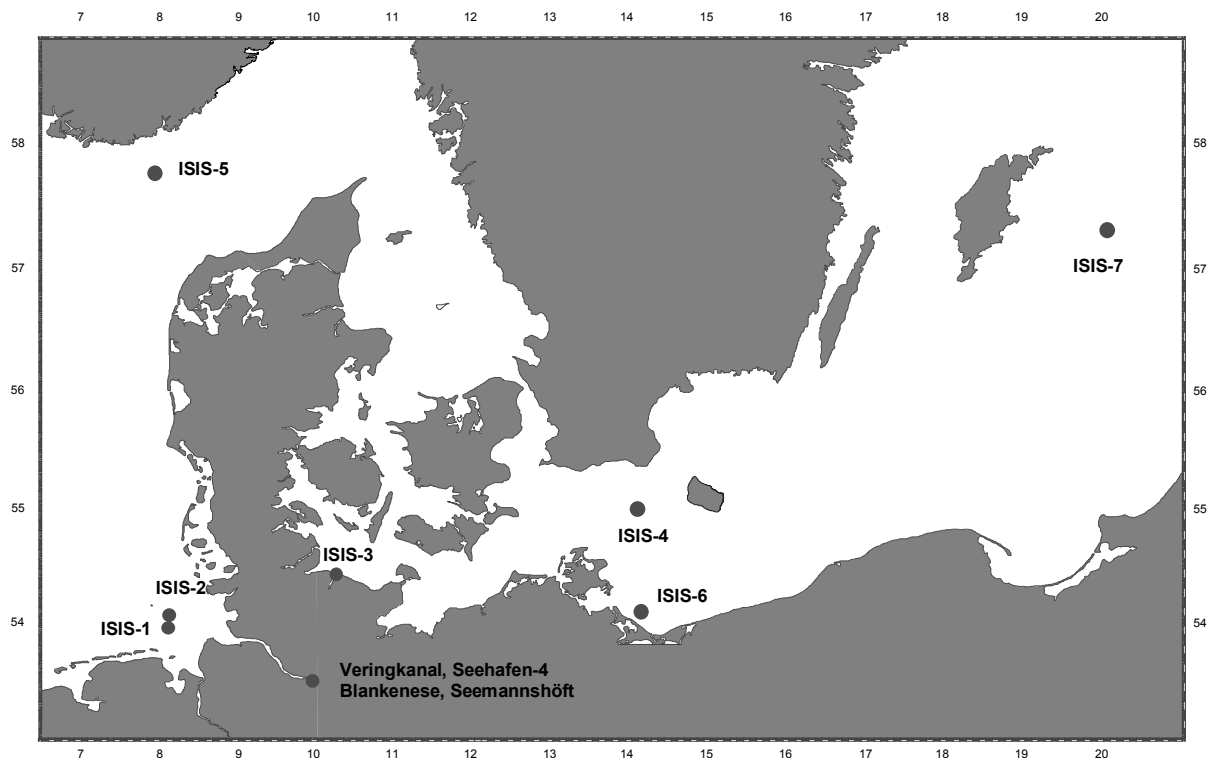
Die Zellen werden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäßen in einem Standardmedium (Minimal Essential Medium nach Eagle mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und nicht-essentiellen Aminosäuren) bei 25 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach dem Passagieren der Zellen bilden sie nach 7 bis 14 Tagen wieder einen geschlossenen Zellrasen aus. Laut Angabe ist dieser bei 4-10°C für mehrere Wochen verwendbar (KAMMANN et al., 2000).

Die für die Untersuchungen verwendeten Zellen befanden sich am Ende ihrer exponentiellen Wachstumsphase. Hierdurch war gewährleistet, dass bei allen Untersuchungen sowohl Zellqualität als auch Zellzahl (ca. 2,5 Millionen /Kulturflasche) gleichbleibend waren (BUNKE, 2000). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Institut für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei. Artfremde Enzymsysteme wurden nicht zugesetzt.

#### **3.2 Sedimentproben**

##### **3.2.1 Probennahme**

Die untersuchten marinen Sedimentproben ISIS 1-7 wurden an den in Abbildung 5 dargestellten Stationen vom Forschungsschiff „Gauss“ des BSH im Zeitraum 2000-2002 genommen.



**Abbildung 5: Lage der Stationen ISIS 1-7 sowie der Sedimente aus dem Hamburger Hafen (Veringkanal und Seehafen 4) und der Elbe (Blankenese und Seemannshöft)**

Die Probenahme der Sedimente ISIS 1-4 und ISIS 6 wurde mit einem Kastengreifer, die Beprobung von ISIS 5 und 7 mittels sogenanntem Gemini-Corer durchgeführt (MURDOCK, 1991). Ferner erfolgte aus einem Probenaliquot die Probencharakterisierung, welche in Tabelle 5 dargestellt ist (ISIS, 2001; ISIS, 2002).

**Tabelle 5: Probencharakterisierung ISIS 1-7** TC: Gesamtkohlenstoff, TOC: Gesamt organischer Kohlenstoff, N: Gesamtstickstoff, WG: Wassergehalt

Station	Position	Schicht [cm]	Wassertiefe [m]	Gerät	TC %	TOC %	N %	WG %
ISIS-1	Helgoland	0-2	19	K-Greifer	2,46	0,82	0,09	36,6
ISIS-2	Helgoland	0-2	20	K-Greifer	3,44	1,49	0,17	53,8
ISIS-3	Kieler Förde	0-2	20	K-Greifer	5,39	4,79	0,48	61,2
ISIS-4	Arkonabecken	0-2	49	K-Greifer	5,41	5,23	0,65	81,4
ISIS-5	Skagerrak	0-4	510	G-Corer	3,53	2,22	0,28	68,3
ISIS-6	Odermündung	0-2	16	K-Greifer	0,23	0,21	0,05	21,9
ISIS-7	Gotlandtief	0-4	247	G-Corer	11,06	10,78	1,29	95,8

Die Sedimentproben Veringkanal und Seehafen-4 wurden vom Amt für Strom und Hafen der Hansestadt Hamburg (HH) gezogen und zur Verfügung gestellt. Das Probenmaterial Seemannshöft und Blankenese wurde mittels einer ufernahen,

stationären Schwebstofffalle gewonnen und von der Arbeitsgemeinschaft Elbe, Aussenstelle Hamburg, zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich im Vergleich mit den bisherigen Proben nicht um klassische Sedimentproben, sondern um schwebstoffbürtige Proben (ARGE-ELBE, 2000).

### 3.2.2 Extraktion der marinen Sedimente ISIS 1-7

Für die Extraktion der marinen Sedimente ISIS 1-7 war es wichtig, möglichst alle enthaltenen Schadstoffe zu erfassen. Die Extraktion der Feuchtsedimente erfolgte mittels sequentieller Ultraturax-Kaltraktion (UTE) mit Aceton und *n*-Hexan. Die UTE erwies sich in einem mit dem BSH durchgeführten Extraktionsvergleich des ISIS-Verbundprojektes mit zwei weiteren Soxhletextraktionsmethoden als die geeignetste Extraktionsmethode in Hinsicht auf die Ergebnislage der biologischen und chemischen Untersuchungen wie Probenhomogenität, extrahierbare Probenmenge und biologische Wirkung (ISIS, 2001). Die Extraktion der Sedimente ISIS 1- 7 erfolgte im BSH.

Es wurde in der Stufe I ein Rohextrakt (Aceton/*n*-Hexan) erhalten. Für die zweite Stufe wurde eine Fraktionierung nach Molekülgröße mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) an Biobead SX3 mit einem binären Elutionsmittel aus Ethylacetat und *cyclo*-Hexan durchgeführt. In der Vorfraktion (VF) wurden vor allem biogene Makromoleküle wie Huminsäuren abgetrennt. In der Hauptfraktion (HF) war der Hauptanteil der anthropogenen Schadstoffe enthalten. Die notwendige Abtrennung elementaren Schwefels, der z.T. negative Auswirkungen auf eingesetzte Biotests besitzt (SALIZZATO et al., 1998; JACOBS et al., 1992), erfolgte in der Nachfraktion (NF). Die NF wurde nach einem Schwefel-Cleanup über aktiviertes Kupferpulver wieder mit der HF vereint, da die NF noch mehrkernige polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) aufwies. In der Stufe III erfolgte die Trennung der Schadstoffe der HF nach Polarität mittels Normalphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (NP-HPLC) in sechs Unterfraktionen (HPLC-F1 bis F6). Toxikologisch relevante Fraktionen der dritten Stufe wurden in der Stufe IV feinfractioniert mit der Zielsetzung, die verursachenden Schadstoffe als Einzelsubstanzen für die Biotests zu separieren. Das chromatographische System der Stufen III und IV bestand aus einer chemisch modifizierten Kieselgelsäule (Cyanopropyl) und einem ternären Elutionsgradienten aus *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol.

Die schematische Darstellung der Fraktionierung erfolgt in Abbildung 6.

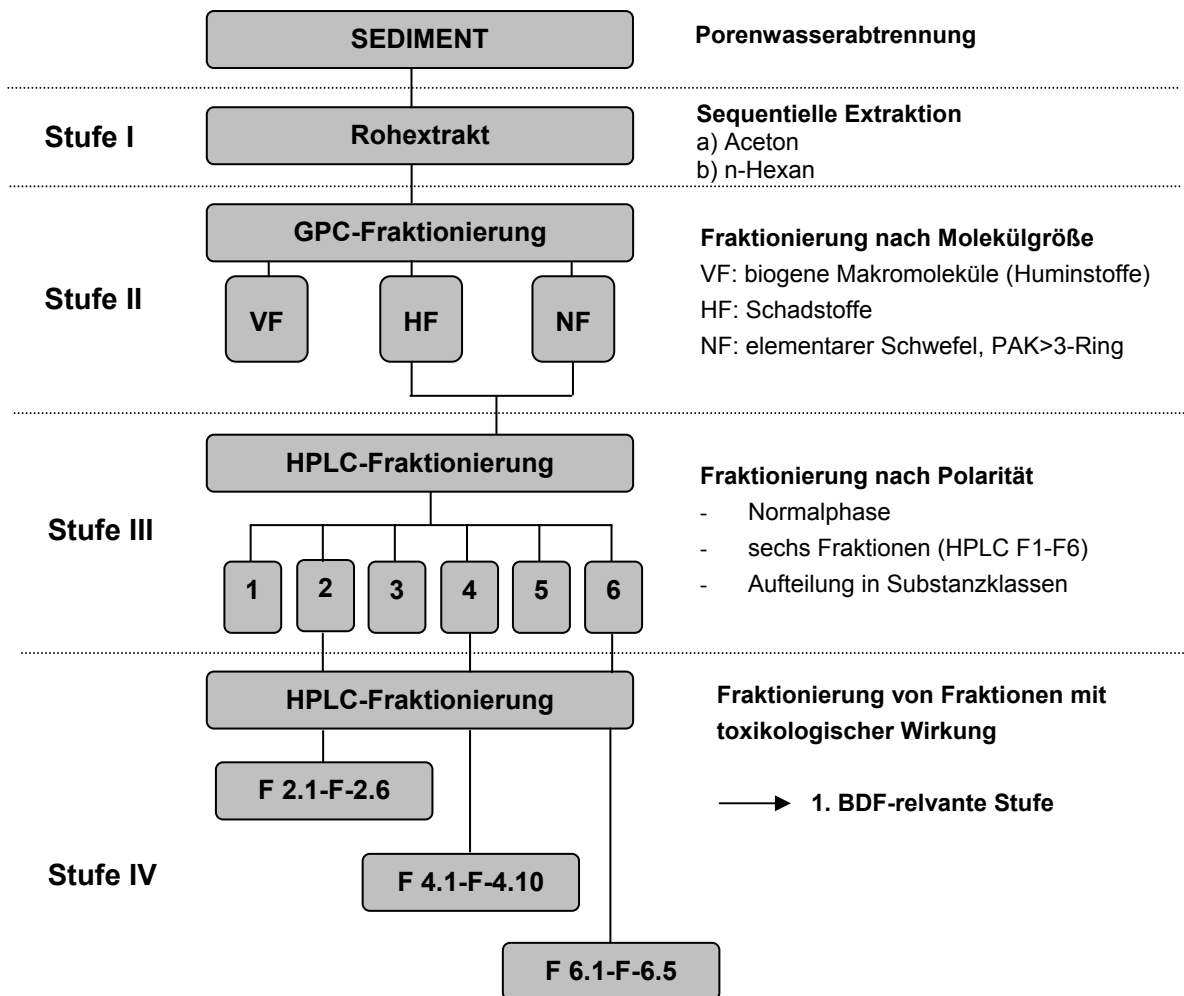


Abbildung 6: Schema zur Extraktion und Fraktionierung der Sedimentproben ISIS 1-7

Die Extraktion der Sedimente und die Fraktionierung mittels NP-HPLC erfolgte am BSH; die GPC-Fraktionierung wurde bei einem Projektpartner an der Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie, durchgeführt.

Für die biologischen Untersuchungen der Stufen I-IV war ein Lösungsmittelwechsel zu Dimethylsulfoxid (DMSO) notwendig, da biologisches Material durch die zur Extraktion und Fraktionierung der Proben verwendeten organische Lösungsmittel (siehe Abbildung 6) schwerwiegend geschädigt würden (ISIS, 2001; BUNKE, 2000). Parallel zu den Probenextrakten und -fraktionen wurden Methodenblindwerte und Lösungsmittelblindwerte produziert, anhand derer die Biotests in Hinblick auf Kompatibilität mit den verwendeten Lösungsmitteln und stationären Phasen überprüft wurden.

### 3.2.3 Extraktion der Elbsedimente und der Sedimente Hamburger Hafen

Neben den marinen Sedimenten ISIS 1-7 wurden Untersuchungen an chemisch höher belasteten Sedimenten aus der Elbe und dem Hamburger Hafen durchgeführt.

Diese Untersuchungen sollten dazu dienen, die Effekte der marinen Sedimentextrakte vergleichend einstuft zu können. Es galt, eine geeignete Extraktionsmethode zu finden, da die zur Verfügung stehende Laborausüstung die Durchführung der UTE nicht zuließ.

Es wurde ein Extraktionsvergleich zwischen der Soxhletextraktion (MEYER, 1999; KRENGEL-ROTHENSEE, 1993; PASCHKE et al., 1993) und der Ultraschallextraktion (MEYER 1999; ESCHENBACH et al., 1994; WISCHMANN et al., 1996) für vier ausgewählte PAK-Metabolite durchgeführt. Die Auswahl von PAK-Metaboliten beruht auf deren bekanntem oxidativen Potential im biologischen System (BABU et al., 2001; ÖLLINGER und BRUNMARK, 1991). Die Bestimmung der Extraktionsausbeute erfolgte durch die Dotierung eines als unbelastet geltenden Tiefseesedimentes aus der Biscaya.

Nach MEYER (1999) eignen sich unpolare bis mittelpolare Extraktionsmittel wie *n*-Hexan, *cyclo*-Hexan, Toluol, Dichlormethan, Aceton sowie Gemische dieser Lösungsmittel zur Extraktion. Aufgrund der Ergebnisse von WISCHMANN et al. (1996), BODZEK et al. (1993), ESCHENBACH et al. (1994) und MUELLER et al. (1991) wurde Dichlormethan als Extraktionsmittel gewählt.

Die genaue Durchführung der Extraktionsmethoden ist unter 9.15 beschrieben.

### **3.2.3.1 Überprüfung der Extraktionsausbeute**

Die Überprüfung der Extraktionsausbeute erfolgte über Umkehrphasen-(RP)-HPLC mit Detektion im ultravioletten Spektralbereich (UVD) bei 254 nm, modifiziert nach MEYER (1999). Die Chromatographie der über Festphasen gereinigten Extraktionslösungen wurde an einer RP-18 PAK-III-Spezialsäule, mittels eines binären Gradienten aus Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) durchgeführt. Die Ergebnisse sind neben einem Standardchromatogramm unter Abbildung A17 dargestellt.

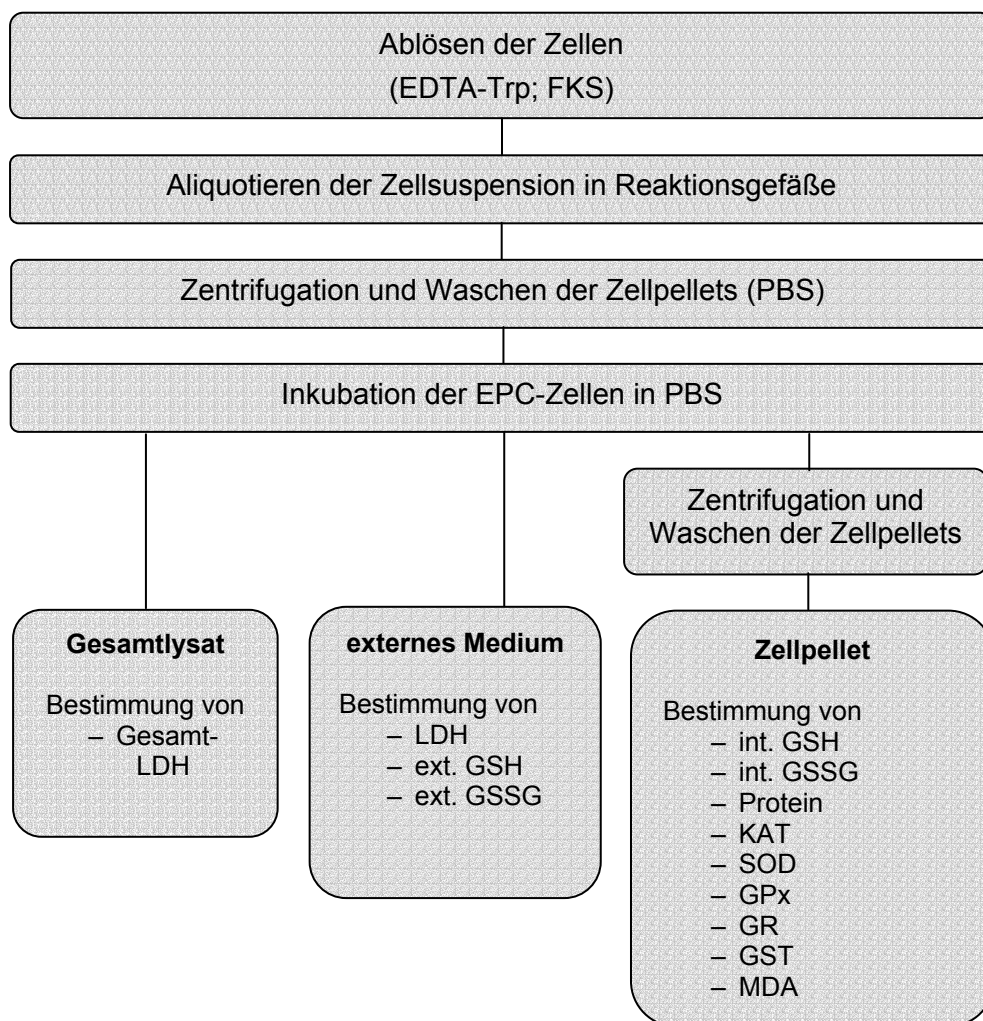
### **3.3 Zellaufarbeitung und Inkubation**

Die Aufarbeitung der Zellen wurde modifiziert nach KAMMANN et al. (2001) durchgeführt.

Die über Adhäsionsproteine am Gefäßboden haftenden Zellen wurden zunächst durch Zugabe von Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (Trp-EDTA)-Lösung von diesem gelöst. Die Proteinbindungen sind über Calcium- und Magnesiumionen stabilisiert. EDTA komplexiert Calcium und Magnesium, so dass die Bindung zum Gefäßboden geschwächt wird und Trypsin die Proteinbindungen leichter spalten kann. EDTA wirkt jedoch in höheren Konzentrationen zytotoxisch und Trypsin lysiert nach längerer Einwirkzeit die Zellmembran; daher wurde nach vollständigem Ablösen der Zellen



sofort FKS, welches Calcium- und Magnesiumionen und trypsininhibierende Serumproteine enthält, hinzugegeben. Hierdurch wird die Trypsinaktivität gestoppt und ein Überschuss an zweiwertigen Ionen erzeugt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in Reaktionsgefäße aufgeteilt und gewaschen. Nach Zugabe der Pufferlösung PBS (phosphate buffered saline) erfolgte die Inkubation. Es wurden parallel Kontrollwerte und Positivkontrollen mitgeführt. Ein Aliquot der Zellsuspension diente der Gesamt-LDH-Bestimmung als Bezugsgröße für die Bestimmung des zytotoxischen Potentials der eingesetzten Proben. Die Durchführung ist im Anhang 9.1 und 9.2 dargestellt. In Abbildung 7 ist schematisch die Aufarbeitung der Zellen und die indirekte Inkubation in Reaktionsgefäßen dargestellt.



**Abbildung 7: Schema der Zellaufarbeitung und indirekte Inkubation in Reaktionsgefäßen**

Bei der direkten Inkubation wurden die Proben direkt in die Zellkulturflaschen gegeben. Anschliessend erfolgte die Aufarbeitung der Zellen analog Abbildung 7 bis zum Erhalt der Zellpellets.

Bei der direkten Inkubation war pro Probe eine Zellkulturflasche nötig, wodurch in etwa die zehnfache Menge an Zellkulturflaschen im Vergleich zur indirekten Inkubation, mit der Möglichkeit zur Aliquotierung der Zellsuspension, notwendig war. Aus diesem Grund wurde die direkte Inkubation nur im Rahmen der Methodenentwicklung und für ausgewählte Proben angewandt. Für die Aufgabenstellung der Durchführung eines Toxizitätsscreenings im Rahmen der BDF wäre die direkte Inkubation nicht praktikabel gewesen, da die Anzahl der Zellkulturflaschen den limitierenden Faktor bei den Untersuchungen darstellte.

### 3.4 Kalibrierstandards

Für die Kalibrierung der photometrischen Bestimmungsmethoden in den EPC-Zellen wurden entsprechende Produkte der Firma Sigma (Deisenhofen) eingesetzt. Bei der Angabe der Ergebnisse ist zu beachten, dass es sich jeweils um Äquivalentgehalte der Enzymaktivitäten bzw. -gehalte handelt, da keine reinen Standardsubstanzen aus den EPC-Zellen zur Verfügung standen. In Tabelle 6 sind die verwendeten Enzymstandards aufgeführt.

**Tabelle 6: Angaben zu den verwendeten Kalibrierstandards**

Enzym	isoliert aus
SOD	Rindererythrozyten
KAT	Rinderleber
GPx	Rindererythrozyten
GR	Backhefe
GST	Pferdeleber
GSH, GSSG	synthetische Derivate
LDH	Rinderherz
Protein	Rinderserumalbumin

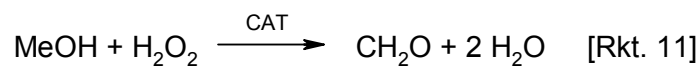
### 3.5 SOD-Bestimmung

Die SOD-Bestimmung wurde nach SUN et al. (1988) durchgeführt. Die photometrische Methode basiert auf der Reduktion von Nitroblue Tetrazolium (NBT) durch SORA und wird bei 590 nm verfolgt. Die Bildung der Superoxidradikale erfolgt durch ein Radikal-generierendes System aus Xanthin und Xanthin-Oxidase. In Konkurrenz zur NBT-Reduktion steht die durch SOD katalysierte, enzymatische Reduktion der SORA zum Wasserstoffperoxid (siehe [Rkt. 6]). Im Verlauf der Reaktion kommt es zur Extinktionsabnahme bedingt durch die NBT-Reduktion, welche mit dem Gehalt an SOD invers proportional korreliert.

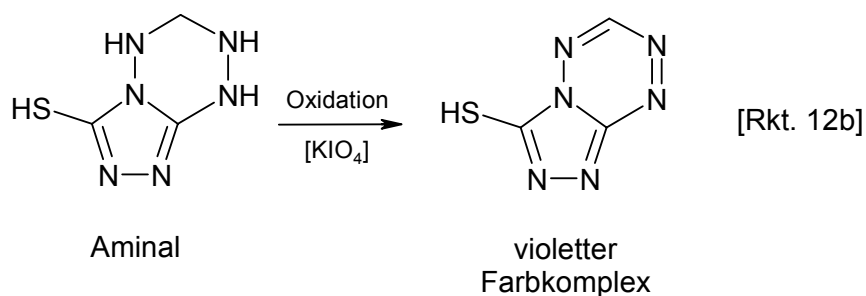
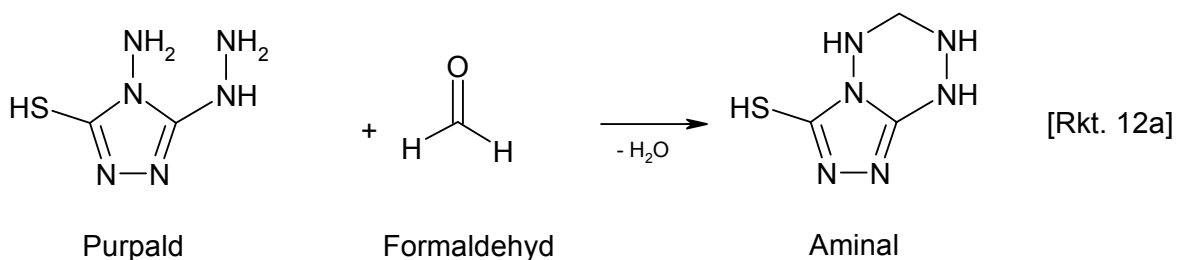
Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 0,6 – 2,9 U/mL SOD als Endpunktbestimmung. Die SOD-Aktivität wird auf den jeweiligen Proteingehalt der Zellen, in Units (U)/mg Protein angegeben. Die Durchführung ist im Anhang 9.3 beschrieben.

### 3.6 KAT-Bestimmung

Die Bestimmung der KAT erfolgte nach der Methode von JOHANSSON und BORG (1988) und basiert auf der spezifischen Bildung von Formaldehyd aus Methanol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch die peroxidative Aktivität der KAT [Rkt. 11]. Die peroxidative Aktivität der KAT ist bevorzugt bei geringeren Konzentrationen von Wasserstoffperoxid deutlich höher. Es werden dadurch auch andere Wasserstoffdonatoren, wie niedere aliphatische Alkohole (Methanol, Ethanol) als Substrat bevorzugt. Diese Eigenschaft ist spezifisch für die KAT und wird zur quantitativen Bestimmung herangezogen. Andere Peroxidasen nutzen Methanol und Ethanol nicht als Substrat (JOHANSSON und BORG, 1988).



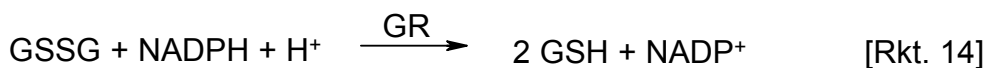
Das gebildete Formaldehyd wird mit 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald<sup>®</sup>), einem spezifischen Reagenz auf Aldehyde, umgesetzt [Rkt. 12a]. Nach Oxidation mit Kaliumperiodat [Rkt. 12b] wird der violett gefärbte Farbkomplex bei 540 nm spektrophotometrisch vermessen (JOHANSSON und BORG, 1988; DURST und GOKEL, 1978).



Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibriergeraden als Endpunktbestimmung in einem Arbeitsbereich von 0,25 bis 8 µg/mL KAT. Die Angaben der KAT-Gehalte erfolgten in U/mg Protein. Die genaue Durchführung ist im Anhang 9.4 beschrieben.

### 3.7 GPx-Bestimmung

Die Bestimmung der GPx wurde photometrisch nach CHIU et al. (1976) durchgeführt. Hierbei erfolgt zunächst die Bildung von GSSG durch die Reduktion eines organischen Peroxides durch GPx. Das Messprinzip basiert auf der kinetischen Verfolgung der NADPH-Oxidation bei 340 nm, initiiert durch die enzymatische Reduktion des entstandenen GSSG mittels GR [Rkt. 13 und 14].



Die Quantifizierung erfolgte anhand einer externen Kalibrierung im Arbeitsbereich von 1,7 – 13,8 U/mL. Die kinetische Messung wurde bei 340 nm in zehn Messzyklen durchgeführt. Die Angabe der GPx-Aktivität erfolgte, bezogen auf den jeweiligen Proteingehalt der Zellen, in U/mg Protein. Die genaue Durchführung ist im Anhang 9.5 beschrieben.

### 3.8 GR-Bestimmung

Die GR-Bestimmung erfolgte photometrisch durch kinetische Verfolgung der NADPH-Oxidation bei 340 nm durch die enzymatische Reduktion von GSSG durch GR modifiziert nach WILHELM et al. (2001). Die Abnahme der NADPH-Konzentration ist direkt proportional zur GR-Aktivität. In Reaktion 14 ist die der Bestimmung zu Grunde liegende Reaktion dargestellt.

Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung im Arbeitsbereich von 0,17 – 3,4 U/mL. Die kinetische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm in sieben Messzyklen durchgeführt. Die Angabe der GR-Aktivität erfolgte, bezogen auf den jeweiligen Proteingehalt der Zellen, in U/mg Protein. Zur Durchführung siehe Anhang 9.6.

### 3.9 GST-Bestimmung

Die Bestimmung der GST erfolgte nach der Methode von HABIG et al. (1974) mit Modifikation nach WHEATLEY et al. (1994). Die Methode basiert auf der durch GST katalysierten Reaktion von 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) mit GSH zum entsprechenden Thioether-Konjugat (Abbildung 8). Laut HABIG et al. (1974) ist die Konjugatbildung proportional zur Enzymaktivität und kann zur photometrischen Aktivitätsbestimmung der GST herangezogen werden, indem die Bildung des Konjugates beim Absorptionsmaximum von 340 nm kinetisch verfolgt wird.

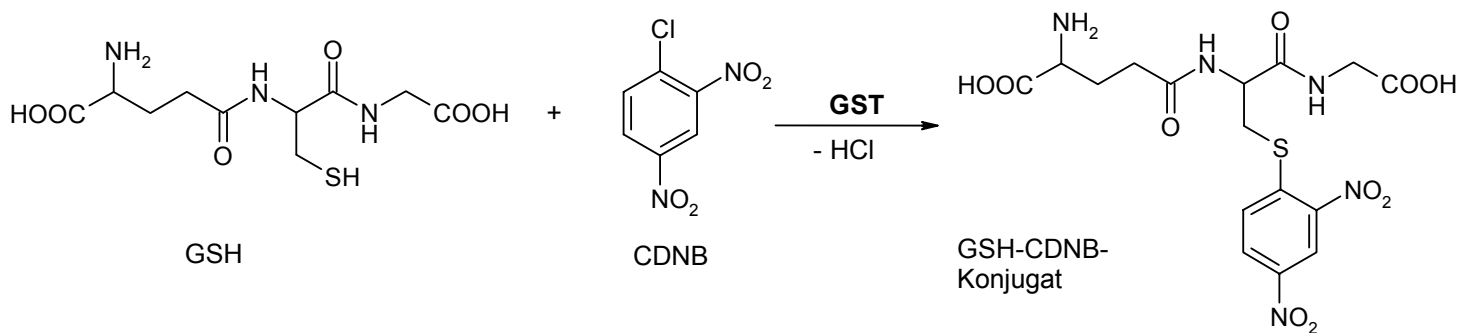


Abbildung 8: GST-katalysierte Konjugation von GSH und CDNB

Die Quantifizierung erfolgte über die externe Kalibrierung im Arbeitsbereich von 40 – 1400 mU/mL. Die kinetische Messung wird bei 340 nm in 20 Messzyklen durchgeführt. Die Angabe der GST-Aktivität wurde, bezogen auf den jeweiligen Proteingehalt der Zellen, in mU/mg Protein angegeben. Die genaue Durchführung ist im Anhang 9.7 beschrieben.

### 3.10 Bestimmung von GSH-Konjugaten

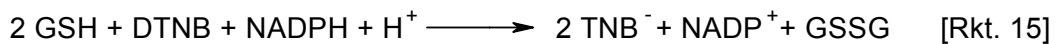
Der qualitative Nachweis der Entstehung von Thioether-Konjugaten aus GSH und entsprechenden Xenobiotika erfolgte anhand spezifischer massenspektrometrischer Detektion über AP-ESI-MSD (atmosphere pressure - electrospray ionisation - mass selective detection) im positiven Ionisationsmodus nach vorangegangener RP-HPLC Trennung an RP-18. Die Durchführung ist im Anhang 9.8 beschrieben.

### 3.11 GSx-Bestimmung

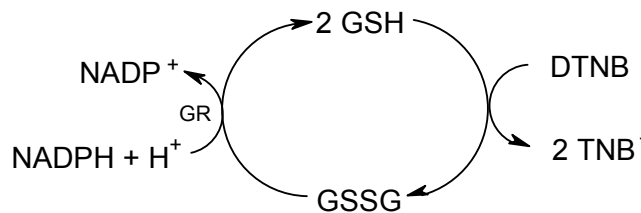
Zur Quantifizierung von GSx lässt sich neben modifizierten photometrischen Bestimmungen (VANDEPUTTE et al., 1994; BAKER et al., 1990; TIETZE, 1969) auch die Detektion mittels HPLC heranziehen. Während WINTERS et al. (1995) eine Fluoreszenz-Detektion nach Derivatisierung mit *N*-(1-pyridyl)-maleimid bzw. LENTON et al. (1999) mit *ortho*-Phthalaldehyden vorschlagen, beschreiben ASENSI et al.

(1994) die Bestimmung der GST-katalysierten Konjugatbildung von GSH mit Chlordinitrobenzol im Ultraviolett-Bereich bei 340 nm.

Die GSx-Bestimmung wurde im Rahmen dieser Arbeit nach der Methode von VANDEPUTTE et al. (1994) durchgeführt und beruht darauf, dass das Nachweisreagenz 5-5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, *Ellman's Reagenz*) nach Reaktion 15 in Gegenwart katalytischer Mengen GSH durch Zugabe von NADPH/H<sup>+</sup> reduziert und das farbige Anion 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB<sup>-</sup>) gebildet wird (TIETZE, 1969).



Die Bildung des TNB-Anions wird zudem durch einen zyklischen Prozess, der in Abbildung 9 dargestellt ist, begünstigt. Hierbei wird im ersten Schritt GSH mit DTNB zu GSSG stöchiometrisch unter Bildung von 2 TNB-Anionen oxidiert. GSSG wird in einem zweiten Schritt enzymatisch durch GR zu GSH reduziert, das wieder in den zyklischen Prozess eintritt.



**Abbildung 9: Zyklischer Prozess der 5-Thio-2-nitrobenzoat-Bildung**

Bei diesen Reaktionen erfolgt eine Akkumulierung von NADP<sup>+</sup> und des farbigen TNB-Anions. Die Bildung von TNB<sup>-</sup> erfolgt proportional zur GSx-Konzentration und kann photometrisch bei  $\lambda_{\text{max}}$  412 nm verfolgt werden (ANDERSON, 1985; OWENS und BELCHER, 1965).

Da bei dieser Reaktion sowohl GSH als auch GSSG erfasst werden, wird für die separate GSSG-Bestimmung die freie Thiofunktion des GSH maskiert und somit dem zyklischen Reaktionsablauf entzogen. Als Derivatisierungsmittel werden 4-Chlor-7-trifluormethyl-1-methylchinolin, *N*-Ethylmalimid oder 2-Vinylpyridin verwendet. 2-Vinylpyridin hat den Vorteil, dass es vor der enzymatischen Messung nicht entfernt werden muss (MOURAD et al., 2000; BAKER et al., 1990; ANDERSON, 1985; GRIFFITH, 1980).

Die Zelle schleust intern gebildetes GSSG größtenteils aus (MEISTER und ANDERSON, 1983). Um auch das ausgeschleuste (externe) GSSG zu erfassen, wurde dieses aus dem angesäuerten Inkubationsmedium bestimmt. Parallel hierzu

mußte GSH zur Berechnung der GSx-Gesamtbilanz (intern und extern) ebenfalls quantifiziert werden.

Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 0,5 – 8 µM GSH bzw. 0,25 – 8 µM GSSG. Die kinetische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm in 25 Messzyklen durchgeführt. Die Angabe der Glutathiongehalte erfolgte, bezogen auf den jeweiligen Proteingehalt der Zellen, in nmol/mg Protein. Die genaue Durchführung ist im Anhang 9.9 beschrieben.

### 3.12 Bestimmung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS)

Die Bestimmung der TBARS beruht auf der spezifischen Reaktivität von Thiobarbitursäure (TBA) mit Carbonylgruppen und erfolgte mittels des TBA-Assay nach UCHIYAMA u. MIHARA (1978), modifiziert für die Anwendung auf Zellmaterial nach KNÜPPEL (1995) und in der Wahl des Farbreagenzes nach HOVING et al. (1992). Letztere verwendeten statt TBA die empfindlichere 1,3-Diethyl-Thiobarbitursäure (DTBA) als Nachweisreagenz.

Aldehyde und Ketone, vor allem MDA, stellen charakteristische Lipidperoxidationsprodukte dar. Deren photometrische Messung erfolgt nach Komplexbildung zwischen MDA und TBA im sauren Milieu. Der in Abbildung 10 dargestellte gebildete Farbkomplex weist eine tiefrote Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 535 nm auf.

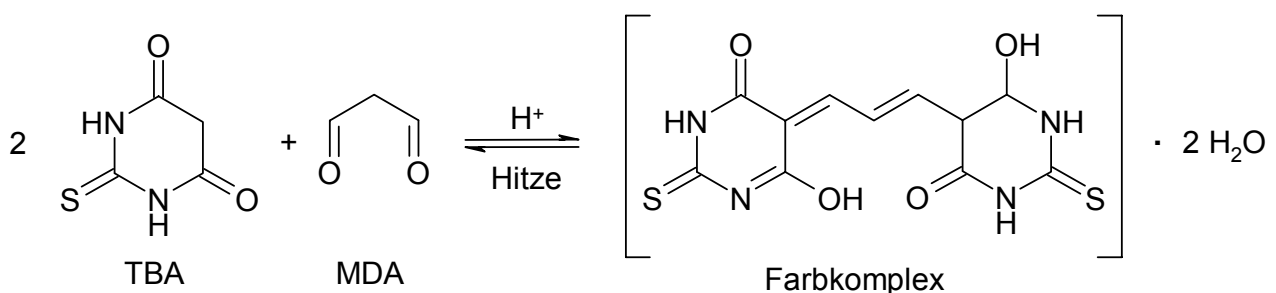


Abbildung 10: Bildung des TBA-MDA-Farbkomplexes

Die Bildung des Farbkomplexes ist nicht MDA-spezifisch, da strukturell ähnliche Verbindungen (Ketone, Aldehyde) im Probenmaterial ebenfalls detektiert werden (GUILLEN-SANS und GUZMAN-CHOZAS, 1998) und das Messergebnis des MDA verfälschen. Man bezeichnet diese Verbindungen in Summe mit MDA als TBARS.

MDA ist leicht flüchtig und dadurch nicht direkt erhältlich. Die Herstellung einer MDA-Stammlösung kann durch saure Hydrolyse geeigneter Ausgangsstoffe wie Malondialdehyd-bis(diethylacetal), Malondialdehyd-bis(dimethylacatal) oder 1,1,3,3-

Tetraethoxypropan mit Salzsäure oder Schwefelsäure (YEO et al., 1994; SQUIRES, 1990; ESTERBAUER et al., 1984; UCHIYAMA und MIHARA, 1978) erfolgen. Für die Herstellung der MDA-Standards wurde die Methode von BEHRENS und MADERE (1991) gewählt. Malondialdehyd-bis(dimethylacetal) wurde mit Schwefelsäure bei Raumtemperatur im Dunkeln hydrolysiert. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde durch photometrische Messung der UV-Absorption bei 245 nm unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes überprüft. Dabei zeigte sich, dass durch eine zweistündige Hydrolysezeit der vollständige Umsatz des Acetals zum MDA erreicht wurde. Zur Durchführung siehe Anhang 9.10 und 9.11.

### **3.13 Bestimmung von MDA mittels Ionenpaar-HPLC**

Um eine Aussage über den tatsächlichen Gehalt an MDA in der Probe treffen zu können, bietet sich die Anwendung spezifischer und empfindlicher HPLC-Methoden an. Hierbei finden verschiedene Trennungs- und Detektionsprinzipien Verwendung. PEDRAJAS et al. (1998) setzten MDA in der Probe vor der chromatographischen Trennung mit TBA um und detektierten den MDA-TBA-Komplex mittels UVD, während BERGAMO et al. (1998) und FUKUNAGA et al. (1998) die Fluoreszenzdetektion wählten. Alternativ wird eine Derivatisierung des MDA mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin beschrieben (TOMITA und OKUYAMA, 1990). Die chromatographische Trennung des freien MDA an einer Umkehrphase (ESTERBAUER et al., 1984) oder die Verwendung von Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH) als Ionenpaar-Reagenz (LAZZARINO et al., 1991), bzw. Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) nach KAWAMOTO et al. (1998), sind möglich.

Diese Methode gilt als MDA-spezifisch und sollte als Vergleich zur unspezifischen Bestimmungsmethode nach UCHIYAMA und MIHARA (1978) dienen. Zur Durchführung siehe Anhang 9.12.

### **3.14 LDH-Bestimmung**

Die LDH-Bestimmung erfolgte nach der Methode von DECKER und LOHMANN-MATTHES (1988) [Rkt. 10]. Das gebildete NADH reduziert FAD, welches an DT-Diaphorase gekoppelt ist, zu FADH<sub>2</sub>. Hierbei werden Elektronen auf das Farbreagenz *p*-Iodonitrotetrazolium übertragen, wobei Formazan gebildet wird, welches bei 490 nm spektrophotometrisch als roter Farbkomplex vermessen wird. Das gebildete Formazan ist der LDH-Aktivität der Probe proportional (ISHIYAMA et al., 1995; DECKER und LOHMANN-MATTHES, 1988).

Die Quantifizierung wurde mittels externer Kalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 10 – 150 U/L LDH als Endpunktbestimmung



durchgeführt. Die genaue Durchführung der Methode ist im Anhang 9.13 beschrieben.

### 3.15 Proteinbestimmung

Zellkulturen weisen als biologisches Material durch individuelle Wachstumsbedingungen unterschiedliche Zellzahlen je Zellkulturflasche auf. Um zu einem aussagekräftigen Ergebnis zu gelangen, und um die gemessenen Gehalte untereinander vergleichen zu können, wurde der Proteingehalt, der direkt mit der Zellzahl korreliert, als einheitliche Bezugsgröße gewählt. Die Korrelation des Proteingehaltes gegen das Volumen an Zellsuspension ist in Abbildung 11 dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,985$  dokumentiert den linearen Zusammenhang beider Parameter.

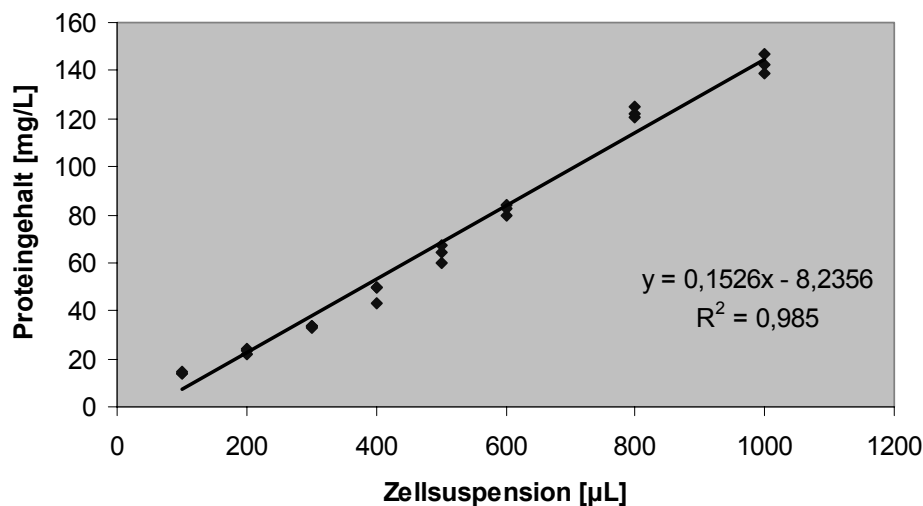


Abbildung 11: Korrelation Proteingehalt-Zellsuspension der EPC-Zellen

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach BRADFORD (1976). Die Methode ist sensitiv mit einer Nachweisgrenze von 5 mg/L. Sie beruht auf der unspezifischen Umsetzung von Proteinen mit dem Farbreagenz Coomassie Brilliant Blue G-250. Das Farbreagenz geht dabei eine kovalente Bindung mit den Aminogruppen der Proteine ein, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (rot) nach 585 nm (blau) erfolgt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach entsprechender Verdünnung direkt aus der Zellsuspension mittels externer Kalibriergeraden von Rinderserumalbumin (BSA)-Standards im Bereich von 10 – 200 mg/l. Die Durchführung ist im Anhang 9.14 beschrieben.

### 3.16 Statistische Auswertung

Es wurden folgende statistische Verfahren angewandt: Die Berechnung der Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) für die verwendeten photometrischen Methoden erfolgte aus der jeweiligen Grundkalibrierung nach DIN 32634. NG und BG für die HPLC-Methode wurden nach MEYER (1996) aus dem Signal / Rausch-Verhältnis abgeschätzt.

Mittels Ausreißertest nach Grubbs (DIN 53804) wurden erkannte Ausreißer aus der Datenmatrix entfernt.

Über den F-Test erfolgte die Überprüfung auf Varianzenhomogenität der externen Kalibrierungen.

Mittels des Mittelwert-*t*-Tests wurden signifikante Unterschiede zweier Stichprobenreihen bei unbekanntem aber gleich großen Varianzen bestimmt (DIN 55303 und ISO 2854).

Die Verfahrensvariationskoeffizienten CV der Gesamtmethoden errechneten sich aus den Differenzen der Einzelbestimmungen der Kontrollwerte (KW) über die Ermittlung der mittleren Standardabweichung der Differenzen. Aus der mittleren Standardabweichung wurde daraufhin zur Festlegung der Signifikanzniveaus (SN) der einzelnen Analyte das Konfidenzintervall bestimmt (GOTTWALD, 2000; SACHS, 1984). Die SN spiegeln den Bereich wieder, innerhalb dessen Veränderungen der Analytgehalte auf methodische Aspekte und/oder natürliche Schwankungen zurückzuführen sind und nicht, wie gefordert, auf den Einfluss des auf die Zelle einwirkenden chemischen Stresses.

Die Berechnung des Box-Whisker-Plots wurde mit dem Softwarepaket ORIGIN (Version 7.1) durchgeführt.

Die Statistik zum Vergleich der einzelnen Biotests der ISIS-Biotestbatterie wurde von Herrn Werner Wosniok, Institut für Mathematik der Universität Bremen, durchgeführt. Die Berechnung erfolgte hierbei über Faktorenanalyse mit Varimax-Rotation unter der Verwendung des Kaiser-Kriteriums zur Festlegung der Faktoren-Anzahl.

#### 4 Problemstellung

Die Zielsetzung der Arbeit war es, einen Beitrag zur Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe in der marinen Umwelt zu leisten, die im zellulären System der EPC-Zelllinie oxidativen Stress auslösen. Als Untersuchungsstrategie wurde die BDF gewählt. Zu dessen praktischer Durchführung mussten im Wesentlichen die folgenden Punkte Berücksichtigung finden:

1. Die permanente Zelllinie EPC musste sensitive biologische Marker aufweisen, um spezifische Effekte zum oxidativen Stress empfindlich anzuzeigen.
2. Es durften keine Effekte der biologischen Marker mit den zur Extraktion und Fraktionierung verwendeten Lösungsmitteln auftreten.
3. Die Methoden mussten empfindlich genug sein, um die zu erwartenden schwachen biologischen Effekte der marinen Sedimente zu detektieren.
4. Die Methoden mussten das große Probenaufkommen, welches beim Ansatz der BDF durch die immense Anzahl an Fraktionen anfällt, bewältigen.

Es galt zunächst zu klären, welche Parameter zur Beurteilung eines durch chemische Stressoren induzierten oxidativen Stress in der verwendeten EPC-Zelllinie geeignet sind.

In der Literatur werden eine Vielzahl von biologischen Markern in variierenden biologischen Testsystemen beschrieben. Ausgehend von den primären Enzymsystemen der oxidativen Stressabwehr wie SOD, KAT und GPx stellen auch die entsprechenden sekundären Enzymsysteme wie GR oder GST bzw. das Redoxsystem GSx weit verbreitete Parameter zur Beurteilung von oxidativem Stress dar. Der Nachweis von bereits durch ROS entstandene Zellschädigungen wie der Lipidperoxidation mittels MDA wird ebenfalls angewandt. Diese ausgewählten Parameter werden hierzu einer Sensitivitätsprüfung mit spezifischen Positivkontrollen unterzogen.

Für Testsysteme mit hoher Sensitivität auf die Positivkontrolle wird vor den Untersuchungen der Sedimentextrakte eine Methodenoptimierung relevanter Versuchsparameter wie Inkubationsart und Inkubationsdauer durchgeführt.

In diesem Zusammenhang ist ebenfalls die Kompatibilität der Biotests mit den zur Extraktion der Sedimente und Fraktionierung der Rohextrakte eingesetzten Lösungsmitteln Aceton, *n*-Hexan, Methanol, Ethylacetat, *cyclo*-Hexan und Dichlormethan, sowie für den eingesetzten Lösungsvermittler DMSO zu überprüfen. Methoden mit einer geringen Sensitivität auf die Positivkontrolle oder einer zu starken Sensitivität auf die Lösungsmittel und DMSO bleiben für die weiteren Untersuchungen unberücksichtigt.

Die als geeignet eingestuften Messparameter sind abschließend auf deren Präzision zu überprüfen. Unpräzise Methoden sind vor Beginn der Probenuntersuchungen zu optimieren und gegebenenfalls durch präzisere, gleichwertige Methoden zu ersetzen.

Zur statistischen Auswertung der Daten ist es erforderlich, die SN der einzelnen Methoden zu bestimmen. Effekte ausserhalb der SN gelten als signifikant vom KW verschieden und repräsentieren sicher positive Ergebnisse.

Im nächsten Schritt ist zu testen, ob die Biotests Effekte, ausgelöst durch das toxikologische Potential der marinen Sedimentextrakte und –fraktionen, detektieren. Zum Vergleich und zur Bewertung der Effekte mariner Proben werden zusätzlich Proben aus der Elbe bei Hamburg und dem Hamburger Industriehafen untersucht. Diese Proben weisen eine stark von den marinen Proben abweichende, erhöhte Schadstoffbelastung auf, so dass anhand deren Ergebnisse die der marinen Proben besser eingestuft werden können. Ausserdem ist so eine Überprüfung der Plausibilität der erhaltenen Effekte der Biotests möglich.

Abschließend gilt es nach Prüfung der biologischen Ergebnisse abzuwägen, inwiefern der Nachweis von oxidativem Stress ein geeigneter Endpunkt ist, toxisch relevante Substanzen oder Substanzklassen in marinen Sedimenten zu identifizieren. Um dessen Eignung mit weiteren Biotests der ISIS-Biotestbatterie vergleichend abzuschätzen, wird eine statistische Auswertung des ISIS-Datensatzes aller Biotests durchgeführt.

## **5 Methodenentwicklung**

### **5.1 Toxizität des Lösungsvermittlers**

Die meisten toxisch wirksamen Verbindungen weisen i.d.R. einen lipophilen Charakter auf und sind als solche nicht in wässrigen Testsystemen löslich. Zu diesem Zweck werden sogenannte Lösungsvermittler (Carrier) eingesetzt, welche sowohl polare als auch unpolare Stoffe zu lösen vermögen und diese in polaren Medien in Lösung bringen. Dadurch wird die optimale Verteilung des Schadstoffes im Medium gewährleistet und der Stoff dem biologischen System verfügbar gemacht, wodurch einheitliche Aufnahmebedingungen geschaffen werden.

Als Carrier finden organische Lösungsmittel wie Methanol, Ethanol, Aceton oder Isooctan Verwendung (YU et al., 1997; SAITO et al., 1993; BABICH et al., 1991). Der mit Abstand am häufigsten eingesetzte Lösungsvermittler stellt jedoch DMSO dar, wobei DMSO primär im Konzentrationsbereich von 0,1 – 1% eingesetzt wird (DESCAMPIAUX et al., 1999; LIß und AHLF, 1997; CASTANO et al., 1996; SAITO et al., 1993). In den Untersuchungen zum genotoxischen Potential von Schadstoffen (BUNKE, 2000) wurde gezeigt, dass DMSO in EPC-Zellen bis zu einem Mediumzusatz von 10% nur schwache toxische Wirkungen auslöste, während Aceton, Ethanol und Methanol bereits bei 1 %-igem Mediumzusatz toxisch wirkten.

Es galt zunächst zu überprüfen, bis zu welchem Bereich die biologischen Testsysteme zum oxidativen Stress DMSO als Lösungsvermittler tolerieren. Hierbei lag der zu tolerierende DMSO-Zusatz für eine 24-stündige Inkubation ohne nachteilige Auswirkungen auf die EPC-Zellen (Zytotoxizität und Enzymaktivität) bei 0,5 %. Für Kurzzeittests bis zwei Stunden Inkubationszeit tolerierten die EPC-Zellen einen DMSO-Zusatz von 2 %. Für die Sensitivitätsprüfung wurden den Zellen die zu testenden Positivkontrollen bei einer 24-stündigen Inkubationszeit 0,5 %-ig in DMSO zugesetzt, und für die Kurzzeittests 1 %-ig. Die Daten zur Toxizität des Lösungsvermittlers DMSO sind im Anhang unter Kapitel 9.16, Tabelle A16 dokumentiert.

### **5.2 Sensitivitätsprüfung der ausgewählten biologischen Marker**

In Tabelle 7 sind die verwendeten, spezifischen Positivkontrollen für die Sensitivitätsprüfung der ausgewählten biologischen Marker aufgeführt. Die Inkubation der EPC-Zellen mit den Positivkontrollen differiert in der Inkubationsart und –dauer in Anlehnung an die Literaturangaben. Für die Überprüfung der enzymatischen Testsysteme SOD, KAT, GPx, GR und GST wurde eine direkte Inkubation für 24 Stunden durchgeführt, welche in der Literatur Anwendung findet (KAMMANN et al., 2001; DESCAMPIAUX et al., 1999). Für das Redoxsystem GSx (GSH und GSSG) erfolgte die Überprüfung nach VANDEPUTTE et al. (1994) für 30 Minuten und für den LDH-Test für 60 Minuten mittels indirekter Inkubation (MEYER,

2000). Die Überprüfung zur Lipidperoxidation über die MDA-Bildung wird mit direkter Inkubation für 40 Minuten nach KNÜPPEL (1995) durchgeführt.

**Tabelle 7: Antwort ausgewählter biologischer Marker auf die eingesetzten Positivkontrollen**

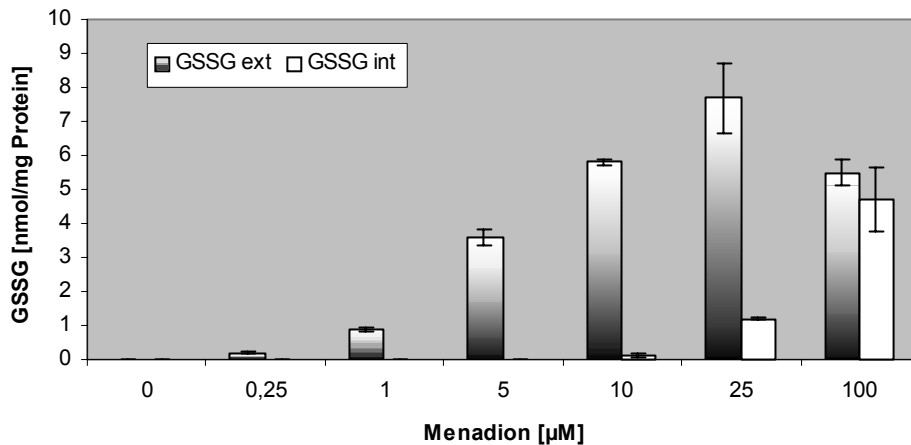
- : keine Antwort des Markers auf den chemischen Stressor; +: zum KW signifikante ( $\alpha=0,95$ ) Antwort des Markers auf den chemischen Stressor. Die Signifikanz wurde mittels des Signifikanzniveaus SN der Gesamtmethode ermittelt (siehe Tabelle 13 unter 5.7.1); a: direkte Inkubation, 24h; b: indirekte Inkubation, 30 min; c: direkte Inkubation, 40 min; d: indirekte Inkubation, 1h

Parameter	Positivkontrolle	Antwort	Literatur
<b>SOD</b> <sup>a</sup>	Paraquat, Deiquat (je 1mM)	-	DESCAMPIAUX et al. (1999)
<b>KAT</b> <sup>a</sup>	Wasserstoffperoxid (0,01-3mM)	+	MEYER (2000)
<b>Gpx</b> <sup>a</sup>	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid, Cumolhydroperoxid (je 1 mM)	-	CHIU et al. (1976)
<b>GR</b> <sup>a</sup>	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	-	WILHELM et al. (2001)
<b>GST</b> <sup>a</sup>	CDNB (100 $\mu$ M)	-	HABIG et al. (1974)
<b>GSH</b> <sup>b</sup>	Paracetamol (1-10 mM)	+	VANDEPUTTE et al. (1994)
<b>GSSG</b> <sup>b</sup>	Menadion (1-100 $\mu$ M)	+	VANDEPUTTE et al. (1994)
<b>MDA</b> <sup>c</sup>	Cumolhydroperoxid (800 $\mu$ M)	-	KNÜPPEL (1995)
<b>LDH</b> <sup>d</sup>	Triton X-100 (0,5%)	+	BESTWICK und MILNE (2000)

Von den primären und sekundären Enzymsystemen zur oxidativen Stressabwehr zeigte nur KAT eine Aktivitätssteigerung in Abhängigkeit zur Positivkontrolle. Für die übrigen Enzymsysteme, mit Ausnahme von LDH, wurde keine Aktivitätssteigerung induziert.

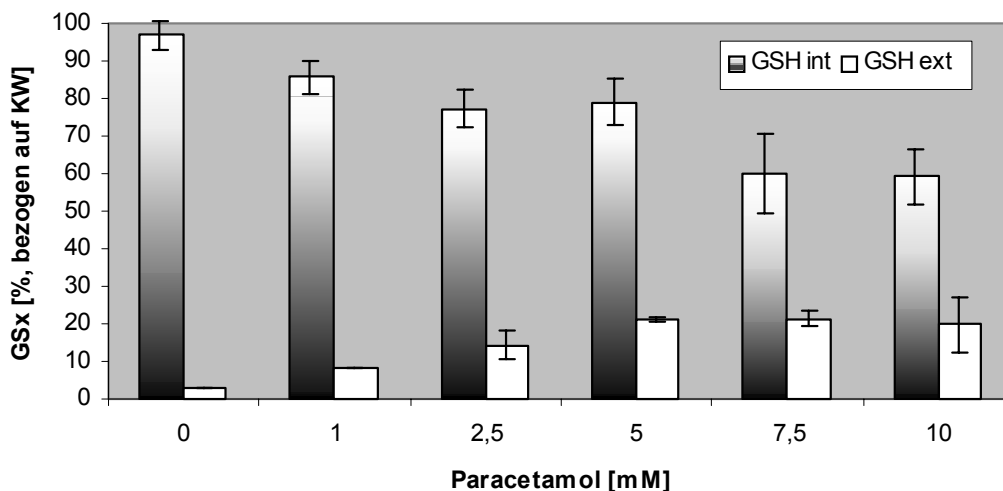
Das Redoxsystem GSx reagierte empfindlich auf die eingesetzten Stressoren Menadion (MD) und Paracetamol, analog zu den Ergebnissen von VANDEPUTTE et al. (1994). Es war notwendig, jeweils für GSH und GSSG eine geeignete Positivkontrolle zu testen, da beide Messparameter unabhängig voneinander reagieren. So kommt es zum einen durch den elektrophilen Angriff des GSH zur Konjugation von Xenobiotika, ohne dass GSSG gebildet wird (Beispiel Paracetamol). Zum anderen entsteht durch den Einfluss von Redox-Zykeln unter Abnahme des GSH-Spiegels verstärkt GSSG (Beispiel MD). Zur korrekten Bilanzierung des GSx-Gehaltes der EPC-Zellen ist es zwingend erforderlich, beide möglichen Reaktionswege des GSx sensitiv nachzuvollziehen.

In Abbildung 12 ist die Dosis-abhängige GSSG-Bildung durch MD dargestellt.



**Abbildung 12: Einfluss von Menadion auf die GSSG-Bildung in EPC-Zellen**

MD wurde in Konzentrationen von 0,25 – 100  $\mu\text{M}$  im GSx-Test eingesetzt. Es wird deutlich, dass der Gehalt an externem GSSG mit steigender MD-Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  (0,2 nmol/mg Protein) bis 25  $\mu\text{M}$  (7,7 nmol/mg Protein) stetig anstieg und bei 100  $\mu\text{M}$  wieder leicht abfiel. Internes GSSG wurde erst ab 10  $\mu\text{M}$  detektiert und stieg bis 100  $\mu\text{M}$  auf 4,7 nmol/mg Protein an. In der Summe beider Gehalte wies die Inkubation der EPC-Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  MD mit 10,2 nmol/mg Protein GSSG den höchsten prooxidativen Effekt auf das Redoxsystem GSx auf. (Daten siehe Kapitel 9.16, Tabelle A17).



**Abbildung 13: Einfluss von Paracetamol auf den GSH-Spiegel der EPC-Zellen**

In Abbildung 13 ist die GSH-Depletion in Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration im Bereich von 1-10 mM dargestellt. Man erkennt die kontinuierliche interne GSH-Abnahme bei ansteigender Paracetamol-Konzentration. Dem

gegenüber verhielt sich die externe GSH-Freisetzung invers. Mit steigender Schadstoffkonzentration erhöhte sich die Membranschädigung der Zelle, woraufhin GSH aus der Zelle austrat und im externen Medium detektiert wurde.

Bereits für den KW wurde ein externer GSH-Gehalt von 3 % ermittelt. Dieser resultiert in erster Linie durch zellschädigende Effekte bei der Aufarbeitung wie das Einwirken von Trypsin beim Lösen der Zellen vom Gefäßboden oder die mechanische Beanspruchung (Schüttelmaschine, Zentrifuge). Die Erhöhung des externen GSH-Gehaltes mit steigender Paracetamolkonzentration ist klar mit der Schadstoffwirkung zu korrelieren. Dieser Zusammenhang gilt ebenfalls für das Ausmaß der GSH-Depletion. Die Daten zur Paracetamolinkubation sind im Anhang unter Kapitel 9.16, Tabelle A18 dokumentiert.

Der Marker MDA bzw. TBARS für die Lipidperoxidation zeigte keine positive Stressantwort der EPC-Zellen auf Cumolhydroperoxid (siehe Anhang Kapitel 9.11.4, Tabelle A9). Als mögliche Ursache ist zu vermuten, dass die epitheloiden Zellen, im Vergleich zu Zellen anderer Organe (z. B. Leber, Niere) einen zu geringen Fettgehalt aufweisen. Damit war zwangsläufig der Gehalt an PUFA als Precursor für MDA nicht ausreichend vorhanden, um in den EPC-Zellen einen sicheren Nachweis auf Lipidperoxidation führen zu können. Die NG der verwendeten Methoden lagen bei 5  $\mu\text{M}$  für die photometrische Bestimmung nach UCHIYAMA und MIHARA (1978) und bei 0,4  $\mu\text{M}$  für die um den Faktor 12 empfindlichere Bestimmung mittels Ionenpaar-HPLC nach LAZZARINO et al. (1991). Vergleiche mit Literaturdaten zeigen, dass beide Methoden empfindlich genug sind, eine durch Cumolhydroperoxid induzierte MDA-Bildung zu detektieren. KNÜPPEL (1995) zeigte bei Untersuchungen an primären Rattenhepatozyten eine durch Cumolhydroperoxid (50 – 500  $\mu\text{M}$ ) verursachte MDA-Bildung im Bereich von 7 – 95  $\mu\text{M}$ .

Als Ergebnis der Sensitivitätsprüfung ist festzuhalten, dass nur für KAT und das Redoxsystem GSx eine sensitive, oxidative Stressantwort in EPC-Zellen ermittelt und bestätigt wurde. LDH erwies sich als geeigneter Marker zum Nachweis der Zytotoxizität. Die biologischen Marker SOD, GPx, GR, GST und MDA sind zum Nachweis für oxidativen Stress in dem verwendeten biologischen Testsystem ungeeignet.

### **5.3 Kompatibilität der verwendeten Lösungsmittel**

Die Überprüfung der zur Extraktion der Sedimente und zur BDF verwendeten Lösungsmittel Aceton, *n*-Hexan, Methanol, *cyclo*-Hexan, Ethylacetat und Dichlormethan erfolgte in drei Konzentrationsstufen von 10 %, 1 % und 0,1 %, jeweils in DMSO gelöst. Hierbei erwies sich DMSO als ungeeignet, 10 % *n*-Hexan und *cyclo*-Hexan vollständig in Lösung zu bringen. Die finalen Konzentrationen im



Inkubationsmedium stellten eine hundertfache Verdünnung der drei Konzentrationsstufen dar (0,1 %, 0,01 % und 0,001 %), da zur Inkubation der Zellen jeweils ein Prozent DMSO zum Inkubationsmedium PBS pipettiert wurde.

Abbildung 14 zeigt die LDH-Freisetzung und die beobachtete Proteinabnahme durch den Lösungsmiteleinfluss. Es wird deutlich, dass nur die unpolaren Lösungsmittel *n*-Hexan, *cyclo*-Hexan und Dichlormethan in tausendfacher Verdünnung (0,1 %-ig) einen starken zytotoxischen Effekt auf die EPC-Zellen ausüben. Alle drei Lösungsmittel zeigen eine LDH-Freisetzung im Bereich von 40-50 %. Das bedeutet, dass bei der Hälfte der EPC-Zellen die Zellmembranen durch die Einwirkung dieser Lösungsmittel geschädigt bzw. zerstört worden sind. Durch den strukturellen Aufbau von Zellmembranen (Lipoidproteindoppelschicht) treten lipophile Lösungsmittel mit der Zellmembran in Wechselwirkung und können diese schädigen. Polare Lösungsmittel zeigten diese Wirkung, wie Abbildung 15 belegt, nicht. Von den getesteten polaren Lösungsmitteln Aceton, Methanol und Ethylacetat wurde kein zytotoxisches Potential für Konzentrationen bis 0,1 % nachgewiesen.

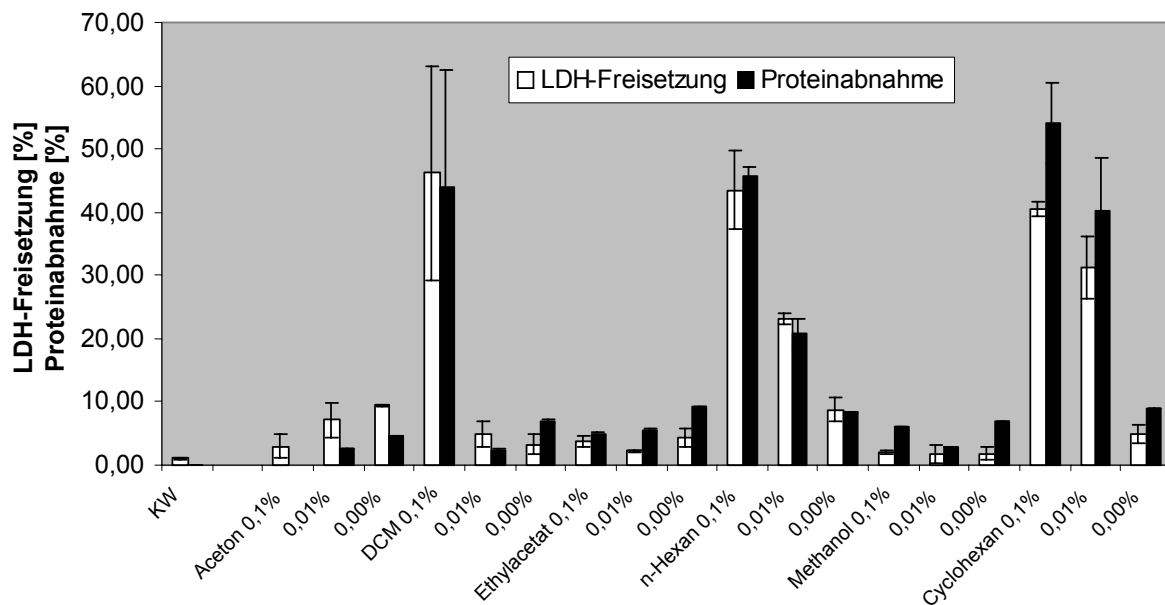


Abbildung 14: Zytotoxizität der verwendeten Lösungsmittel

*cyclo*-Hexan und *n*-Hexan zeigten ebenfalls für die Verdünnung von 0,01 % noch deutliche zytotoxische Potentiale, während die zytotoxischen Effekte (LDH-Freisetzung, Proteinabnahme) für die Konzentrationen von 0,001 % unterhalb der SN der Methoden lagen. Aus Abbildung 14 ist die sehr gute Korrelation der beiden Parameter zu erkennen. Dies ist ein erster Hinweis, dass die LDH-Bestimmung einen redundanten Messparameter darstellen könnte, da durch die zur Angabe der Messwerte notwendige Proteinbestimmung bereits ausreichende Informationen zur

Zytotoxizität der eingesetzten Schadstoffe vorliegen. Eine abschließende Betrachtung dieses Zusammenhanges erfolgt unter 5.6. Die Daten sind unter Kapitel 9.16, Tabelle A19 dokumentiert.

## **5.4 Methodenentwicklung Katalase**

### **5.4.1 Validierung der Bestimmungsmethode**

Aus Gründen der besseren Handhabung bei der Probenvorbereitung wurde der lineare Arbeitsbereich auf 0,25 – 8,0 µg Katalase/mL Testlösung (entspricht 0,6 – 18,6 U/mL) festgelegt und liegt in guter Übereinstimmung mit dem von JOHANNSON und BORG (1988) angegebenen linearen Arbeitsbereich der Methode von 0,125 – 2,0 µg KAT/mL Testlösung. Durch den erweiterten Arbeitsbereich bis 8 µg/mL war gewährleistet, dass sich die Vorverdünnung der Probenlösungen ausschloss und die Zellhomogenate direkt eingesetzt werden konnten. Die Homogenität der Varianzen wurde mittels F-Test bestätigt.

Die NG der Methode lag knapp unterhalb des Arbeitsbereiches bei 0,22 µg Katalase/mL Testlösung und die BG bei 0,66 µg Katalase/mL Testlösung.

Der CV für die Gesamtmethode über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde zu 13,6 % bestimmt und setzt sich aus der KAT- und der Proteinbestimmung zusammen. In Anbetracht der Tatsache, dass Zellmaterial z.T. starke natürliche physiologische Schwankungen aufweist, ist der ermittelte CV als gut zu bewerten.

### **5.4.2 Optimierung der Inkubationszeit und Inkubationsart**

In der Literatur werden Inkubationszeiten von 1 bis 36 Stunden beschrieben (MEYER, 2000; ORAL et al., 1999; LOPRASERT et al., 1996). Vor Optimierung der Inkubationszeit galt es, die Konzentration des Wasserstoffperoxids zu bestimmen, die auf die EPC-Zellen für den KAT-Test den größten Effekt auslöste. Hierzu wurden die Zellen für 24 Stunden mit sechs Konzentrationsstufen im Bereich von 0,01 – 3 mM direkt inkubiert (MEYER, 2000).

Abbildung 15 zeigt, dass die KAT-Aktivität bei 0,1 mM Wasserstoffperoxid ihr Maximum durchläuft. Der entsprechende relative Induktionsfaktor (= Katalaseaktivität der inkubierten Proben bezogen auf die Katalaseaktivität der nicht inkubierten, mitgeführten Kontrollgruppe) liegt bei 1,9. Die Dokumentation der Daten siehe unter Kapitel 9.16, Tabelle A20.

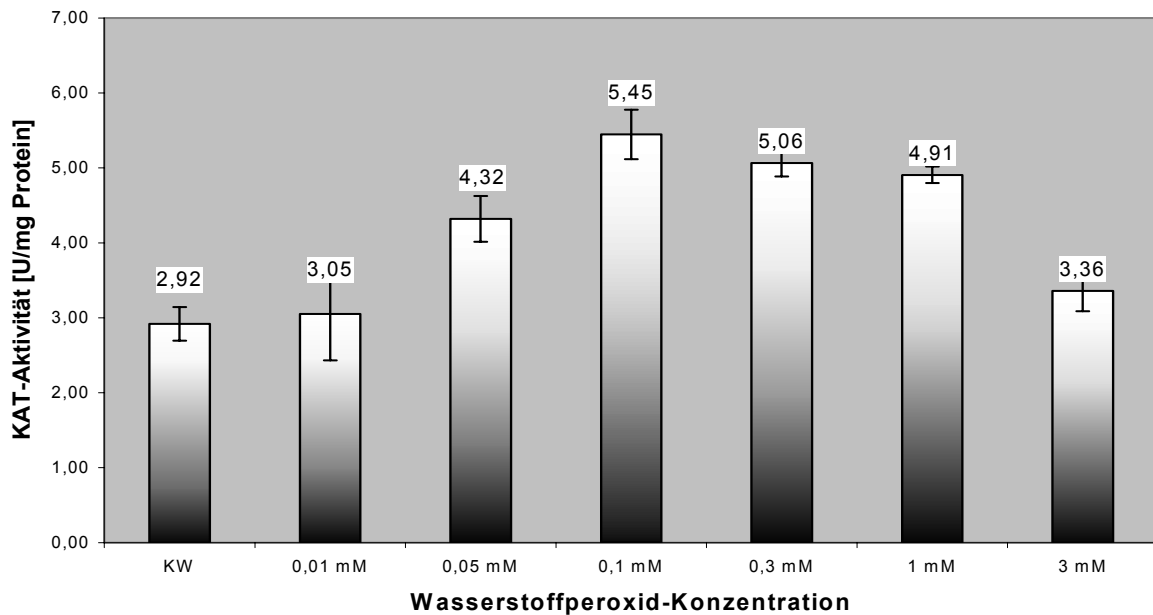


Abbildung 15: Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die KAT-Aktivität in EPC-Zellen

Die Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurde anhand der Konzentration von 0,1 mM Wasserstoffperoxid untersucht. Diese wurde mittels der indirekten Inkubation durchgeführt, da diese Inkubationsart im Hinblick auf die BDF primär Anwendung finden sollte. In Abbildung 16 sind die zeitlichen Verläufe der KAT-Aktivität für 0,1 mM Wasserstoffperoxid und für den Kontrollwert PBS von 0-24 Stunden dargestellt.

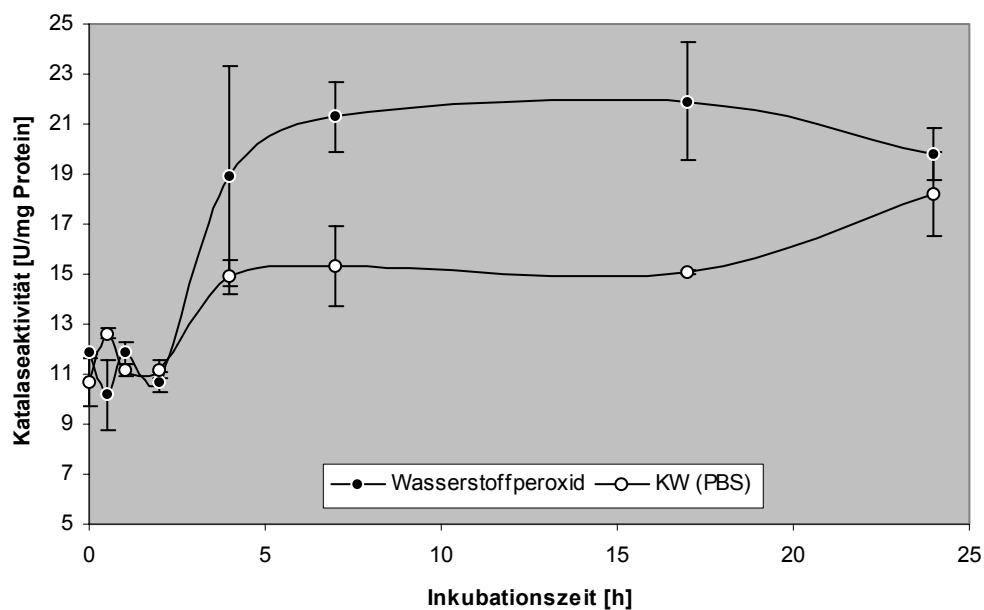


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf (0-24h) des Einflusses von 0.1 mM Wasserstoffperoxid auf die KAT-Aktivität der EPC-Zellen im Vergleich zur nicht inkubierten Kontrollgruppe. KW: Kontrollwert durch Inkubation mit PBS

Hervorzuheben ist der im Vergleich zur direkten Inkubation (siehe Abbildung 15) vierfach höhere Grundgehalt der EPC-Zellen von 10,7 bzw. 11,9 U/mg Protein gegenüber 2,9 U/mg Protein. Natürliche Schwankungen des Grundgehaltes für die KAT-Aktivität als mögliche Ursache sind auszuschließen, da es sich bei den zur Untersuchung verwendeten Zellkulturen um Zellen einer Generation handelt. Der Anstieg des Grundgehaltes liegt aller Voraussicht nach in der unterschiedlichen Aufarbeitung der Zellen begründet. Die Aufarbeitung vor der indirekten Inkubation scheint auf die EPC-Zellen ein oxidatives Stresspotential zu haben, was sich in einer Erhöhung der KAT-Aktivität gegenüber der direkten Inkubation manifestierte.

Man erkennt in Abbildung 16, dass die KAT-Aktivität im Bereich zwischen zwei und vier Stunden einen unterschiedlich starken Anstieg der Enzymaktivität zeigten. Ab sieben bis 17 Stunden verlaufen beide Kurven auf einem Plateau mit ca. 21 U/mg Protein für die mit Wasserstoffperoxid inkubierten Proben bzw. ca. 15 U/mg Protein für die mitgeführte Kontrolle PBS und gleichen sich nach 24-stündiger Inkubationszeit bei etwa 19 U/mg Protein wieder einander an. Für die Zeitpunkte bei 4, 7 und 17 Stunden sind die Wertepaare signifikant voneinander verschieden, wobei die entsprechenden relativen Inkubationsfaktoren 1,27 sowie 1,39 und 1,45 betragen.

Eine indirekte Inkubation ab 17 Stunden zeigte einen zytotoxischen Effekt, aufgrund dessen die Ergebnisse der KAT-Induktion dieser beiden Versuchsdaten nicht berücksichtigt werden dürfen.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse liegt die optimale indirekte Inkubationszeit im Zeitfenster zwischen 4 – 7 Stunden. In Anbetracht der Probenanzahl und einer möglichst minimalen Testzeit wurde eine Inkubationszeit von 4 Stunden festgesetzt.

Die Daten sind im Anhang 9.16, Tabelle A21 dokumentiert.

### **5.4.3 Anwendung auf oxidative Stressoren**

Es wurden Verbindungen aus unterschiedlichen Schadstoffklassen mit bekanntem oxidativen Vermögen im KAT-Test eingesetzt. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des höchsten Effektes der Inkubation. Es wurden für jede Verbindung die Konzentration von 1, 10, 100, 500 und 1000  $\mu\text{M}$  bzw. für MD 1, 5, 25, 100 und 500  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Das SN der Methode lag bei 120 %, bezogen auf die Katalaseaktivität der Kontrollgruppe.

Tabelle 8: Ergebnisse der im KAT-Test eingesetzten Verbindungen.

Verbindung	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Max. Effekt [%]	Literatur
Benzo(e)pyren	100	104	KIM und LEE, 1997
Kupfer-(II)-chlorid	1	116	BURGESS et al., 2000
Dieldrin	100	118	BACHOWSKI et al., 1998
Malathion	10	116	
MD	25	191	VANDEPUTTE et al. 1994
Paraquat	10	112	DESCAMPIAUX et al., 1999
2-Nitrobenzoesäure	1000	130	WINSTON und DI GIULIO, 1991

Es wurde nur für das Naphthochinon (NQ) MD und die aromatische Nitroverbindung 2-Nitrobenzoesäure eine signifikante Induktion der Katalaseaktivität ermittelt. Das Ergebnis für 2-Nitrobenzoesäure wurde aufgrund der hohen Dosis und dem geringen Effekt des Stoffes (30 %-ige Aktivitätssteigerung bei 1000  $\mu\text{M}$ ) im Gegensatz zum Effekt des MDs (90 %-ige Aktivitätssteigerung bei 25  $\mu\text{M}$ ) als irrelevant eingestuft.

In Abbildung 17 ist die Dosis-abhängige Katalaseinduktion durch den Einfluss des Naphthochinon-Derivates MD dargestellt. Die Daten sind unter Kapitel 9.16, Tabelle A22 dokumentiert.

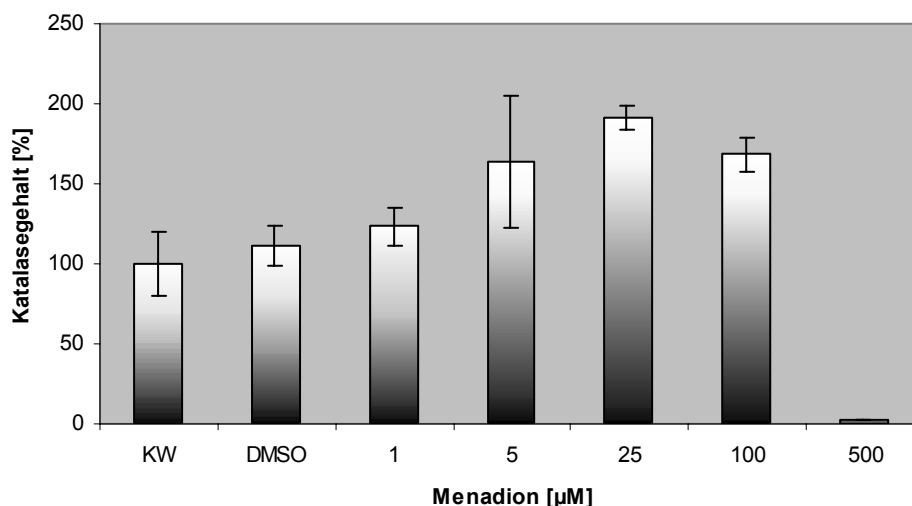


Abbildung 17: Einfluss von MD auf die Katalaseinduktion in EPC-Zellen

Das Maximum der durch MD verursachten Katalaseinduktion liegt im Konzentrationsbereich zwischen 5–100  $\mu\text{M}$  mit einem maximalen relativen Induktionsfaktor von 2,0 für die Inkubation der Zellen mit 25  $\mu\text{M}$ . Die Aktivität fällt für 100  $\mu\text{M}$  wieder leicht ab und ist für 500  $\mu\text{M}$  MD kaum noch nachzuweisen.

Die durch 25  $\mu\text{M}$  MD hervorgerufene Aktivitätssteigerung der KAT war bei nachfolgenden Messungen nicht reproduzierbar. Zu vermuten sind zellphysiologische Unterschiede der EPC-Zellen mit fortlaufender Generationszahl. Aufgrund der Tatsache, dass für die KAT-Bestimmung keine geeignete Positivkontrolle, für die eine erfolgte Stressantwort der EPC-Zellen beobachtet wurde, ausgewählt werden konnte, ist das Testsystem KAT nur bedingt als biologischer Marker für oxidativen Stress geeignet. Eine abschließende Betrachtung soll nach der Untersuchung mariner Sedimentextrakte erfolgen.

Wasserstoffperoxid wurde im Hinblick auf die Zielsetzung und Aufgabenstellung der Untersuchung als ungeeignete Positivkontrolle angesehen, da es nicht originär im Sediment vorkommt, sondern erst aktiv in der Zelle gebildet werden muss. Somit ist durch die Inkubation mit Wasserstoffperoxid keine sichere Aussage zum induzierten oxidativen Stress durch Sedimentextrakte möglich.

## **5.5 Methodenentwicklung Glutathion**

### **5.5.1 Validierung der Bestimmungsmethode**

In Anlehnung an das miniaturisierte Messprotokoll nach VANDEPUTTE et al. (1994) für die Anwendung der GSx-Bestimmung wurde der lineare Arbeitsbereich zu 0,5 – 100  $\mu\text{M}$  GSH und 0,5 – 10  $\mu\text{M}$  GSSG bestimmt. Für die hier dargestellten Untersuchungen wurde ein einheitlicher Arbeitsbereich von 0,5 – 8  $\mu\text{M}$  mittels F-Test auf Varianzenhomogenität geprüft und festgelegt.

Der CV für die Gesamtmethode lag bei der externen GSH-Bestimmung im Inkubationsmedium bei 15,6 % und für die interne GSH-Bestimmung in den Zellpellets bei 8,7 %. Bezüglich der GSSG-Bestimmung (intern und extern) waren keine CV für die Gesamtmethode zu ermitteln, da die zur statistischen Berechnung notwendigen Grundgehalte der KW unterhalb der NG der Methode lagen.

In Anbetracht der Tatsache, dass Zellmaterial z.T. starken natürlichen physiologischen Schwankungen unterliegt, ist der ermittelte CV über den Untersuchungszeitraum für die GSH-Bestimmung als gut zu bewerten. NG und BG sind in Tabelle A7 unter 9.9.5 aufgeführt.

### **5.5.2 Optimierung der Inkubationszeit und Inkubationsart**

Es wurde nur die indirekte Inkubation in Probengefäßen überprüft, da sich eine direkte Bestimmung in den Kulturflaschen aufgrund der Eigenfärbung des Nährmediums, hervorgerufen durch den Zusatz von Phenolrot als pH-Indikator, ausschloss. In Vortests kam es zu unvermeidbaren Interferenzen bei der photometrischen Bestimmung in Bezug auf die externen GSH- und GSSG-Gehalte. Zur Aufstellung einer korrekten GSx-Nettobilanz war es jedoch unerlässlich, neben der internen GSx auch die externe GSx-Bestimmung durchzuführen. Der Austausch gegen ein phenolrotfreies Medium schloss sich aus, da die Kultivierung der EPC-

Zellen nicht selbständig, sondern von einem externen Kooperationspartner durchgeführt wurde. Der Einsatz eines alternativen analytischen Verfahrens, wie z.B. die GSx-Bestimmung mittels HPLC (WINTERS et al., 1995; LENTON et al., 1999) war hinsichtlich des weitaus größeren zeitlichen und apparativen Aufwandes für die Anforderungen der BDF nicht praktikabel. Somit wurde unter Berücksichtigung aller Faktoren auf die Untersuchung des Einflusses der direkten Inkubation bei der GSx-Bestimmung verzichtet.

In Anlehnung an Literaturangaben (VANDEPUTTE et al., 1994, FLOWERS-GEARY et al., 1993) sollte die Inkubation der EPC-Zellen mit MD für 40, 120 und 240 Minuten erfolgen. Hierbei wurden die KAT-Ergebnisse mit berücksichtigt, die zeigten, dass eine indirekte Inkubation in PBS über einen längeren Zeitraum (über 17 h) zytotoxisch wirkt (siehe Anhang 9.16, Tabelle A21). Abbildung 18 zeigt die Wirkung für die 120-minütige Inkubation im Bereich von 1 – 100  $\mu\text{M}$  MD auf die EPC-Zellen. Es galt zu prüfen, inwieweit eine kürzere Inkubation bzw. eine längere Inkubationszeit zu einer Sensitivitätssteigerung führen würde.

Hierbei wurde weder durch eine Inkubationszeit von 40 Minuten noch durch eine vierstündige Inkubation eine deutliche Sensitivitätssteigerung erreicht. Vielmehr war zu beobachten, dass mit höheren MD-Konzentrationen (größer 25  $\mu\text{M}$ ) bei der vierstündigen Inkubation ein zytotoxischer Effekt einsetzte. Die entsprechenden Daten sind unter 9.16, Tabelle A23a-c dokumentiert.

Für den GSx-Test wurde als optimale Inkubationsbedingung die indirekte Inkubation in Reaktionsgefäßen für eine Dauer von zwei Stunden festgelegt. Der Zusatz der Proben, gelöst in DMSO, erfolgte 1 %ig. Zur Erstellung einer exakten GSx-Bilanz war es erforderlich, die entsprechenden GSx-Gehalte sowohl intern im Zellpellet, als auch extern im Inkubationsmedium zu quantifizieren (SALNIKOW et al., 1994). Somit waren für jede Messreihe vier GSx-Einzelmessungen ( $\text{GSH}_{\text{int.}}$ ,  $\text{GSSG}_{\text{int.}}$ ,  $\text{GSH}_{\text{ext.}}$  und  $\text{GSSG}_{\text{ext.}}$ ), neben der Proteinbestimmung und der LDH-Bestimmung durchzuführen. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Inkubation, sollte bei allen Inkubationsversuchen eine geeignete Positivkontrolle eingesetzt werden.

### **5.5.3 Festlegung der Positivkontrolle für den GSx-Test**

Zur Überprüfung der Methode wurden die EPC-Zellen mit drei unterschiedlichen Positivkontrollen für 120 Minuten indirekt inkubiert. Neben MD (LIU et al., 1993; VANDEPUTTE et al., 1994; FLOWERS-GEARY et al., 1993) wurden auch Kupfer(II)-chlorid (BURGESS et al., 2000; ZER et al., 1991) und 1,1'-Azo-bis-*N,N'*-dimethylformamid (Diamid) (BIAGLOW et al., 2000) im Konzentrationsbereich von 1-200  $\mu\text{M}$  für Kupfer(II)-chlorid und Diamid sowie von 1-100  $\mu\text{M}$  für MD getestet.

Abbildung 18 zeigt, dass - analog zu den Ergebnissen in der Literatur - alle drei Substanzen eine von der eingesetzten Dosis abhängige Oxidation von GSH zum GSSG in den EPC-Zellen bewirkten.

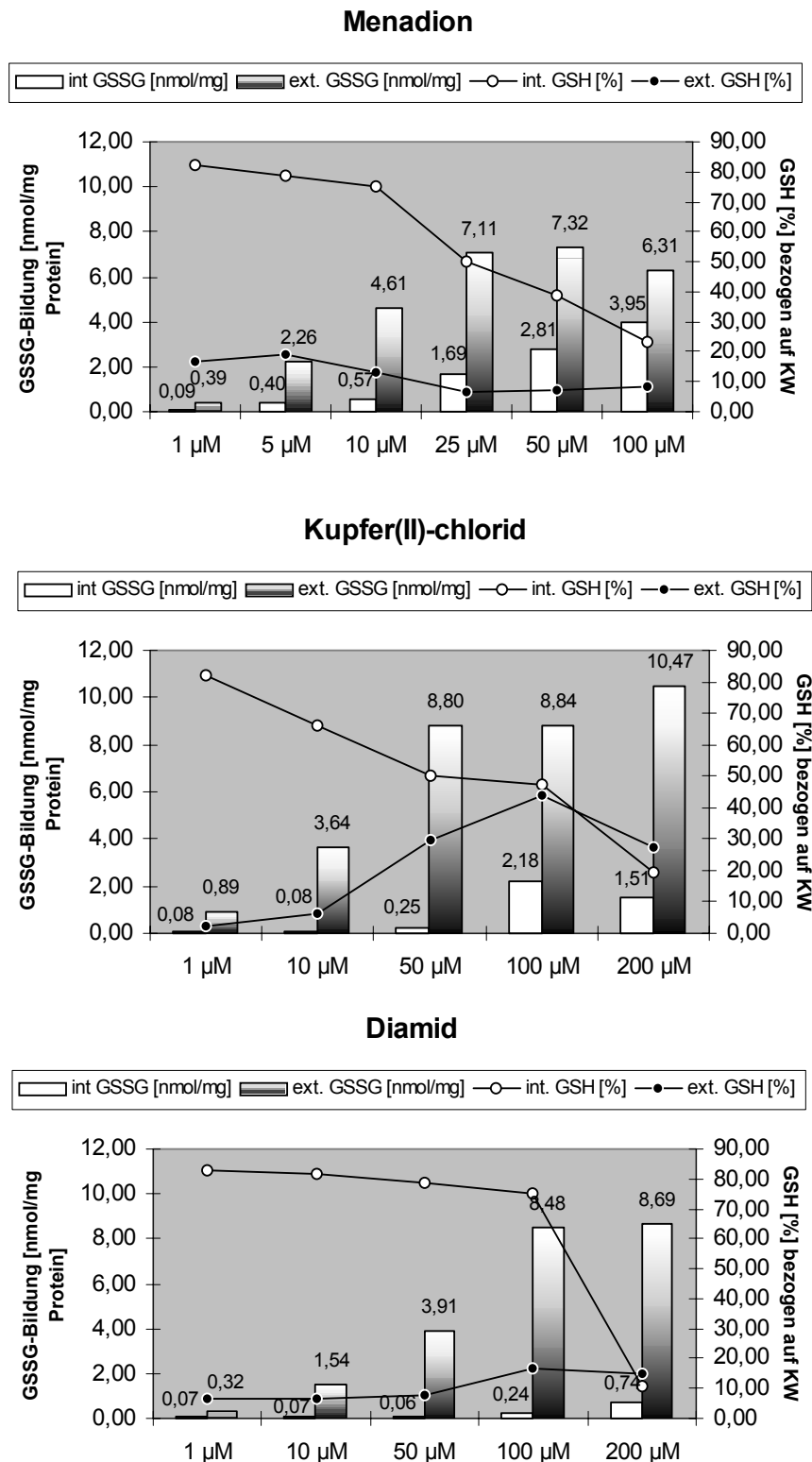


Abbildung 18: Einfluss von MD, Kupfer(II)-chlorid und Diamid auf das Redoxsystem Glutathion in EPC-Zellen



Dargestellt ist jeweils auf der Primärachse der interne und externe GSSG-Gehalt in nmol/mg Protein und auf der Sekundärachse der interne und externe GSH-Gehalt in Prozent, bezogen auf den GSx-Gehalt der jeweiligen KW. Es wurde in keinem der durchgeführten Versuche in den KW GSSG nachgewiesen.

Im Vergleich aller drei Positivkontrollen wiesen die EPC-Zellen bei einer Inkubation mit MD die höchste Sensitivität auf. In Tabelle 9 ist die GSSG-Bildung der drei Positivkontrollen für 10  $\mu\text{M}$  gegenübergestellt. Bei der Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  MD werden 5,2 nmol GSSG/mg Protein gebildet, dagegen bei Kupfer(II)-chlorid und Diamid 3,7 bzw. 1,6 nmol GSSG/mg Protein.

**Tabelle 9: GSSG-Bildung der drei Positivkontrollen MD, Kupfer(II)-chlorid und Diamid (10  $\mu\text{M}$ )**

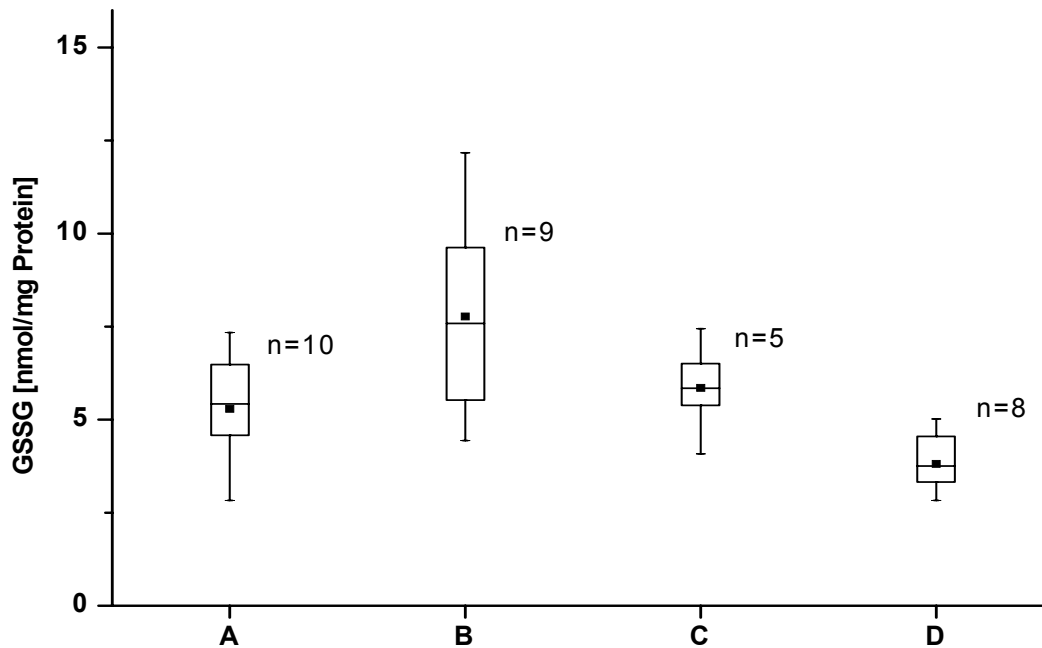
	Konzentration	Gesamt-GSSG-Bildung
MD	10 $\mu\text{M}$	5,2 nmol/mg Protein
Kupfer(II)-chlorid	10 $\mu\text{M}$	3,7 nmol/mg Protein
Diamid	10 $\mu\text{M}$	1,6 nmol/mg Protein

Durch die Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  MD wurde die GSSG-Bildung auf 8,8 nmol/mg Protein gesteigert, wobei sie sich ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  einem Grenzwert näherte. Zumindest ist dieses für die externen GSSG-Gehalte deutlich erkennbar.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurde 25  $\mu\text{M}$  MD (entspricht 4,3  $\mu\text{g/mL}$  Testlösung) als Positivkontrolle bei allen weiteren Messungen mitgeführt. Die Dokumentation der Daten erfolgt unter Kapitel 9.16, Tabelle A24a-c.

#### **5.5.4 Umrechnung der GSSG-Induktion in MD-Äquivalente**

Innerhalb von vier Wochen wurden die Inkubationsreihen auf den induzierten GSSG-Gehalt der Positivkontrolle 25  $\mu\text{M}$  MD überprüft. Aus Abbildung 19 geht hervor, dass sich die Antwort der EPC-Zellen auf den oxidativen Stressor in einem weiten Bereich von 2 – 14 nmol GSSG/mg Protein bewegt. Hieraus wird ersichtlich, dass die alleinige Betrachtung der GSSG-Gehalte in nmol/mg Protein eine große Unsicherheit in Bezug auf vergleichende Untersuchungen unterschiedlicher Proben enthält. Durch die Induktion der EPC-Zellen mit der jeweils identischen Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  MD resultierte eine GSSG-Bildung mit einer Streuung des Faktors 7. Die Daten sind im Kapitel 9.16, Tabelle A25 dokumentiert.



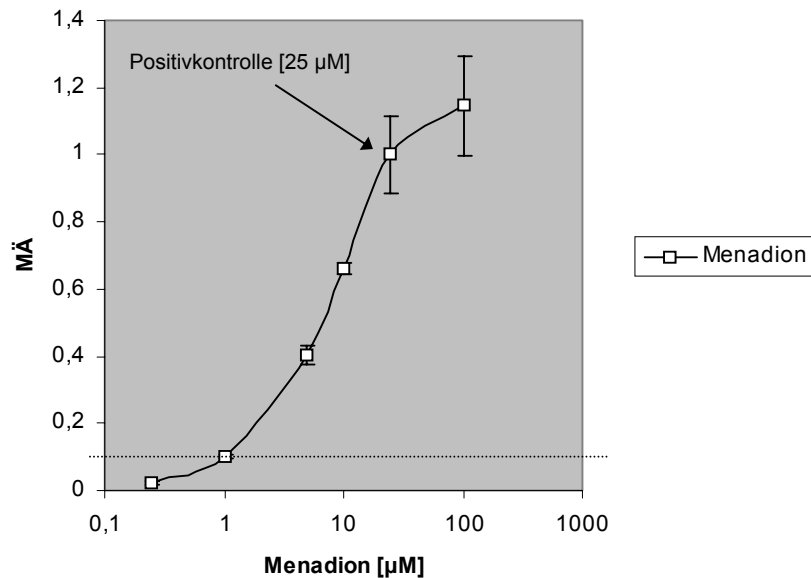
**Abbildung 19: GSSG-Bildung der Positivkontrolle MD für vier aufeinander folgende Zellgenerationen (A-D)**

In Anlehnung an die Auswertung des DIN-Verfahrens 38415-T1, bei dem die Hemmwirkung von Schadstoffen auf das isolierte Enzym Acetylcholinesterase bestimmt wird, erfolgte eine Umrechnung der Effekte in sogenannte Effekttäquivalente der Positivkontrolle. Es wurde untersucht, inwieweit die Angabe von Effekttäquivalenten für den GSx-Test ebenfalls anwendbar ist.

Dies hatte für den GSx-Test zur Folge, dass die GSSG-Gehalte in nmol/mg Protein der Proben auf die gebildete GSSG-Menge der Positivkontrolle bezogen wurden. Für den Fall, dass eine der Proben den identischen Effekt wie die Positivkontrolle aufweisen würde, resultiert daraus ein MD-Äquivalent (MÄ) von 1,0.

In Abbildung 20 ist die Dosis-Wirkungskurve MDs in MD-Äquivalenten (MÄ) dargestellt. Die Konzentration der Positivkontrolle ist gekennzeichnet.

Durch die Transformation in MÄ werden variierende Einflüsse der EPC-Zellen auf das Testsystem - welche voraussichtlich durch schwankende Grundaktivitäten der Enzyme der oxidativen Stressabwehr (SOD, KAT, GPx, GR) hervorgerufen werden - im Testergebnis berücksichtigt und kompensiert.



**Abbildung 20: Darstellung der Dosis-Wirkungskurve MDs als MD-Äquivalent (MÄ) und der Signifikanzgrenze des GSx-Tests bei 0,1 MÄ**

Da für die KW kein GSSG-Grundgehalt bestimmbar war, war die statistische Berechnung des SN nicht möglich. Statistisch korrekt interpretiert wären alle MÄ größer 0 von der Kontrolle verschieden und würden somit einen signifikanten Effekt darstellen. Als Erfahrungswert wurden Effekte mit einem MÄ größer 0,1 als beginnender oxidativer Stress auf das Redoxsystem GSx interpretiert und empirisch als SN der Methode festgelegt. Diese Grenze entspricht der oxidativen Wirkung von 1 µM MD. Die Daten zur Transformation in MÄ leiten sich aus den DW-Kurven MDs (Daten siehe Anhang 9.16, Tabelle A24a) ab.

Die Eignung der Auswertung, modifiziert nach DIN 38415-T1, soll beispielhaft an zwei untersuchten Proben mit direkt aufeinander folgenden EPC-Zellgenerationen verdeutlicht werden. Bei den Proben handelt es sich um die GPC-NF von ISIS-3 und die HPLC-F4 von ISIS-2. Die Ergebnisse beider Auswertungen werden in Tabelle 10 gegenüber gestellt (Daten siehe Kapitel 9.16. Tabelle A26).

**Tabelle 10: Darstellung der Umrechnung der GSSG-Induktion in den EPC-Zellen durch die GPC-NF ISIS-3 und die HPLC-F4 ISIS-2. Angabe der Ergebnisse in <sup>a</sup> [nmol/mg Protein] und <sup>b</sup> [dimensionslos]**

Messung	GPC-NF ISIS-3			HPLC-F4 ISIS-2		
	MD <sup>a</sup>	Probe <sup>a</sup>	MÄ <sup>b</sup>	MD <sup>a</sup>	Probe <sup>a</sup>	MÄ <sup>b</sup>
1	7,3	9,1	1,235	3,7	1,7	0,466
2	10,1	13,4	1,325	10,1	4,7	0,460
3	5,3	6,4	1,200	12,2	8,0	0,661
CV [%]	31,8	36,9	5,1	49,8	65,6	21,6

Vergleicht man die CV der Bestimmungen für die Positivkontrolle MD und die Proben mit den CV nach erfolgter Transformation in MÄ, so wird offensichtlich, dass die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Messergebnisse deutlich verbessert wurde. Trotz allem kam es, wie bei der Probe HPLC-F4 ISIS-2 zu erkennen ist, noch zu Schwankungen nach der Transformation in MÄ, bei weitem jedoch nicht mehr so ausgeprägt wie vor der Transformation.

Die Angabe zur GSSG-Induktion in den EPC-Zellen erfolgte in MÄ. Hierdurch wurde die Voraussetzung geschaffen, Probenvergleiche unabhängig von der Zellgeneration, zu ziehen.

### **5.5.5 Einfluss der antioxidativen Enzyme auf die Wirkung von MD**

Es sollte zum Abschluß der methodischen Untersuchungen überprüft werden, welche der bei der ROS-Entgiftung beteiligten Enzymsysteme der oxidativen Stressabwehr den entscheidendsten Einfluss auf die Stressantwort der EPC-Zellen besitzen. Über die genauere Kenntnis der Zusammenhänge zwischen Enzymaktivität und entsprechender GSSG-Bildung wären wichtige Hinweise zur Wirkweise von Einzelschadstoffen, hier MD, möglich.

Hierzu wurden die Enzyme SOD, KAT, GR, DT-Diaphorase und die GSH-Synthase mit in der Literatur beschriebenen spezifisch wirkenden Enzyminhibitoren inaktiviert. Diese gehemmten, sogenannten „knock-out“-EPC-Zellen, wurden anschließend mit 25 µM MD inkubiert. Der Einfluss des Enzyms DT-Diaphorase läßt Schlussfolgerungen auf die metabolische Entgiftung von MD durch die sogenannte „Zwei-Elektronen-Reduktion“ zum Hydrochinon (BUFFINGTON et al., 1989) zu und der Einfluss der GSH-Synthase erlaubt Rückschlüsse auf die Wechselwirkung zwischen der Neubildung von GSH (siehe Kapitel 2.6.2) in Folge der MD-Inkubation.

Die Inhibierung der SOD erfolgte mit 3 mM Diethylthiocarbaminsäure (DETCA) für 120 Minuten (MOK et al., 1998), der KAT mit 30 mM 1,2,4-Aminotriazol (AMT) für 60 Minuten (MARGOLIASH et al., 1960), der GR mit 100 µM 1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitroharnstoff (BCNU) für 30 Minuten (ADAMSON und HARMAN, 1993), der DT-Diaphorase mit 30 µM Dicumarol (DC) für 30 Minuten (CHIOU et al., 1999) und der GSH-Synthase mit 200 µM Buthionin-Sulfoximin (BSO) für 15 Stunden (GRIFFITH und MEISTER, 1979). In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Enzyminhibierung dargestellt. Es wurde jeweils die relative Enzymaktivität (bezogen auf die Enzymaktivität der Kontrollgruppe) nach der Inkubation mit den Inhibitoren angegeben (Daten siehe Kapitel 9.16, Tabelle A27).

**Tabelle 11: Spezifische Hemmung von GR, KAT, SOD und GSx in den EPC-Zellen. Signifikante Unterschiede zum KW sind gekennzeichnet. [n.b.: nicht bestimmbar]**

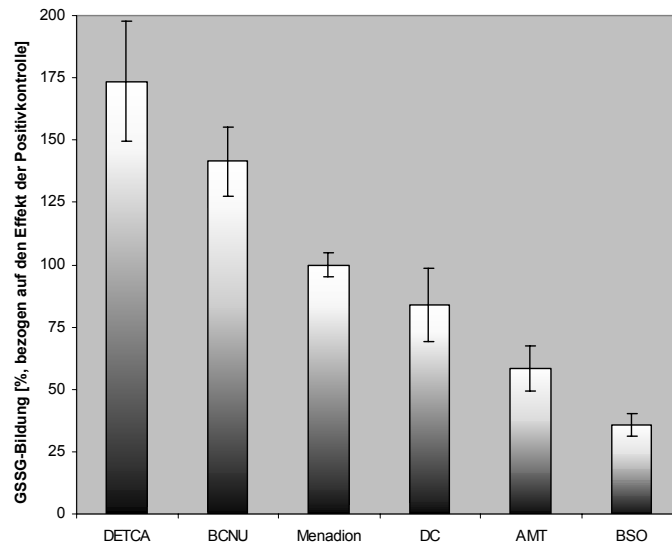
Inhibitor	SOD	KAT	GR	GSx
<b>DETCA</b>	<b>70,0 ± 6,6</b>	88,3 ± 14,6	<b>85,0 ± 6,0</b>	n.b.
<b>AMT</b>	101,3 ± 12,4	<b>27,8 ± 4,6</b>	101,3 ± 24,6	95,9 ± 24,9
<b>BCNU</b>	107,7 ± 0,1	81,4 ± 13,4	<b>30,2 ± 4,7</b>	92,3 ± 4,7
<b>DC</b>	89,7 ± 5,2	<b>127,4 ± 21,0</b>	98,4 ± 10,3	<b>132,3 ± 10,3</b>
<b>BSO</b>	90,3 ± 14,6	<b>55,7 ± 9,2</b>	108,0 ± 2,6	<b>75,6 ± 2,6</b>

Im Rahmen der Arbeit wurde keine Bestimmungsmethode für DT-Diaphorase etabliert, weshalb die Überprüfung der Enzyminhibierung für DT-Diaphorase nicht erfolgen konnte. Die Überprüfung zur GSH-Synthase wurde indirekt über den GSx-Gehalt durchgeführt. Da das GSx-Testsystem mit DETCA interferierte, erfolgte keine Angabe des Messwertes.

Die in der Literatur beschriebenen spezifischen Inhibitoren zeigten alle für die SOD, KAT, GR und GSH-Synthase der EPC-Zelle eine signifikante Abnahme der Aktivität, bezogen auf deren KW (Tabelle 11). Besonders ausgeprägt war die Inhibierung von KAT auf ca. 28 % Restaktivität und GR auf entsprechende 30 %. KAT wurde ebenfalls durch BSO auf etwa die Hälfte der Aktivität der KW gehemmt. Der GSx-Spiegel der EPC-Zellen betrug nach der BSO-Einwirkung noch 75%. Der Einfluss des DETCA beschränkte sich nicht nur auf SOD, wobei die Restaktivität nach der Inkubation noch 70 % betrug, sondern es wurde ebenfalls die GR signifikant gehemmt. DC zeigte vermutlich einen positiven Effekt auf die GSx-Synthase in den EPC-Zellen, da der GSx-Spiegel in den EPC-Zellen um ca. 30 % gesteigert wurde. Die KAT-Aktivität wurde ebenfalls durch die Inkubation mit DC signifikant gesteigert.

Abbildung 21 zeigt die Auswirkungen einer anschließenden Exposition der „knock-out“- Zellen mit 25 µM MD. Die Inkubation mit 25 µM MD ohne spezifische Inhibierung eines Enzymsystems ist in diesem Versuch als die Kontrollgruppe anzusehen. Die entsprechenden GSSG-Bildung der Inkubationsversuche wurden auf die GSSG-Bildung für 25 µM MD normiert (relative GSSG-Bildung von 100%).

Die Inhibierung der Enzyme SOD und GR erzeugte eine Verstärkung der GSSG-Bildung der Positivkontrolle, wohingegen die Inhibierung von KAT und GSH-Synthase einen signifikant geringeren Effekt bedingte. Die Hemmung der DT-Diaphorase und somit die „Zwei-Elektronen-Reduktion“ zum Hydrochinon hatte keine Auswirkung auf die Toxizität des MDs in den EPC-Zellen. Die Daten sind unter Kapitel 9.16, Tabelle A28 dokumentiert.



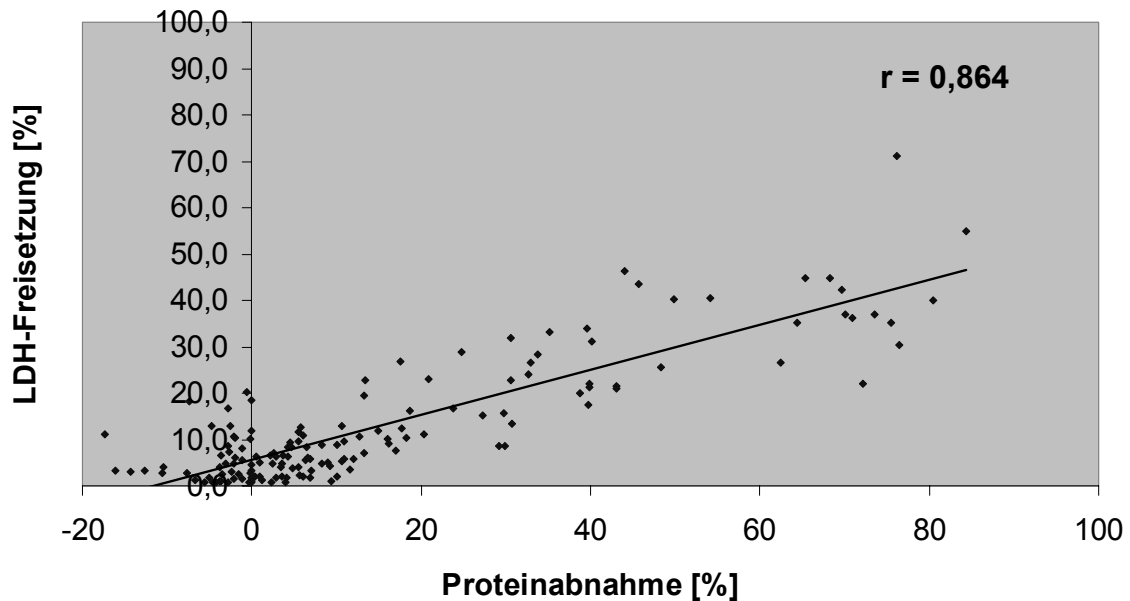
**Abbildung 21: Einfluss von 25 µM MD auf EPC-Zellen nach spezifischer Hemmung der Enzyme SOD (DETCA), GR (BCNU), DT-Diaphorase (DC), KAT (AMT) und GSH-Synthase (BSO)**

## 5.6 Proteingehalt als Nachweis zur Zytotoxizität

Auffällig war der  $CV_{\text{ges}}$  der LDH-Bestimmung von über 30 %. Über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte diese Methode im Vergleich die stärkste Streuung der Einzelwerte der Mehrfachbestimmungen in unabhängig voneinander durchgeführten Inkubationsreihen. Die Ungenauigkeit dieser Methode wird ebenfalls über den CV der Präzisionsprüfung von 37,6 % belegt. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei der LDH-Bestimmung um einen teuren „Test-Kit“ handelt, wurde versucht, die LDH-Bestimmung als Zytotoxizitätsparameter durch eine präzise und kostengünstigere Bestimmungsmethode zu ersetzen.

AIT-AISSA et al. (2000) und BIERKENS et al. (1998) beschreiben die Korrelation der Zytotoxizität mit dem Proteinabbau in unterschiedlichen zellulären Systemen.

In Abbildung 22 ist die Korrelation zwischen der LDH-Freisetzung aus den EPC-Zellen und dem Proteinabbau für 134 Proben- und Kontrollwerte dargestellt.



**Abbildung 22: Korrelation zwischen der Proteinabnahme und der LDH-Freisetzung in den EPC-Zellen**

Der Regressionskoeffizient  $r = 0,864$  dokumentiert eine deutliche Korrelation zwischen der Proteinabnahme in der EPC-Zelle und der LDH-Freisetzung ins Inkubationsmedium. Die Steigung der Geraden  $a = 0,48$  belegt einen ca. zweifach schneller verlaufenden Proteinabnahme gegenüber der LDH-Freisetzung. Eine mögliche Erklärung dieses Zusammenhanges könnte im hohen Molekulargewicht des Enzyms LDH liegen (140 kDa). Somit wäre der Austritt der Proteine durch die mittels Schadstoffeinfluss geschädigte Zellmembran leichter möglich als für „größere“ Zellinhaltsstoffe wie LDH. Ferner ist denkbar, dass durch den Schadstoffeinfluss funktionelle Gruppen der Proteine geschädigt wurden. Trifft dies für die zur Proteinbestimmung nach Bradford notwendigen Aminogruppen zu, erklärte sich der vergleichsweise höhere Proteinabnahme.

Außerdem ist die partielle Inaktivierung der LDH durch die Schadstoffeinwirkung möglich. Diese würde dazu führen, dass die zum Farbnachweis notwendige Umsetzung des Substrates Lactat langsamer abläuft und somit eine zu geringe LDH-Freisetzung anzeigen würde. Der genaue Zusammenhang zwischen beiden Messparametern ist anhand der Daten nicht aufzuklären. Die Aussagen von AIT-AISSA et al. (2000) und BIERKENS et al. (1998) wurden jedoch bestätigt. Die Bestimmung der Proteinabnahme im Zellpellet ist ein aussagekräftiger Messparameter zum Nachweis der Zytotoxizität und er ist geeignet, die unpräzise und teure LDH-Bestimmung zu substituieren.

## 5.7 Überprüfung der Präzision der angewandten Methoden

Die Präzisionsprüfung der fünf angewandten Bestimmungsmethoden Protein, GSH, GSSG, KAT und LDH ergab die in Tabelle 12 aufgeführten Kenndaten.

**Tabelle 12: Verfahrenskenndaten der durchgeführten Bestimmungen (n=16).** X: Mittelwert; s: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

	<b>Protein</b> [µg/Kultur- flasche]	<b>GSH</b> [nmol/mg Protein]	<b>GSSG</b> [nmol/mg Protein]	<b>KAT</b> [U/mg Protein]	<b>LDH</b> [mU/mg Protein]
<b>X</b>	2658	130,5	4,4	14,4	233,4
<b>S</b>	260,7	19,9	0,7	1,5	87,7
<b>CV</b>	9,8 %	15,2 %	15,7 %	10,6 %	37,6 %

Die Präzision der Methoden wurde mit n=16 Wiederholungsmessungen aus dem Zellmaterial einer Zellgeneration überprüft. Für den Proteingehalt, der einheitlichen Bezugsgröße aller übrigen Testergebnisse, lag der CV bei 9,8 %. In den Bestimmungen GSH, GSSG, KAT und LDH fließt der CV der Proteinbestimmung jeweils in den CV der Methode mit ein. Mit Ausnahme der LDH-Bestimmung, die einen CV von 37,6 % aufwies, lagen die CV für GSH, GSSG und KAT zwischen 10 – 20 %. Die relativ hohen Werte lagen wahrscheinlich zum größten Teil im CV der Proteinbestimmung begründet. Für die Untersuchung der EPC-Zellen waren die ausgewählten Methoden, mit Ausnahme der LDH-Bestimmung, hinreichend präzise für die durchzuführenden Untersuchungen. Die Datendokumentation erfolgt unter Kapitel 9.16, Tabelle A29

### 5.7.1 Bestimmung der Signifikanzniveaus der Methoden

Zur Bestimmung der SN der Methoden erfolgte zunächst die Transformation der absoluten Analytgehalte jeder Inkubation auf die jeweiligen absoluten Analytgehalte der KW. Die KW wurden auf einen Relativwert von 100 % festgelegt. Des Weiteren wurden durch den Bezug jeder Inkubation auf den jeweiligen Proteingehalt Fehler ausgeschlossen, die durch unterschiedliche Zellzahlen hervorgerufen wurden.

Um eine statistisch sichere Aussage über toxizitätsbedingte Analytänderungen treffen zu können, wurden die SN der Gesamtmethoden bestimmt (Anhang 9.3-9.14). In Tabelle 13 sind die ermittelten SN ( $\alpha = 0,95$ ) und die  $CV_{ges}$  der Bestimmungsmethoden über den gesamten Untersuchungszeitraum dargestellt.



Tabelle 13: Übersicht über die NG, das SN und den CV<sub>ges</sub> der verwendeten Methoden

Methode	NG	SN (%)	CV <sub>ges</sub> (%)
<b>SOD</b>	0,3 U/mL	13,5	8,8
<b>KAT</b>	30,2 mU/mL	20,0	13,6
<b>GPx</b>	1085 mU/mL	n.b.	-
<b>GR</b>	218 mU/mL	27,6	17,9
<b>GST</b>	95,4 mU/mL	25,9	16,8
<b>ext. GSH</b>	0,44 µM	10,5	15,6
<b>int. GSH</b>	0,44 µM	12,4	8,7
<b>ext. GSSG</b>	0,18 µM	n.b.	-
<b>int. GSSG</b>	0,18 µM	n.b.	-
<b>LDH</b>	13,0 mU/mL	4,2	33,3
<b>Protein</b>	13,7 mg/L	16,6	7,3

Für die externe und interne GSSG-Bestimmung war es nicht möglich, das SN und den CV<sub>ges</sub> zu bestimmen, da die GSSG-Grundgehalte der Kontrollwerte jeweils unterhalb der NG der Methode von 0,18 µM lagen. Gleiches gilt für die GPx-Bestimmung mit der NG von 1085 mU/mL.

Mit Ausnahme des LDH-Tests lagen alle SN im Bereich von 10-30%, d.h., dass erst ab Analytänderungen ausserhalb des SN (110-130%, bzw. 90-70%, bezogen auf den KW) toxizitätsbedingte Einflüsse als statistisch erwiesen galten. Diese SN stellen für die durchzuführenden Untersuchungen geeignete Grenzen dar, um durch chemische Substanzen induzierten oxidativen Stress statistisch nachzuweisen. In der Literatur werden prozentuale Steigerungsraten dieser biologischen Marker in Bezug auf den KW von z.T. mehreren hundert Prozent beschrieben. So zeigte MEYER (2000) bei ihren Untersuchungen an zwei primären, humanen Zelllinien relative Induktionsfaktoren für die Enzyme SOD, KAT und GPx bis zum Faktor 10.

## 6 Ergebnisse

Es wurden von allen Proben mit einer signifikanten GSSG-Bildung größer 0,1 MÄ (=SN) Dosis-Wirkungskurven aufgenommen. Hierzu wurde ausgehend von den unverdünnten Extrakten bzw. Fraktionen jeweils über 1:2-Verdünnungsschritte die Stoffmenge reduziert. Zum besseren graphischen Vergleich der Unterschiede der einzelnen Proben in Bezug auf die GSSG-Bildung wurde auf die Darstellung der Fehlerindikatoren verzichtet und die Abszisse einheitlich in einfach logarithmischer Darstellung im Bereich von 0,1 – 10000 µg gesamt-organischer Kohlenstoff (TOC)/mL Testlösung darstellt. Für die Ordinate erwies sich der Bereich bis 2,0 MÄ als optimaler Darstellungsbereich. Der Vergleich des oxidativen Potentials der beobachteten GSSG-Bildung erfolgte auf Basis der Benchmark von 0,2 MÄ (Multiplikation des SN mit dem Faktor zwei).

### 6.1 Untersuchung der Sedimentrohextrakte

#### 6.1.1 Nordsee (ISIS-1, ISIS-2 und ISIS-5)

Abbildung 23 zeigt die Dosis-Wirkungskurve der GSSG-Bildung als MÄ für die Nordseestationen ISIS-1 und ISIS-2 sowie ISIS-5. Der unverdünnte Rohextrakt ISIS-1 wies einen Stoffgehalt von 443 µg TOC/mL Testlösung, ISIS-2 von 1132 µg TOC/mL und ISIS-5 850 µg TOC/mL auf. Die geringsten getesteten Stoffmengen lagen hierbei bei 28 µg TOC/mL, 71 µg TOC/mL bzw. 34 µg TOC/mL. Die unterschiedlichen im Testsystem eingesetzten TOC-Gehalte resultierten aus den variierenden absoluten TOC-Gehalten der Sedimente (siehe Tabelle 5).

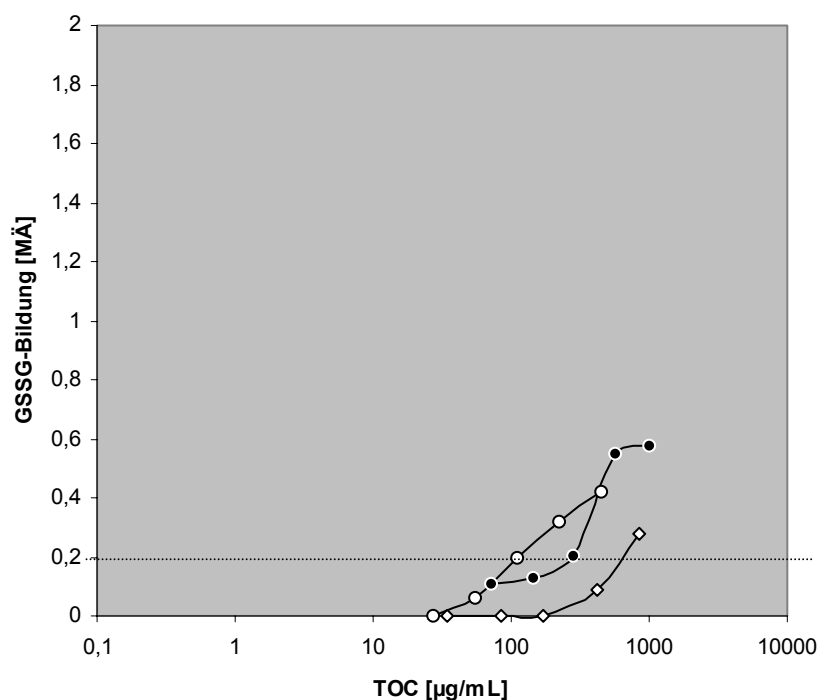


Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurven der Rohextrakte der Nordsee (ISIS-1, -2 und -5)

Alle Graphen zeigen ein dosisabhängiges oxidatives Potential der drei Nordseerohextrakte. Die maximalen Effekte wurden in allen Fällen jeweils durch die maximal mögliche Stoffmenge, den unverdünnten Rohextrakt, induziert. Man sieht deutlich, dass die Effekte mit verminderter Stoffmenge schwächer werden, wobei der prooxidative Effekt auf das Redoxsystem GSx für ISIS-1 dominierte. Die Rohextrakte der Stationen aus der Deutschen Bucht (ISIS-1 und ISIS-2) zeigten höhere Effekte als die Station des Skagerraks (ISIS-5). Eine mögliche Erklärung liegt in der Nähe des Einflussbereiches von Weser und Elbe und deren anthropogener Schadstoffeinträge in die Deutsche Bucht.

Vergleicht man die Proben anhand der Benchmark von 0,2 MÄ, so ergeben sich Benchmark-Konzentrationen von 110 µg TOC/mL (ISIS-1), 280 µg TOC/mL (ISIS-2) und 680 µg TOC/mL (ISIS-5) für die drei Rohextrakte der Nordsee. Die Dokumentation der Daten erfolgt unter Kapitel 9.16, Tabelle A30.

### 6.1.2 Ostsee (ISIS-3, ISIS-4, ISIS-6 und ISIS-7)

Abbildung 24 zeigt die Dosis-Wirkungskurve der GSSG-Bildung als MÄ für die vier untersuchten Ostseestationen. Der unverdünnte Rohextrakt ISIS-3 enthielt einen Stoffgehalt von 1920 µg TOC/mL, ISIS-4 von 845 µg TOC/mL, ISIS-6 von 830 µg TOC/mL und ISIS-7 von 450 µg TOC/mL Testlösung. Die geringsten getesteten Stoffmengen lagen entsprechend bei 60 µg, 34 µg, 33 bzw. 36 µg TOC/mL Testlösung.

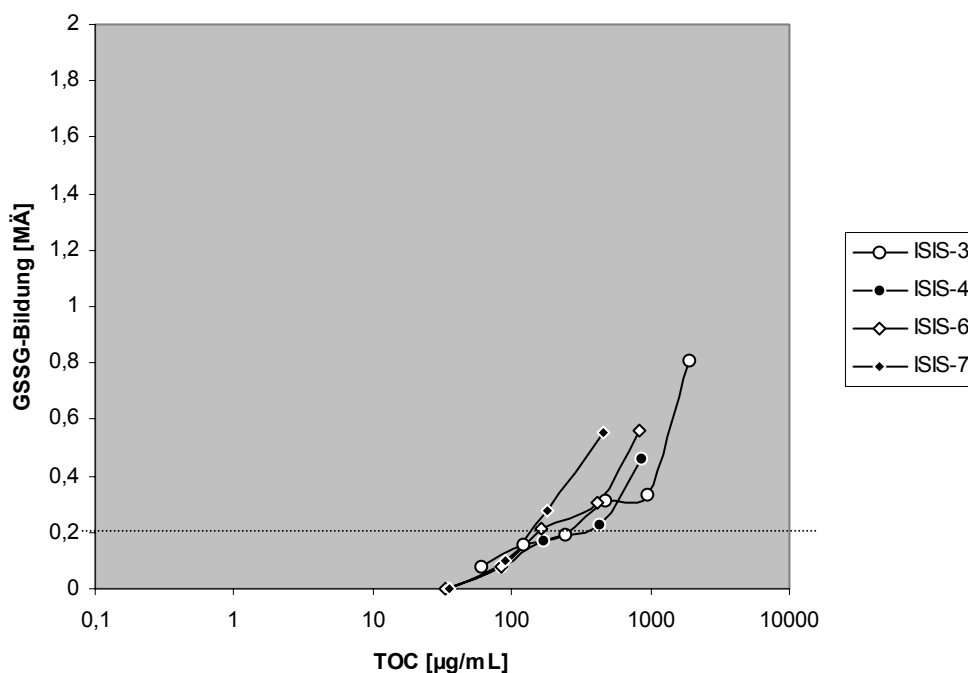


Abbildung 24: Dosis-Wirkungskurven der Rohextrakte der Ostsee ISIS-3, -4, -6 und -7

Alle Ostseerohextrakte zeigten für die maximal eingesetzte Stoffmenge den maximalen Effekt. Man erkennt, dass der Verlauf der Graphen im Bereich von 30 – 300  $\mu\text{g TOC/mL}$  weitestgehend simultan verläuft. Dies wird auch durch den Vergleich der vier Extrakte anhand der Benchmark von 0,2 MÄ deutlich. Die entsprechenden Benchmark-Konzentrationen lagen bei 130  $\mu\text{g TOC/mL}$  für ISIS-7, 150  $\mu\text{g TOC/mL}$  für ISIS-6, 250  $\mu\text{g TOC/mL}$  für ISIS-3 und 340  $\mu\text{g TOC/mL}$  für ISIS-4. Die Dokumentation der Daten erfolgt unter Kapitel 9.16, Tabelle A30.

### 6.1.3 Elbe Hamburg (Seemannshöft und Blankenese)

In Abbildung 25 sind die Dosis-Wirkungskurven für die Elbeproben Seemannshöft und Blankenese dargestellt. Es handelt sich bei beiden Standorten um Proben aus dem Elbebereich (Westen HH). Der Stoffgehalt der unverdünnten Rohextrakte betrug 322  $\mu\text{g TOC/mL}$  für Seemannshöft und 214  $\mu\text{g TOC/mL}$  für Blankenese. Die geringsten eingesetzten Stoffmengen lagen entsprechend bei 10 bzw. 13,4  $\mu\text{g TOC/mL}$ . Der Verlauf beider Kurven ist nahezu identisch, mit maximalem Effekt bei größter eingesetzter Stoffmenge und einer Effektreduzierung mit abnehmender Stoffmenge. Die Benchmark-Konzentrationen ermitteln sich zu 41  $\mu\text{g TOC/mL}$  für Seemannshöft und 75  $\mu\text{g TOC/mL}$  für Blankenese. Die Daten sind unter Kapitel 9.16, Tabelle A31 dokumentiert.

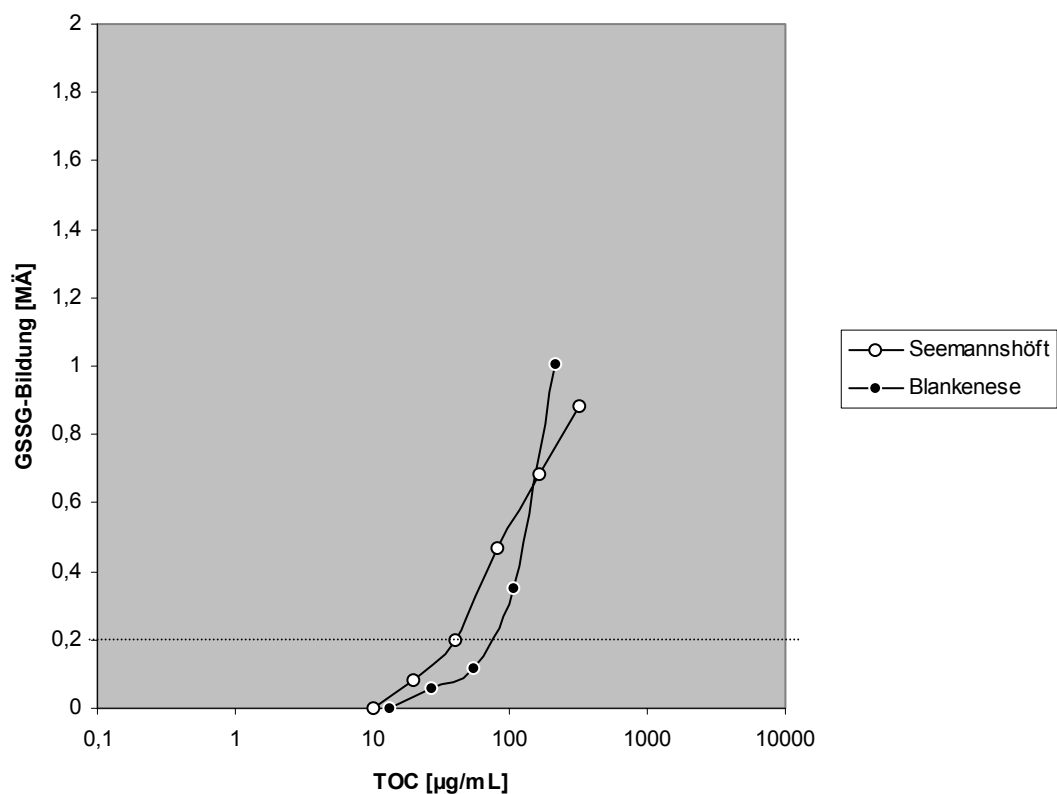


Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurven der Elbestationen Seemannshöft und Blankenese

### 6.1.4 Industriefahen Hamburg (Veringkanal und Seehafen-4)

Es wurden zwei Sedimentproben aus dem Hamburger Hafen mit dem GSx-Test untersucht. Beide Sedimente stammen aus dem Industriefahen, wobei es sich bei dem Veringkanal um einen kleinen Seitenkanal im Stadtteil HH-Wilhelmsburg handelt, der im Einflussbereich einer ehemaligen Erdölraffinerie lag. Der Seehafen-4 ist ein Containerhafen in der Nähe von HH-Harburg.

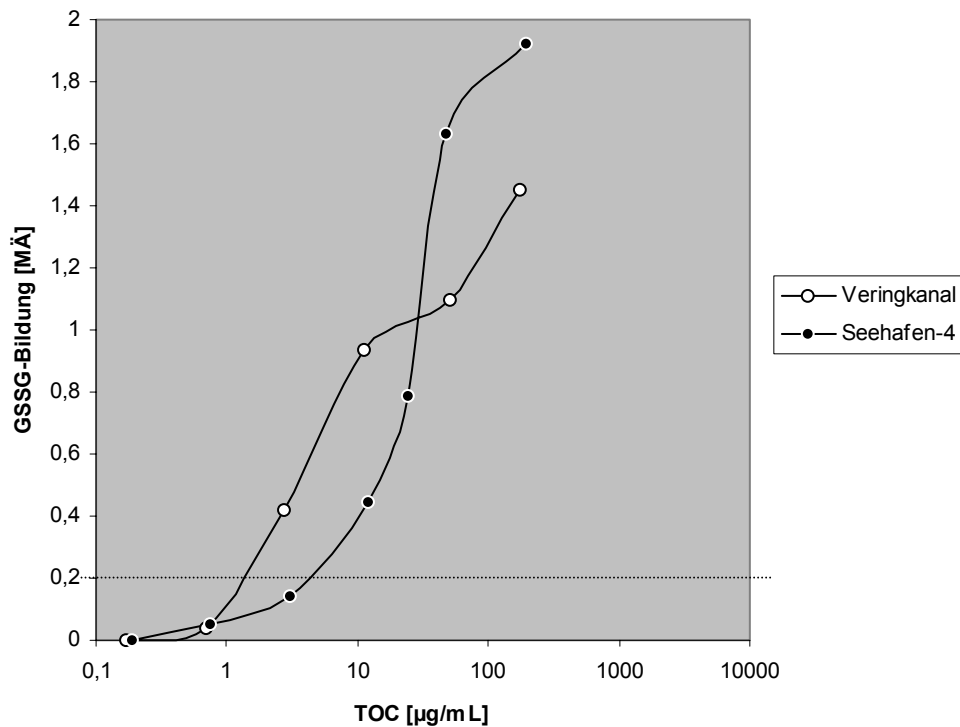


Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurven der Rohextrakte Veringkanal und Seehafen-4

Beide Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 26 zeigen die maximal induzierbare GSSG-Menge für die unverdünnten Rohextrakte mit den Stoffmengen von 176 µg TOC/mL für den Veringkanal und 192 µg TOC/mL für den Seehafen-4. Die Effekte nahmen mit fallender Stoffmenge bis jeweils 0,2 µg TOC/mL kontinuierlich ab. Im Vergleich aller untersuchten Rohextrakte wurden nur für die Proben aus dem Hamburger Industriefahen starke oxidative Stresspotentiale größer 1,0 MÄ ermittelt. Es wird deutlich, dass das oxidative Stresspotential der Hafensextrakte gegenüber dem der bisher dargestellten Extrakte aus Elbe oder Nord- bzw. Ostsee mit Abstand dominierte.

Die stark prooxidativen Potentiale dieser Sedimente werden durch die geringen Benchmark-Konzentrationen von 1,4 µg TOC/mL für den Veringkanal und 5 µg TOC/mL für den Seehafen-4 bestätigt. Die Daten sind im Kapitel 9.16, Tabelle A31 dokumentiert.

### 6.1.5 Vergleich der Rohextrakte

Es wurden die Benchmark-Konzentrationen als Basis für einen Standort-übergreifenden Vergleich des oxidativen Stresspotentials der elf Rohextrakte herangezogen. Die Umrechnung der dimensionslosen MÄ erfolgte über die Konzentration an MD, die 0,2 MÄ darstellt (0,86 µg MD/mL Testlösung). Durch den Bezug auf die jeweiligen Benchmark-Konzentrationen wurden die MÄ normiert auf ein Gramm TOC in µg MD angegeben, welche in einfach logarithmischer Darstellung in Abbildung 27 dargestellt sind.

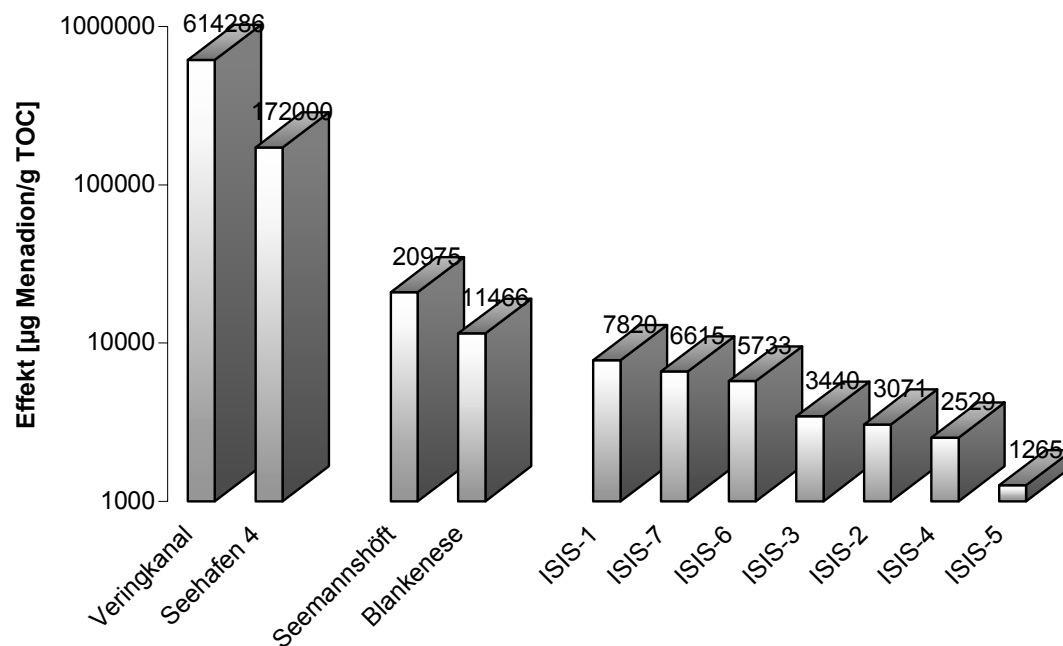


Abbildung 27: Vergleich des oxidativen Stresspotentials der 11 untersuchten Rohextrakte

Die ermittelten Effekte für die marinen Sedimentextrakte ISIS-1 bis ISIS-7 lagen im Bereich zwischen 1000 und 10000 µg MD/g TOC. Das bedeutet, dass der Gehalt an Verbindungen in den Sedimentextrakten mit einer zu MD vergleichbaren Wirkung im Bereich von 0,1 – 0,8 % MD, bezogen auf den TOC-Gehalt der Proben, lag. Für Seemannshöft und Blankenese wurde ein Anteil von 1-2 % MD-Äquivalent ermittelt. Für den Seehafen-4 betrug der Anteil MD-äquivalenter Verbindungen bereits 17,2 %, die Probe mit dem höchsten Effekt auf das Redoxsystem GSx der EPC-Zellen - der Veringkanal – lag bei 61,4 % MD-ähnlicher Wirkung des TOC-Gehaltes.

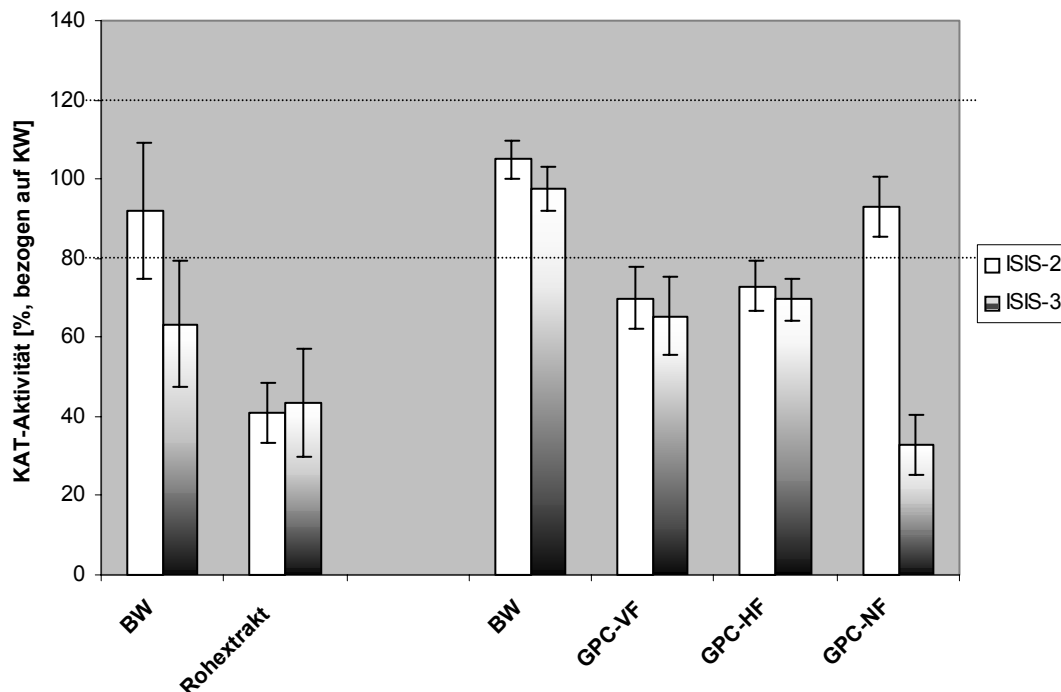
Diese hohen prozentualen Anteile deuten darauf hin, dass in diesen Proben Verbindungen enthalten sind, deren oxidative Wirkungen die des MDs bei weitem übersteigen. Es erscheint unwahrscheinlich, dass es sich bei über der Hälfte des extrahierten organischen Kohlenstoffes um wirksame oxidative Stressoren handelt. Viel mehr läßt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass es sich hierbei um

synergistische Wirkmechanismen der enthaltenen Schadstoffe handeln könnte. Die Dokumentation der Daten erfolgt unter Kapitel 9.16, Tabelle A32.

## 6.2 Untersuchung mariner Sedimentextrakte mittels BDF

### 6.2.1 KAT-Induktion

Zur abschließenden Überprüfung der KAT-Induktion als geeignetem Nachweis eines durch komplexe Proben induzierten oxidativen Stresses für die Untersuchung mariner Sedimentextrakte wurden die Rohextrakte, die Fraktionen der Stufe II und die zugehörigen Methodenblindwerte (BW) auf die Veränderungen der KAT-Aktivität der EPC-Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 für die maximal einzusetzende Stoffmenge dargestellt.



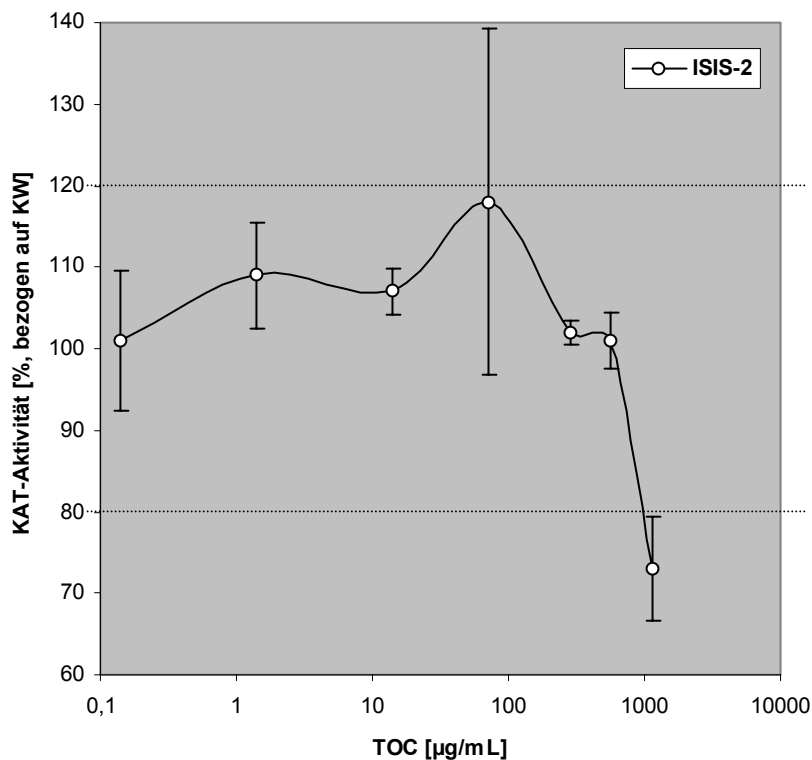
**Abbildung 28:** Änderung der KAT-Aktivität in EPC-Zellen nach Inkubation mit Rohextrakten, Fraktionen der Stufe II und BW für ISIS-2 und ISIS-3. KAT-Aktivität zwischen 80 % und 120 % der relativen Aktivität stellen SN der Methode dar (siehe Tabelle 13, Kapitel 4.7.1).

Die Inkubation mit den beiden Rohextrakten bedingte eine signifikante KAT-Inhibierung von circa 60 %, bezogen auf den KW. Hierbei war ein Einfluss des Rohextrakt-BW für ISIS-3 nicht auszuschließen, der ebenfalls eine signifikante Abnahme der KAT-Aktivität (ca. 40 %) erzeugte. Betrachtet man die Fraktionen und den BW der Stufe II wird deutlich, dass die signifikanten Abnahmen aller drei Fraktionen nicht über den Einfluss des BW ausgelöst wurden. GPC-VF und GPC-HF beider Proben wiesen signifikante KAT-Abnahmen in dessen Aktivität zwischen 30 – 35 % auf. Die entschwefelte GPC-NF der Probe ISIS-2 zeigte als einzige Fraktion

keine KAT-Inhibierung. Hierin unterscheidet sich die nicht entschwefelte GPC-NF ISIS-3, welche die größte KAT-Inhibierung aufweist. Die Restaktivität der KAT betrug in diesem Fall noch 33 %. Die Daten sind unter Kapitel 9.16, Tabelle A33 dokumentiert.

Es wurden Dosis-Wirkungskurven aufgenommen, um zu überprüfen, ob durch die Verringerung der Stoffmenge die Abnahme der KAT-Aktivität durch Hemmung oder Inaktivierung verringert wird. Eventuell auftretende inhibierende Effekte der KAT-Induktion würden dadurch verringert und würden theoretisch zu einer Aktivitätssteigerung im Vergleich zur KW führen.

Abbildung 29 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für die GPC-HF der Probe ISIS-2 (Daten siehe Kapitel 9.16, Tabelle A34).



**Abbildung 29: Dosis-Wirkungskurve KAT-Aktivität in Abhängigkeit zur eingesetzten Stoffmenge der Fraktion GPC-HF von ISIS-2**

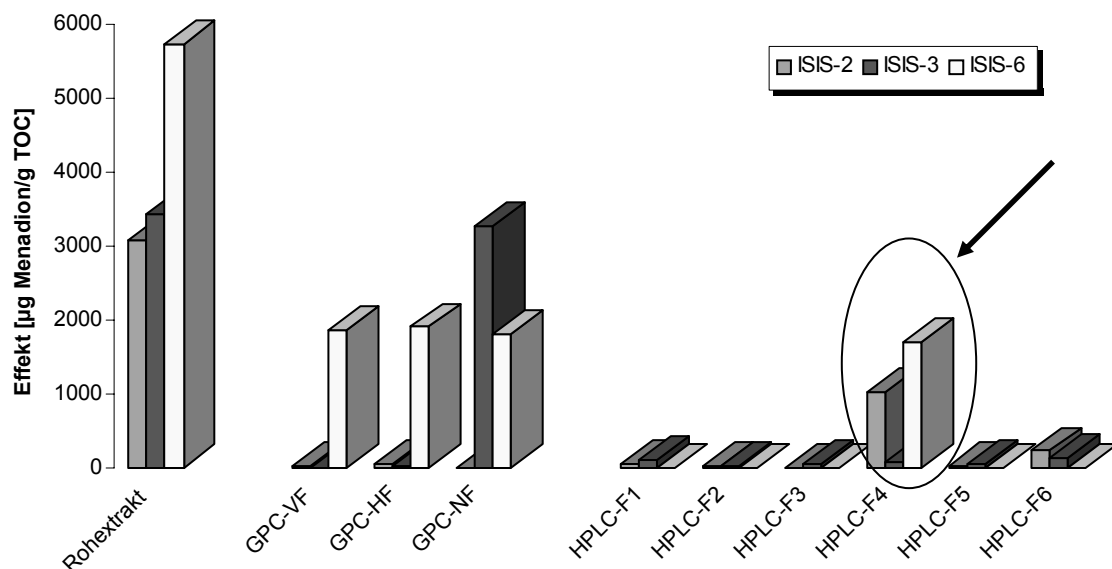
Die unverdünnte Fraktion wies eine Stoffmenge von 1310 µg/mL Testlösung und die letzte Verdünnung (1:8000) eine Stoffmenge von 0,16 µg TOC/mL auf. Das Ergebnis der Aktivitätsabnahme der KAT für die unverdünnte GPC-HF von ca. 30% wurde bestätigt. Schon die Inkubation mit der halbierten Stoffmenge hob diesen Effekt auf. Es wurde im weiteren Verlauf der Dosis-Wirkungskurve keine Aktivitätssteigerung der KAT beobachtet. Die Ergebnisse gelten als Bestätigung, dass der biologische Marker KAT der EPC-Zellen für den Nachweis zum induzierten oxidativen Stress ungeeignet ist. Die KAT-Bestimmung wurde nicht weiter durchgeführt.



### 6.2.2 Redoxsystem GSx (ISIS-2, ISIS-3 und ISIS-6)

Die Auswahl der mittels des Ansatzes der BDF weiter untersuchten Rohextrakte erfolgte interdisziplinär durch die Teilprojektpartner des ISIS-Verbundes. Es wurden eine Nordsee- (ISIS-2) und zwei Ostsee-Proben (ISIS-3 und ISIS-6) untersucht.

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der BDF für die drei marinen Sedimentextrakte über zwei Stufen der Fraktionierung dargestellt. Die Effekte auf das Redoxsystem GSx wurden über die Auswertung der aufgenommenen Dosis-Wirkungskurven anhand der Benchmark-Konzentration 0,2 MÄ erhalten. Als Bezugsgröße für die Transformation der GSSG-Bildung von nmol/mg Protein in  $\mu\text{g MD/g TOC}$  diente die bei jeder Inkubationsreihe mitgeführte Positivkontrolle 25  $\mu\text{M MD}$  (Daten siehe Kapitel 9.16, Tabelle A32).



**Abbildung 30: Ergebnisse der BDF für die Sedimentextrakte ISIS-2, ISIS-3 und ISIS-6**

Man erkennt deutlich die höchsten Effekte für die Rohextrakte von ISIS-2 und ISIS-3 im Bereich von 3000-3500  $\mu\text{g MD/g TOC}$  und von ISIS-6 mit fast 6000  $\mu\text{g MD/g TOC}$  im Vergleich zu den Effekten der daraus erhaltenen Fraktionen. Der Extrakt der Station ISIS-6 aus der Odermündung zeigt ein doppelt so starkes oxidatives Potential wie die Extrakte aus der Kieler Förde bzw. der Deutschen Bucht bei Helgoland.

Für die erste Stufe der Fraktionierung mittels GPC in die drei Fraktionen VF, HF und NF stellte sich die Effektsituation anders dar. Die drei Fraktionen der Station ISIS-2 zeigten in keinem Fall einen Effekt größer 100  $\mu\text{g MD/g TOC}$ . Durch nicht vollständig zu evaluierende Einflüsse während der Fraktionierung des Rohextraktes hat sich der

zuvor noch existente Effekt aufgelöst. Gleiches wurde für die VF und HF der Probe ISIS-3 beobachtet, wobei hier jedoch der Effekt des Rohextraktes nahezu vollständig in der NF lokalisiert ist.

In Anbetracht der Tatsache, dass in der NF der GPC mit Ausnahme eines geringen Anteils höher kondensierter PAK (vierkernig und größer, z.B. Pyren, Chrysen, Benz[a]pyren, u.a) nur elementarer Schwefel ( $S_8$ ) nachgewiesen wurde (REINEKE, 2002), und aufgrund der unterschiedlichen Nachbehandlung der drei Proben der NF können die Effekte der NF eng mit dem Auftreten von  $S_8$  korreliert werden. Die NF ISIS-3 wurde nicht, wie die NF ISIS-2 und ISIS-6, mit aktiviertem Kupfer entschwefelt. Die analytische Überprüfung der Schwefelabtrennung mittels HPLC-UVD ergab, dass die NF ISIS-2 praktisch frei von  $S_8$ , in der NF ISIS-6 Schwefel jedoch noch in Spuren nachzuweisen war. Eine Quantifizierung des  $S_8$  wurde nicht durchgeführt, alle Aussagen beruhen auf der qualitativen Interpretation der UVD-Chromatogramme (ISIS, 2001 und ISIS, 2002).

Zur Verifizierung des Einflusses  $S_8$  auf das Redoxsystem GSx erfolgte der Einsatz von  $S_8$  als Einzelsubstanz unter Kapitel 6.4.2.

Die Abtrennung der hochmolekularen organischen Begleitmatrix, wie Huminstoffen, erfolgte mit der VF. Für die VF ist eine kausale Verbindung zu deren Inhaltsstoffen nicht möglich, da das Hauptaugenmerk der analytischen Identifizierung von Inhaltsstoffen auf Seiten der HF lag, in der der überwiegende Teil der anthropogenen Schadstoffe enthalten war. Auf Angaben zu einzelnen in der HF enthaltenen Schadstoffklassen wird hier verzichtet, da diese Fraktion in der folgenden Stufe III der BDF weiter unterfraktioniert wurde.

Es wird deutlich (Abbildung 30), dass nur für ISIS-6 ein Effekt für die VF, HF sowie NF nachzuweisen war, wobei sich der Effekt des Rohextraktes von ca. 6000  $\mu\text{g MD/g TOC}$  zu gleichen Teilen auf die drei Fraktionen der zweiten Untersuchungsstufe zwischen 1800 und 2000  $\mu\text{g MD/g TOC}$  verteilte. In Bezug auf die NF wurde der Effekt mit dem analytischen Nachweis von  $S_8$  in Verbindung gebracht.

Die Untersuchungen der dritten Stufe ergaben, dass durch die weitere Fraktionierung der HF in sechs Unterfraktionen F1 – F6 mittels HPLC die Effekte hauptsächlich auf die Inhaltsstoffe der F4 zurückführen waren. Sowohl für ISIS-2 und ISIS-6 stellte die F4 die einzige Fraktion dar, von der ein deutlicher prooxidativer Einfluss auf das Testsystem mit Effekten von 1025  $\mu\text{g MD/g TOC}$  (ISIS-2) und 1700  $\mu\text{g MD/g TOC}$  (ISIS-6) ausging. Der Effekt von F6 für ISIS-2 wurde zu ca. 200  $\mu\text{g MD/g TOC}$  bestimmt. Die sechs HPLC-Fractionen für ISIS-3 zeigten eine nur sehr schwache GSSG-Induktion, wobei nur die F6 im Bereich größer 100  $\mu\text{g MD/g TOC}$  lag.

Basierend auf diesen Ergebnissen für die drei unterschiedlich belasteten Sedimentgruppen (Industriehafen, Elbe, Nordsee und Ostsee) kann eine Einstufung der Effekte in fünf Effektklassen nach Tabelle 14 erfolgen:

**Tabelle 14: Effektklassifizierung zum oxidativen Stress in 5 Klassen über den Parameter der GSSG-Bildung als MD-Äquivalenten [MÄ] in EPC-Zellen. (n.v. = nicht vorhanden)**

GSSG-Bildung [MÄ] [µg MD/g TOC]	Effekt- klasse	Effektstärke	Proben
> 100.000	<b>4</b>	<b>Sehr stark</b>	Hamburger Hafen
10.000 – 100.000	<b>3</b>	<b>stark</b>	Elbe (Hamburg)
1.000 – 10.000	<b>2</b>	<b>deutlich</b>	Nordsee, Ostsee; wenige BDF-Fraktionen
100 – 1.000	<b>1</b>	<b>schwach</b>	einige der BDF-Fraktionen
< 100	<b>0</b>	<b>n.v.</b>	Hauptteil der BDF-Fraktionen

Von den Proben der BDF der Stufe III wiesen nur die HPLC-F4 von ISIS-2 und ISIS-6 einen deutlichen Effekt auf. Diese Fraktionen wurden für die vierte Stufe der Fraktionierung ausgewählt, mit dem Ziel, die toxisch relevanten Komponenten zu identifizieren.

Bei der Untersuchung der Stufe IV wurde in keiner Unterfraktion ein Effekt größer 100 µg MD/g TOC gemessen. Mögliche Erklärungen sind die durch die Fraktionierung erreichte Reduzierung in der Schadstoffkomplexizität, so dass additive Effekt wegfallen. Ferner war durch die Art der Fraktionierung nicht gewährleistet, dass die einzelnen Schadstoffe je in einer einzelnen Unterfraktion eluierten, sondern sie waren jeweils auf mehrere Unterfraktionen verteilt. Dies hatte eventuell zur Folge, dass in der geringeren Schadstoffkonzentration in den Fraktionen der Stufe IV die Ursache für die schwachen bzw. nicht mehr existenten Effekte zu sehen ist.

Der Ansatz der BDF war somit nicht geeignet, die toxikologisch relevanten Substanzen zum induzierten oxidativen Stress in marinen Sedimenten zu identifizieren.

Als Teilerfolg ist zu werten, dass mittels der durchgeführten Fraktionierung ein Anteil von ca. 20 % der die GSSG-Bildung verursachenden Schadstoffe des Rohextraktes in der Unterfraktion HPLC-F4 isoliert wurden, wie die Dosis-Wirkungskurven des Rohextraktes, GPC-HF und HPLC-F4 für die Station ISIS-2 und ISIS-6 in den Abbildungen 31 und 32 verdeutlichen (Daten siehe Kapitel 9.16, Tabelle A35).

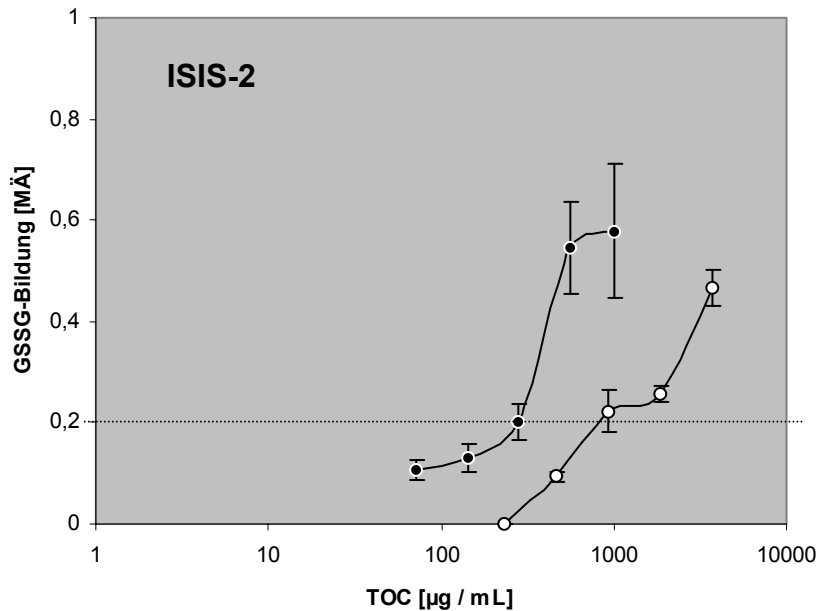


Abbildung 31: Dosis-Wirkungskurven ausgewählter BDF-Fractionen der Station ISIS-2

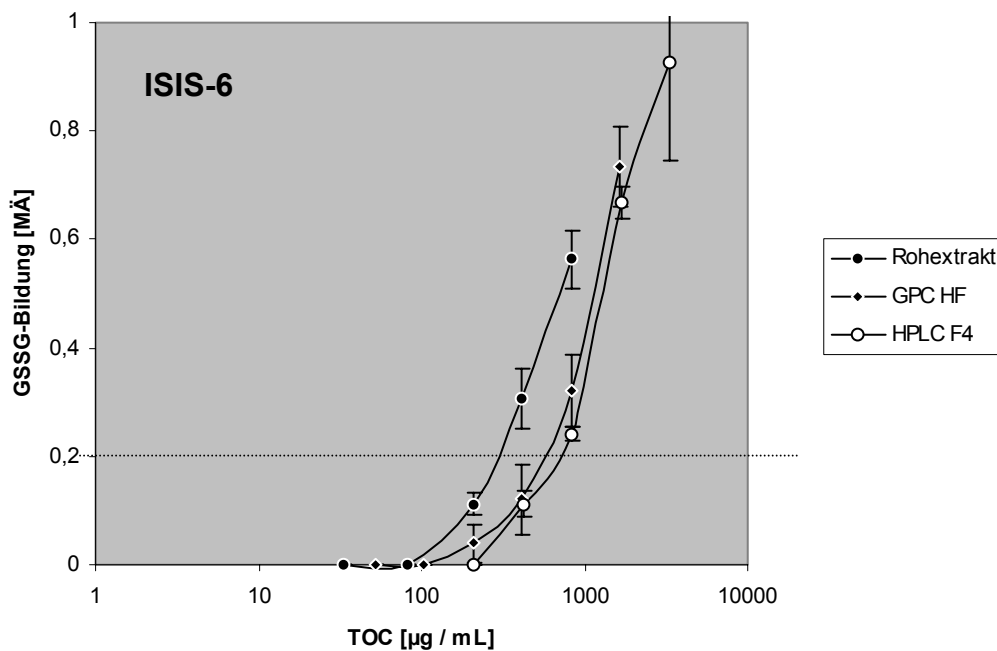


Abbildung 32: Dosis-Wirkungskurven ausgewählter BDF-Fractionen der Station ISIS-6

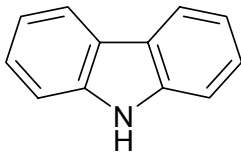
Es war für die Probe ISIS-2 keine Dosis-Wirkungskurve für die GPC HF zu bestimmen, da keine signifikante GSSG-Bildung größer 0,1 MÄ beobachtet wurde.

### 6.3 Verifizierung der Effekte der BDF-Untersuchungen

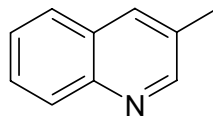
Da die Fraktionen der Stufe IV keine prooxidativen Effekte in der EPC-Zelllinie mehr verursachten, wurde versucht, anhand der nachgewiesenen Inhaltsstoffe der HPLC-F4 der Proben ISIS-2 und ISIS-4 die Effekte zu verifizieren. Hierzu sollten die dort identifizierten Schadstoffe als Einzelsubstanzen eingesetzt und bei Effektstärken größer 0.1 MÄ über Dosis-Wirkungskurven die Benchmark-Konzentration (0,2 MÄ) ermittelt werden.

Abschließend war über einen Vergleich der Konzentrationen für die Effekte der Einzelsubstanzen mit den Effekten in den ISIS-Proben zu klären, ob die Einzelschadstoffe diese plausibel erklären können.

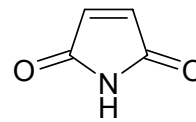
Die mengenmäßig dominanten Schadstoffe in der HPLC-F4 waren Butylphthalate und Bis(2-ethylhexyl)-phthalat. Ferner wurden Carbazol und dessen Derivate, Benzanthron, Anthron, Maleinsäureimid-Derivate, 3-Methylchinolin, 4-Bromindol, 4-Bromphenol, Tris-(2-chlorethyl)-phosphat und *N,N'*-Diethyl-*N,N'*-diphenylharnstoff qualitativ nachgewiesen (HEINZEL, 2002; REINEKE, 2002). Diese Komponenten wurden neben weiteren Schadstoffen, für die ein begründeter Verdacht bestand, dass sie Bestandteile der HPLC-F4 waren, untersucht. Die Strukturen der Substanzen sind in Abbildung 33 dargestellt.



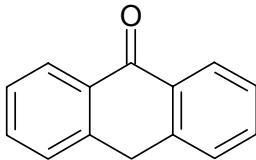
Carbazol



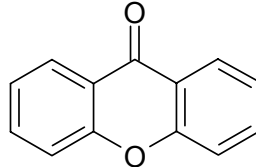
3-Methylchinolin



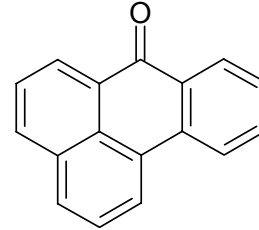
Maleinsäureimid



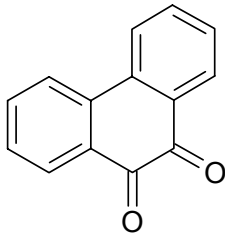
Anthron



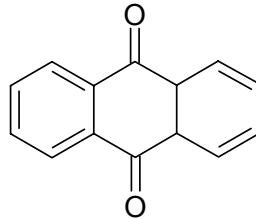
Xanthon



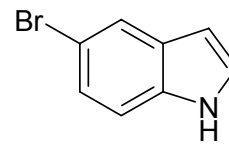
Benzanthron



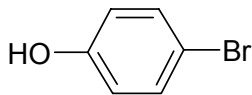
9,10-Phenanthrenchinon



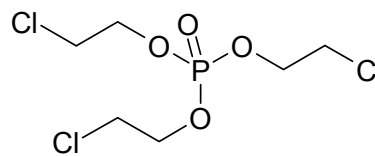
9,10-Anthrachinon



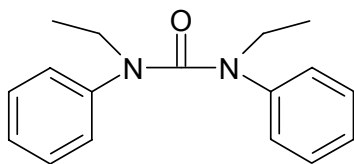
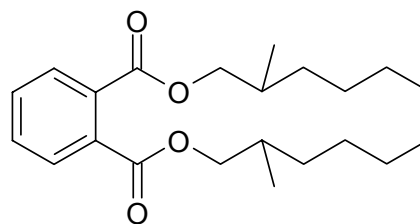
5-Bromindol



4-Bromphenol



Tris-(chlorethyl)-phosphat

*N,N'*-Diethyl-*N,N'*-diphenylharnstoff

DEHP

**Abbildung 33: Im GSx-Test eingesetzte Einzelsubstanzen der HPLC-F4**

Von den 13 untersuchten Einzelsubstanzen wurde nur für die Verbindung 9,10-Phenanthrenchinon (PHEQ) ein Effekt auf das Redoxsystem GSx der EPC-Zellen beobachtet. Wie bei der verwendeten Positivkontrolle MD, handelt es sich bei PHEQ um eine chinoide Struktur, die in der Lage ist, über das Redox-Zyklus ROS zu bilden

(KUMAGAI et al., 2002; HASSPIELER und DI GIULIO, 1994; JARABAK und HARVEY, 1993). Die nähere Betrachtung dieser Verbindung erfolgt im nächsten Kapitel.

### 6.3.1 9,10-Phenanthrenchinon PHEQ

Die ermittelte Effektstärke von PHEQ auf die EPC-Zellen lag bei weitem über allen bisher getesteten Proben. Die Dosis-Wirkungskurve für den Konzentrationsbereich von 0,1 – 200  $\mu\text{M}$  ist in Abbildung 34 dargestellt. Die Benchmark-Konzentration wurde graphisch aus der Dosis-Wirkungskurve zu 0,15  $\mu\text{M}$  (30 ng/mL Testlösung) bestimmt. Die Daten sind unter Kapitel 9.16, Tabelle A36 dokumentiert.

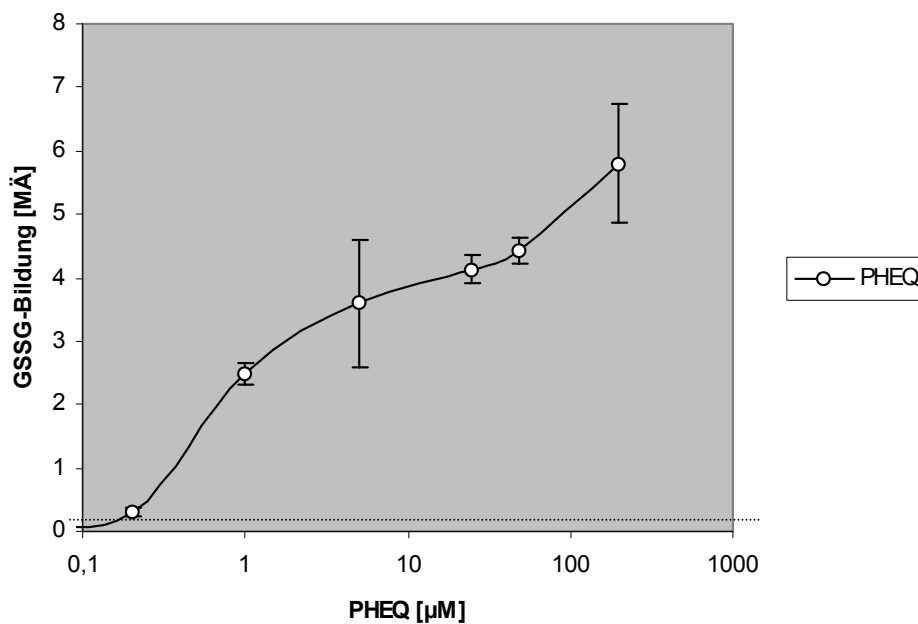


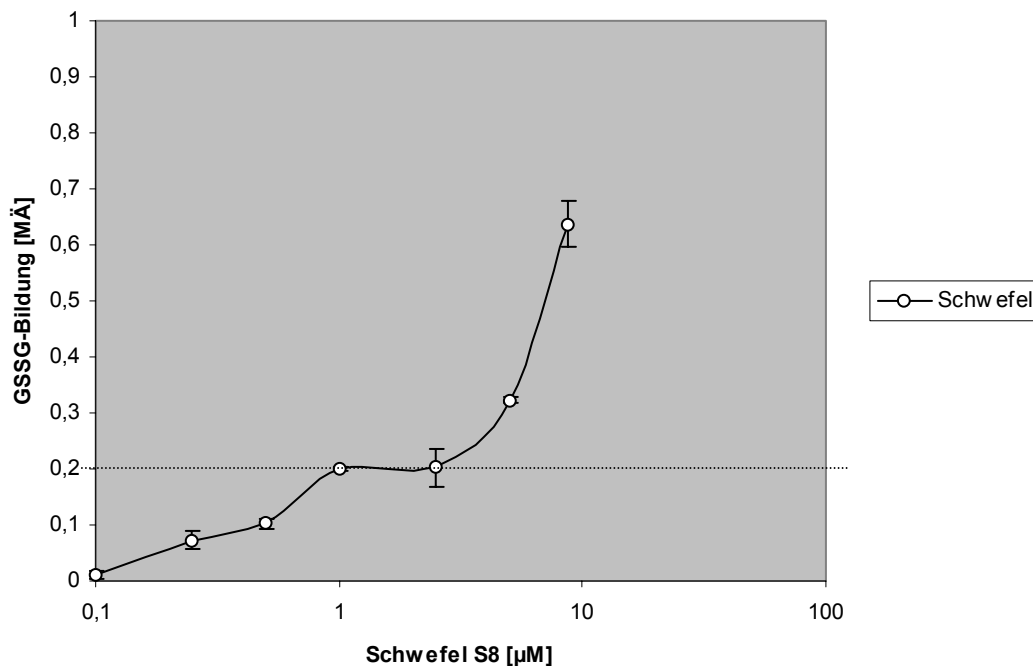
Abbildung 34: Dosis-Wirkungskurve von 9,10-PHEQ

Vergleicht man die Dosis-Wirkungs-(DW)-Kurve von PHEQ mit der von MD (Abbildung 20) ist offensichtlich, dass die Wirkung von PHEQ gegenüber der der Positivkontrolle eindeutig überwiegt. Eine GSSG-Bildung von 1 MÄ, welche für 25  $\mu\text{M}$  MD erreicht wird, war durch Inkubation mit PHEQ bereits bei ca. 0,5  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Beim Vergleich auf Basis der Benchmark-Konzentration 0,2 MÄ (s.o.) ergibt sich für PHEQ ein um den Faktor 12 stärkeres oxidatives Stresspotential als für MD (2,2  $\mu\text{M}$  bzw. 380 mg/mL Testlösung).

### 6.3.2 Elementarer Schwefel S<sub>8</sub>

Während der Untersuchungen der GPC-NF der Proben ISIS-2, ISIS-3 und ISIS-6 wurde die Schwefel-Sensitivität des GSx-Tests deutlich. Für andere Biotests wie den Leuchtbakterientest, der ebenfalls Bestandteil der ISIS-Biotestbatterie war, ist die Schwefel-Sensitivität bekannt und vielfach beschrieben (PARDOS et al., 1999; JACOBS et al., 1992). Über die Schwefel-Sensitivität für das Redoxsystem GSx ist in diesem Zusammenhang in der Literatur nichts bekannt.

Zur Verifizierung der Schwefel-Sensitivität wurde die in Abbildung 35 abgebildete Dosis-Wirkungskurve im Bereich von 0,1 – 8,65 µM Schwefel in der Modifikation S<sub>8</sub> aufgenommen. Es konnten keine höheren Schwefelkonzentrationen im Test eingesetzt werden, da die Konzentration von 8,65 µM bereits an der Löslichkeitsgrenze von S<sub>8</sub> im Lösungsvermittler DMSO lag. Die Benchmark-Konzentration 0,2 MÄ für S<sub>8</sub> beträgt 1 µM bzw. 256 ng/mL Testlösung. S<sub>8</sub> zeigt, wie PHEQ, für die Benchmark-Konzentration geringere Werte als die Positivkontrolle MD. Für S<sub>8</sub> liegt sie allerdings nur um den Faktor 2 niedriger als für MD. Die Dokumentation der Daten erfolgt unter Kapitel 9.16, Tabelle A36.



**Abbildung 35: Einfluss von elementarem Schwefel S<sub>8</sub> auf die GSSG-Bildung [MÄ] in EPC-Zellen im Konzentrationsbereich von 0,1 – 8,65 µM**

### 6.3.3 Nachstellung der Zellinkubation durch ein Modellsystem

Parallel zu den Versuchen der Zellinkubation wurden Versuche mit einem Modellsystem durchgeführt, welches jeweils nur die Einzelsubstanz und GSH enthielt. Hierüber wurden nähere Aufschlüsse über mögliche physiologische Zusammenhänge zwischen den stark differierenden Effekten der getesteten

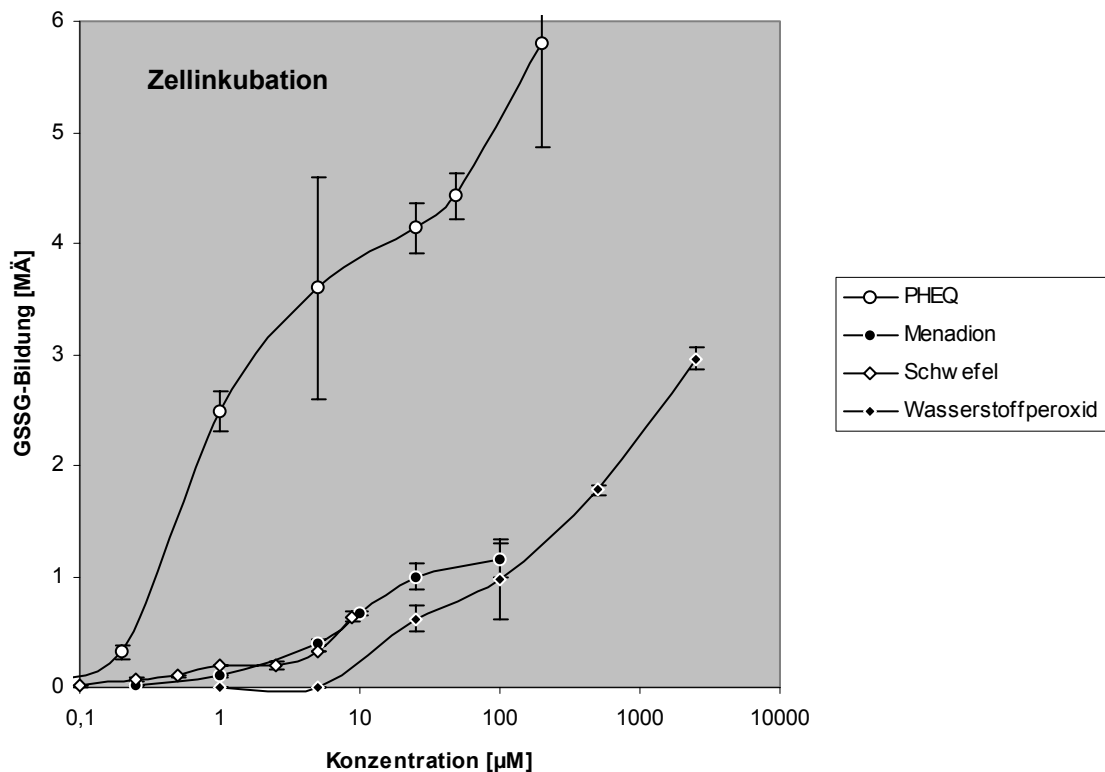


Schadstoffe erwartet. Für das Modellsystem blieben die Einflüsse der EPC-Zellen auf die Substanzen (z.B. natürliche Zellwand-Barriere, antioxidative Schutzmechanismen, prooxidative Metabolisierung, ROS-Bildung) unberücksichtigt und lassen ausschließlich Informationen über die direkte Oxidation von GSH zu GSSG durch die eingesetzten Substanzen zu.

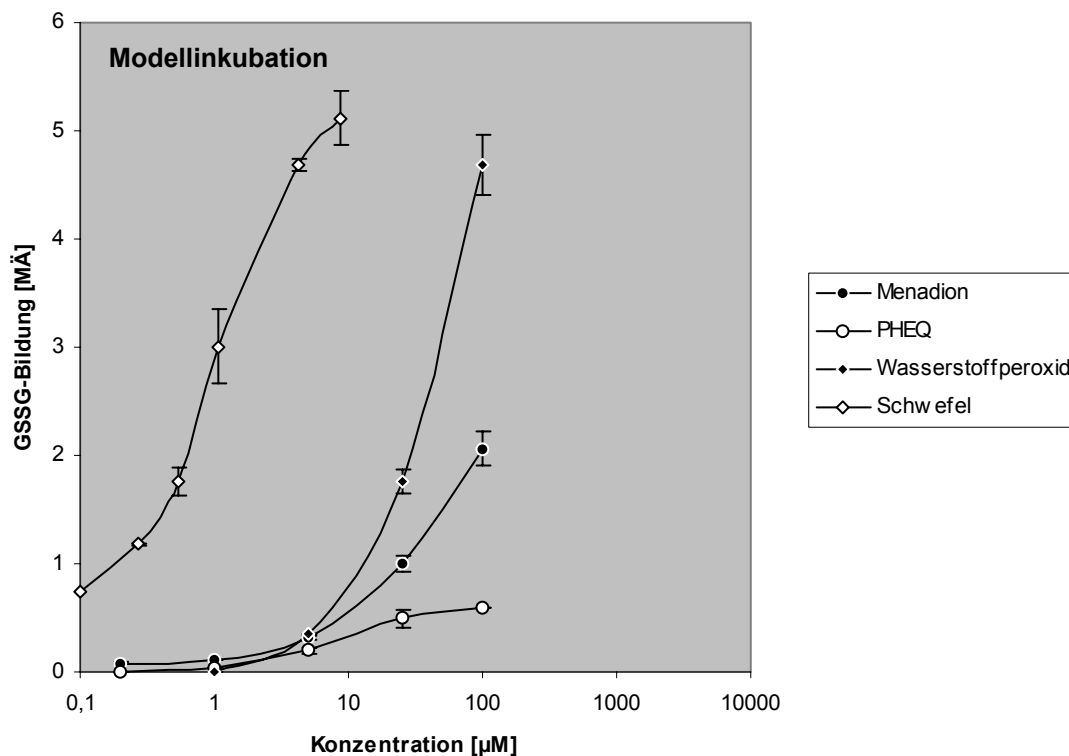
Die GSH-Konzentration für den Modellversuch von 7  $\mu\text{g/mL}$  Testlösung wurde durch Abschätzung des GSH-Gehaltes [nmol/Testansatz] bei der Zellinkubation ermittelt.

Neben PHEQ und MD wurde ebenfalls der Einfluss von elementarem Schwefel  $\text{S}_8$  und von Wasserstoffperoxid im Modellsystem getestet. Anhand der Kenntnis der direkten GSH-Oxidation von Wasserstoffperoxid war ein Vergleich zur Wirkung der potentiellen Redox-Zykler MD und PHEQ mit der von Wasserstoffperoxid möglich. Bei Redox-Zyklus wird ebenfalls Wasserstoffperoxid gebildet, welches letzten Endes für die GSSG-Bildung verantwortlich ist. Somit müssten für diese drei Substanzen vergleichbare GSSG-Gehalte induziert werden.

In Abbildung 36 sind die DW-Kurven der GSSG-Bildung [MÄ] in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration der Einzelsubstanzen in der Zellinkubation und in Abbildung 37 in der Modellinkubation dargestellt (Daten siehe 9.16, Tabelle A36).



**Abbildung 36 : Einfluss der prooxidativen Einzelsubstanzen PHEQ, MD,  $\text{S}_8$  und Wasserstoffperoxid auf die GSSG-Bildung in EPC-Zellen**



**Abbildung 37: Einfluss der direkten GSH-Oxidation der prooxidativen Einzelsubstanzen PHEQ, MD, S<sub>8</sub> und Wasserstoffperoxid**

Durch die Ergebnisse beider Inkubationen war eine Abstufung über die Effektstärke der untersuchten Verbindungen möglich. Für die Zellinkubation war PHEQ der mit Abstand stärkste oxidative Stressor für das Redoxsystem GSx der EPC-Zellen. Es folgten mit vergleichbarer Intensität MD und S<sub>8</sub>. Die Inkubation mit Wasserstoffperoxid wies die geringste GSSG-Bildung auf.

**PHEQ >> MD = S<sub>8</sub> > Wasserstoffperoxid (Zellinkubation)**

Für die Modellinkubation zeigte sich ein gänzlich abweichendes Bild für die Effekte der vier Substanzen. S<sub>8</sub> dominierte sehr deutlich vor Wasserstoffperoxid, MD und PHEQ. Unterschiede in der GSSG-Bildung zwischen den letzten drei Verbindungen wurden erst ab Konzentrationen größer 5 µM deutlich. Hierbei besaß Wasserstoffperoxid ein größeres Vermögen, GSH direkt zu oxidieren, gefolgt von MD und PHEQ.

**S<sub>8</sub> >> Wasserstoffperoxid > MD > PHEQ (Modellinkubation)**

Vergleicht man die beiden unterschiedlichen Inkubationsarten, wird klar, dass durch die Reduzierung des Biotests auf das GSH-Oxidationsvermögen der Verbindungen - wie im Modellsystem - gänzlich andere Ergebnisse erhalten werden, als für

Inkubationen in den EPC-Zellen. Die Dokumentation der Daten erfolgte unter Kapitel 9.16, Tabelle A37.

Das Fazit dieser Untersuchung ist, dass der Effekt des  $S_8$  im Zellsystem mit der im Modellsystem beobachteten starken direkten Oxidation von GSH zu GSSG erklärbar ist. Die immense Effektverstärkung im Zellsystem durch die Einwirkung von PHEQ gegenüber den übrigen Verbindungen ist über die direkte GSH-Oxidation allerdings nicht plausibel zu erklären.

#### **6.3.4 Einfluss von PHEQ auf das Enzymsystem GR**

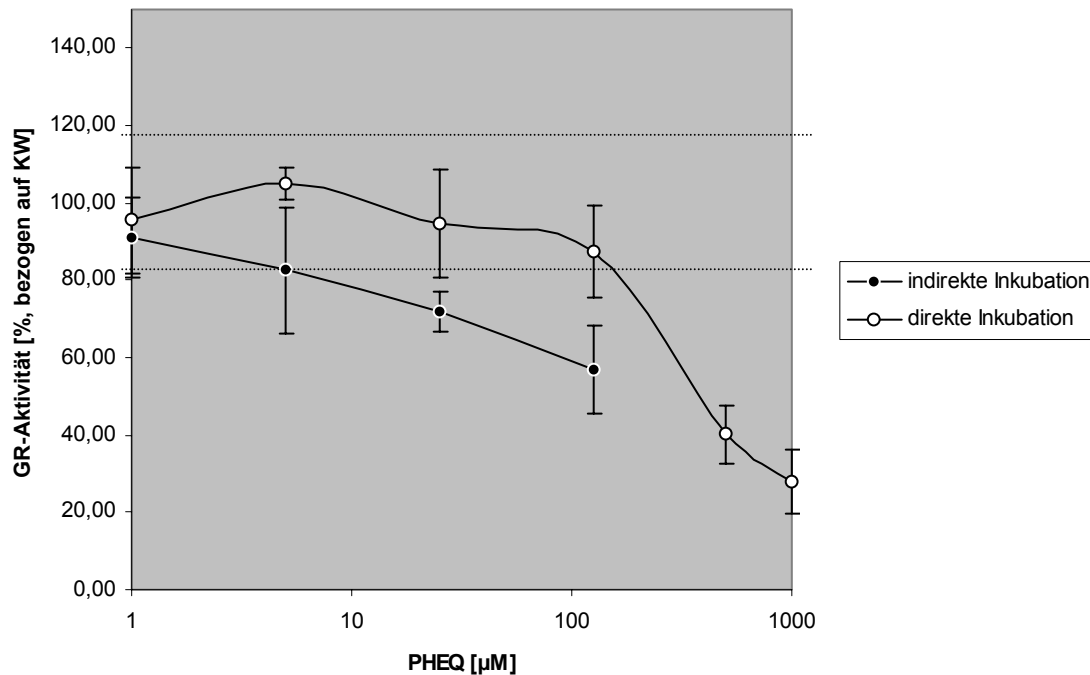
Im Rahmen der Sensitivitätsprüfung des Enzymsystems GR zur Detektion von oxidativem Stress wurden verschiedene Chinone bei 25  $\mu\text{M}$  (u.a. 1,2-NQ, 1,4-NQ, PHEQ, Anthrachinon (ANTQ), MD) untersucht. Der Hintergrund dieser Untersuchung lag in der bekannten Wirkung einiger Chinone als Redox-Zyker (ÖLLINGER und KAGEDAL, 2001; SEUNG et al., 1998; FLOWERS-GEARY et al., 1993; ÖLLINGER und BRUNMARK, 1991) und einer damit verbundenen verstärkten GSSG-Bildung. Es sollte überprüft werden, ob diese möglicherweise mit einer Steigerung der GR-Aktivität der Zellen einhergehen würde.

Es wurde bei der direkten Inkubation für 24 Stunden keine Steigerung der GR-Aktivität über das SN der Methode hinaus beobachtet. Stattdessen wurde ausschließlich für PHEQ eine starke Inhibierung bis auf 9,5 % Restaktivität, bezogen auf den KW, gemessen. Die Aussage zur Inhibierung der GR durch PHEQ relativiert sich, da parallel ein starker zytotoxischer Effekt detektiert wurde. Der Proteingehalt dieser Inkubation war um über 80 % reduziert. Zur Überprüfung der GR-Inhibierung wurde der Versuch mittels direkter (2 h; 1–1000  $\mu\text{M}$ ) und indirekter (2 h; 1–125  $\mu\text{M}$ ) Inkubation wiederholt.

Durch die indirekte Inkubation war ein direkter Bezug der Ergebnisse der GR-Inhibierung zu den Ergebnissen der GSSG-Bildung des Chinons PHEQ möglich.

Die direkte Inkubation wurde vergleichend durchgeführt zur Bestimmung des Einflusses der Inkubationsart auf die GR-Inhibierung. Die deutlich höheren Inkubationskonzentrationen, die bei der direkten Inkubation eingesetzt wurden, finden ihre Begründung in der Tatsache, dass für die direkte Inkubation ca. die zehnfache Zellmenge im Vergleich zur indirekten Inkubation eingesetzt wurde.

In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der GR-Inhibierung dargestellt. Die Daten der Versuche sind im Anhang 9.16, Tabelle A38 aufgeführt.



**Abbildung 38: Einfluss von PHEQ auf die GR-Aktivität in EPC-Zellen, bestimmt mittels direkter und indirekter Inkubation.** Details zur Inkubationsart (direkt; indirekt) siehe Kapitel 3.3. Das SN der GR-Methode ist in der Abbildung (----) kennzeichnet.

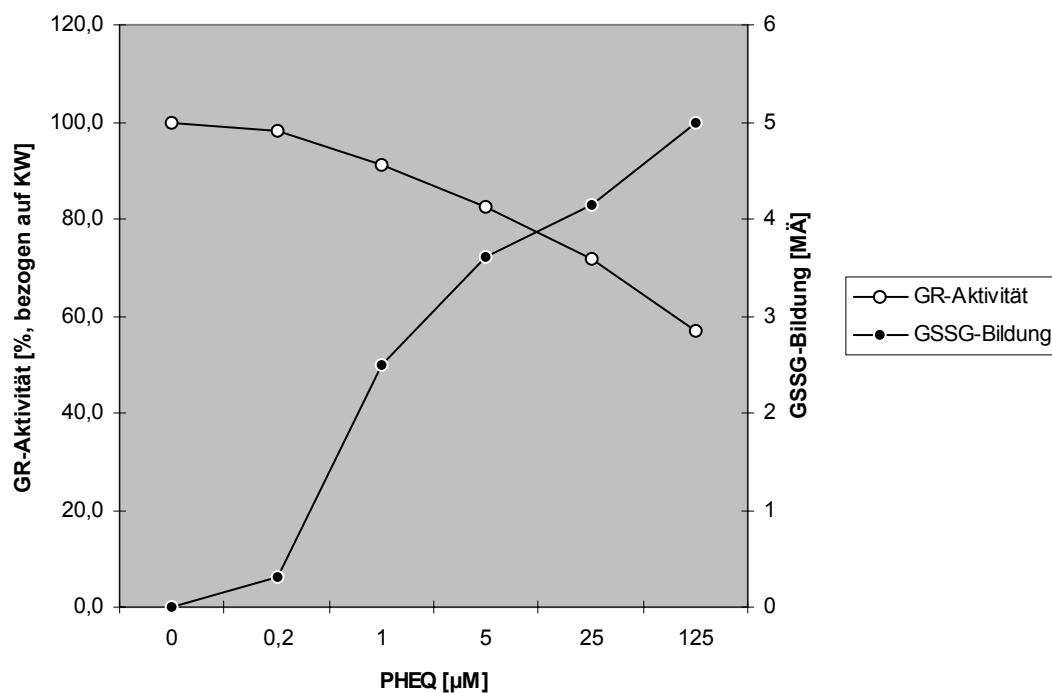
Betrachtet man die Verläufe der beiden Dosis-Wirkungskurven, ist zu erkennen, dass sich die GR-Inhibierung durch PHEQ bei der direkten Inkubationsart signifikant von der indirekten unterscheidet. Für die indirekte Inkubation war eine signifikante GR-Inhibierung bei 25 µM auf 72 % Restaktivität zu beobachten, die bei Einsatz von 125 µM auf 57 % Restaktivität abfiel. Für die Inkubation mit 5 µM ist kein statistisch sicherer Nachweis zur GR-Inhibierung zu führen, da der Schwankungsbereich der Doppelbestimmung im SN lag.

Bei der direkten Inkubation wurde erst bei 500 µM und 1 mM eine signifikante GR-Inhibierung auf 40 % bzw. 29 % Restaktivität festgestellt. Hierbei gilt zu beachten, dass, ähnlich wie bei der direkten Inkubation für 24 Stunden, ein zytotoxischer Effekt ermittelt wurde. Die Abnahme des Proteingehaltes der beiden Inkubationen lag bei 28 % bzw. 32 %.

Der verstärkende Effekt des PHEQ auf die GR-Inhibierung mittels indirekter Inkubation ist auf die bessere Durchmischung der EPC-Zellen mit dem Schadstoff zu erklären. Während bei der direkten Inkubation ein großer Teil der Zelloberfläche nicht direkt mit dem Schadstoff in Wechselwirkung treten konnte, da die Zellen noch am Boden der Zellkulturflasche hafteten, war bei der indirekten Inkubation eine maximale Wechselwirkung zwischen der Zelle und dem Schadstoff gewährleistet. Dass PHEQ in die EPC-Zellen gelangte, war aufgrund der Eigenfärbung von PHEQ optisch nachzuweisen. Die ansonsten farblosen Zellen färbten sich, abhängig von der eingesetzten Dosis in Folge der PHEQ-Aufnahme in die Zellen, ein.

Anhand der Ergebnisse zum Einfluss von PHEQ auf die GR-Aktivität in den EPC-Zellen ist zu folgern, dass PHEQ das Enzym GR inhibiert. Infolgedessen ist ein Zusammenhang, wie in Abbildung 39 dargestellt, zwischen der ermittelten hohen GSSG-Bildung und der GR-Inhibierung durch die Inkubation der EPC-Zellen mit PHEQ möglich. Die durch PHEQ induzierte, immense GSSG-Bildung ist allerdings nicht ausschließlich mit der GR-Inhibierung zu erklären (Daten siehe Anhang 9.16, Tabelle A39). SMITH und EVANS beschrieben 1984 eine SOD-Inhibierung des isolierten Enzyms durch PHEQ-Inkubation (05 h) bei Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$ . Die prozentuale Inhibierung lag bei 26 % bzw. 84 %. Ähnliche Inhibierungsraten wurden von den Autoren ebenfalls für 1,2-NQ und 1,4-NQ bestimmt.

Durch die Inkubation mit PHEQ wurden die beiden entscheidenden Enzymsysteme zur GSSG-Bildung inhibiert (siehe Kapitel 5.5.5), was eine Effektverstärkung bewirkt und eine mögliche Erklärung des starken PHEQ-Effektes auf das Redoxsystem GSx darstellt.

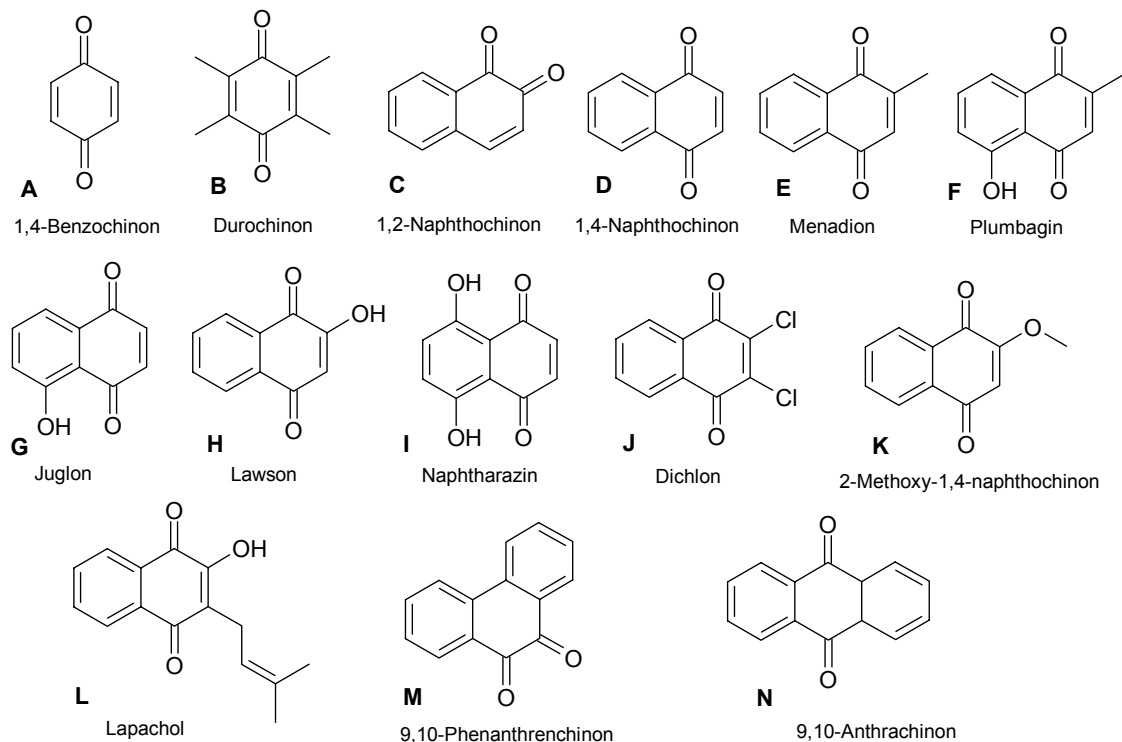


**Abbildung 39: Zusammenhang zwischen der GSSG-Bildung und der GR-Inhibierung in EPC-Zellen nach Inkubation mit PHEQ.** Zur besseren Übersicht wurden die Fehlerindikatoren nicht dargestellt.

## 6.4 Untersuchung von Naphthochinonderivaten

### 6.4.1 Substituenteneinfluss ausgewählter Naphthochinonderivate auf die GSSG-Bildung

Die bisherigen Ergebnisse im GSx-Test (MD, PHEQ) zeigten vor allem für chinoiden Verbindungen einen stark prooxidativen Einfluss auf die EPC-Zellen. Trotz der als eher gering eingestuften toxikologischen Relevanz (GARMAN, 1987) sollte durch die Inkubation der EPC-Zellen mit einer Auswahl von Naphthochinonderivaten sowie anderer Chinone der Substituenteneinfluss auf die GSSG-Bildung näher untersucht werden.



**Abbildung 40: Im GSx-Test untersuchte Chinone**

Hierzu wurden die 14 in Abbildung 40 aufgeführten Substanzen überprüft. Die 1,4-NQ-Derivate stellen, wie MD, eine Reihe wichtiger Naturstoffe dar (BINDER et al., 1989; AWANG et al, 1986).

Aus der Gruppe der unsubstituierten Chinone wurden 1,4-Benzochinon (BQ), 1,2-NQ, 1,4-NQ, PHEQ und ANTQ ausgewählt. Die geplante Prüfung höher kondensierter PAK-Chinone wie Benzanthrachinon und Chrysenchinon konnte aufgrund deren geringer DMSO-Löslichkeit nicht durchgeführt werden. Eine weitere Gruppe enthielt einfach und mehrfach substituierte Chinone, wobei mit Ausnahme des 2,3,5,6-Tetramethyl-BQ (Durochinon) ausschließlich 1,4-NQ-Derivate getestet wurden. Neben Lawson und Juglon wurde 5,8-Dihydroxy-1,4-NQ (Naphtharazin) als Vertreter der hydroxylierten 1,4-NQ verwendet.

Plumbagin stellt das an 5-Position hydroxylierte MD dar. 2-Methoxy-1,4-NQ ist die methylierte Verbindung ausgehend von Lawson. Lapachol weist an 3-Position eine isoprenoide Gruppe mit Lawson als Grundkörper auf. Abschließend ist die an 2,3-Position chlorierte Form des 1,4-NQ (Dichlon) eingesetzt worden.

In Tabelle 15 ist die GSSG-Bildung aller Chinone in MÄ jeweils für die Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  dargestellt. Zusätzlich ist die bei der GSx-Nettobilanzierung ermittelte GSH-Konjugation angegeben. Sie wurde jeweils aus dem gegenüber der Kontrollgruppe fehlendem GSx ermittelt. Zum besseren Vergleich des Substituenteneinflusses auf die GSSG-Bildung und die GSH-Konjugation der 1,4-NQ-Derivate sind die unterschiedlichen Substituenten R1 – R4 ebenfalls aufgeführt. Die Daten sind im Anhang unter Kapitel 9.16, Tabelle A40 dokumentiert.

**Tabelle 15: GSSG-Bildung und GSH-Konjugation in Abhängigkeit von 14 unterschiedlichen Chinonen in EPC-Zellen.** Strukturen A-N sind in Abbildung 40 dargestellt

Chinon	Struktur	GSSG-Bildung in MÄ [25 $\mu\text{M}$ ]	GSH-Konjugat [%] -abgeschätzt-	Substituent	
				R1	R2, R3, R4
BQ	A	-	68,6	-	-
Durochinon	B	-	12,0	-	-
1,2-NQ	C	0,900	45,5	-	-
1,4-NQ	D	0,165	56,2	-	-
PHEQ	M	4,136	12,8	-	-
ANTQ	N	0,091	0,0	-	-
MD	E	1,000	27,5	R <sub>1</sub> -CH <sub>3</sub> ; R <sub>2,3,4</sub> -H	
Plumbagin	F	1,387	23,1	R <sub>1</sub> -CH <sub>3</sub> ; R <sub>2,4</sub> -H; R <sub>3</sub> -OH	
Lawson	H	0,078	0,0	R <sub>1</sub> -OH; R <sub>2,3,4</sub> -H	
Juglone	G	0,421	33,8	R <sub>1,2,4</sub> -H; R <sub>3</sub> -OH	
Naphtharazin	I	0,376	40,1	R <sub>1,2</sub> -H; R <sub>3,4</sub> -OH	
Dichlon	J	0,086	55,9	R <sub>1,2</sub> -Cl; R <sub>3,4</sub> -H	
M-1,4-NQ	K	0,357	21,2	R <sub>1</sub> -O-CH <sub>3</sub> ; R <sub>2,3,4</sub> -H	
Lapachol	L	-	28,5	R <sub>1</sub> -OH; R <sub>2</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> ; R <sub>3,4</sub> -H	

Setzt man den Effekt der Positivkontrolle MD **E** als Bezugspunkt für eine vergleichende Betrachtung des Substituenteneinflusses der 1,4-NQ-Derivate auf die GSSG-Bildung, so wurde nur für Plumbagin **F** eine stärkere GSSG-Bildung ermittelt. **A**, **B** (Benzochinone) und **L** induzierten in den EPC-Zellen keine GSSG-Bildung.

Als sehr bemerkenswert ist der deutliche Unterschied zwischen 1,2-NQ **C** und 1,4-NQ **D** sowie der immense Effekt für PHEQ **M** hervorzuheben. Auf die verstärkte GSSG-Bildung für PHEQ wurde schon im Kapitel 6.4.4 näher eingegangen, so dass weitere Erläuterungen hier entfallen.

Die Stellung des chinoiden Körpers (*ortho*-1,2- oder *para*-1,4-) scheint einen ausgeprägten Einfluss auf die GSSG-Bildung zu haben. Der Unterschied zwischen den tautomeren NQ liegt bzgl. der Effektintensität um den Faktor 5 für 1,2-NQ **C** höher als für 1,4-NQ **D**. Das *ortho*-Chinon PHEQ zeigt die stärkste GSSG-Bildung aller untersuchten Chinone.

In Abbildung 41 sind die wichtigsten Substituenten-abhängigen Einflüsse auf die GSSG-Bildung in MÄ dargestellt.

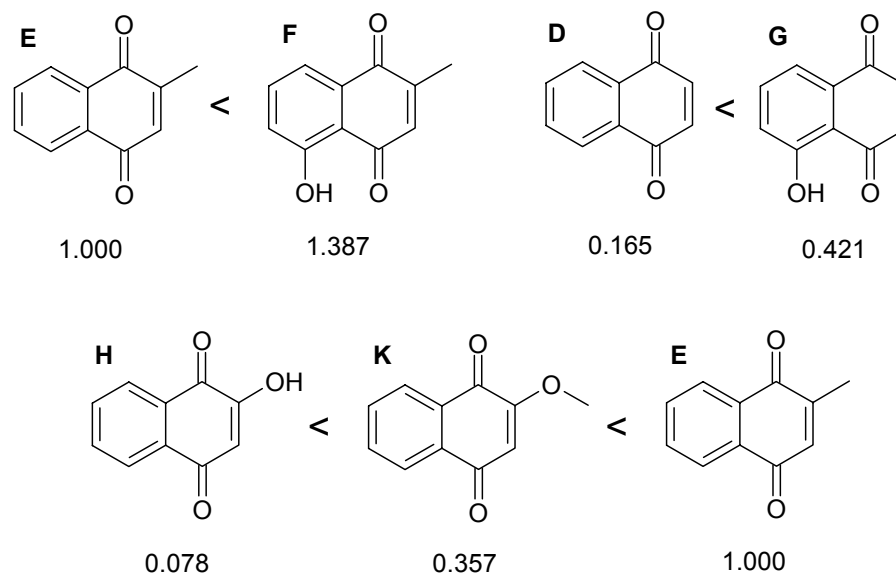


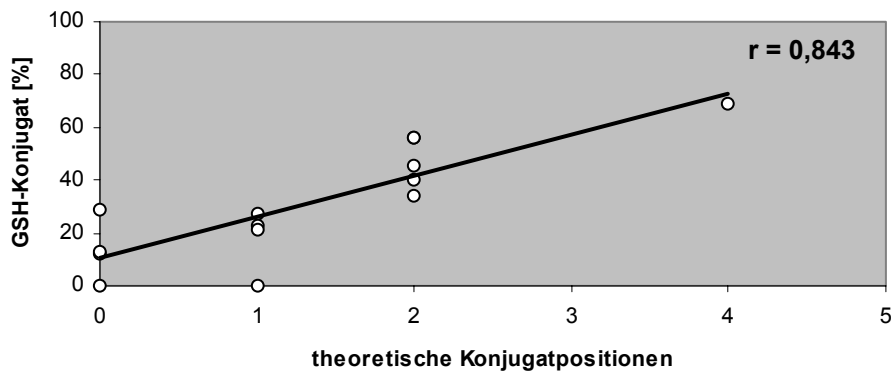
Abbildung 41: Einfluss der GSSG-Bildung [MÄ] in Abhängigkeit der 1,4-NQ-Substituenten

Ausgehend von den Ergebnissen waren folgende fünf Tendenzen, welche strukturabhängig die GSSG-Bildung in den EPC-Zellen beeinflussten, auffällig:

1. -CH<sub>3</sub> in R1 hat den größten GSSG-induzierenden Einfluss aller Substituenten (siehe Reihe **H**, **K**, **E** und **E**, **F**)
2. -OH in R1 inhibiert die GSSG-Bildung (siehe **H**, **L**); in R3 erhöht sie die GSSG-Bildung (siehe **F**, **G**)
3. *ortho*-Chinon dominiert vor *para*-Chinon (siehe **C**, **M**)
4. aromatisches System zur GSSG-Bildung notwendig (siehe **A**, **B**, **N**)



Die GSH-Konjugatbildung war direkt abhängig mit  $r = 0,843$  von der Anzahl theoretisch möglicher Konjugationsstellen am Chinongrundkörper, wie Abbildung 42 zeigt.



**Abbildung 42: Korrelation der GSH-Konjugation und der theoretischen Anzahl reaktiver Positionen am Chinongrundkörper**

#### **6.4.2 Nachweis von Chinon-Thioetherkonjugaten mittels HPLC-AP-ESI-MSD**

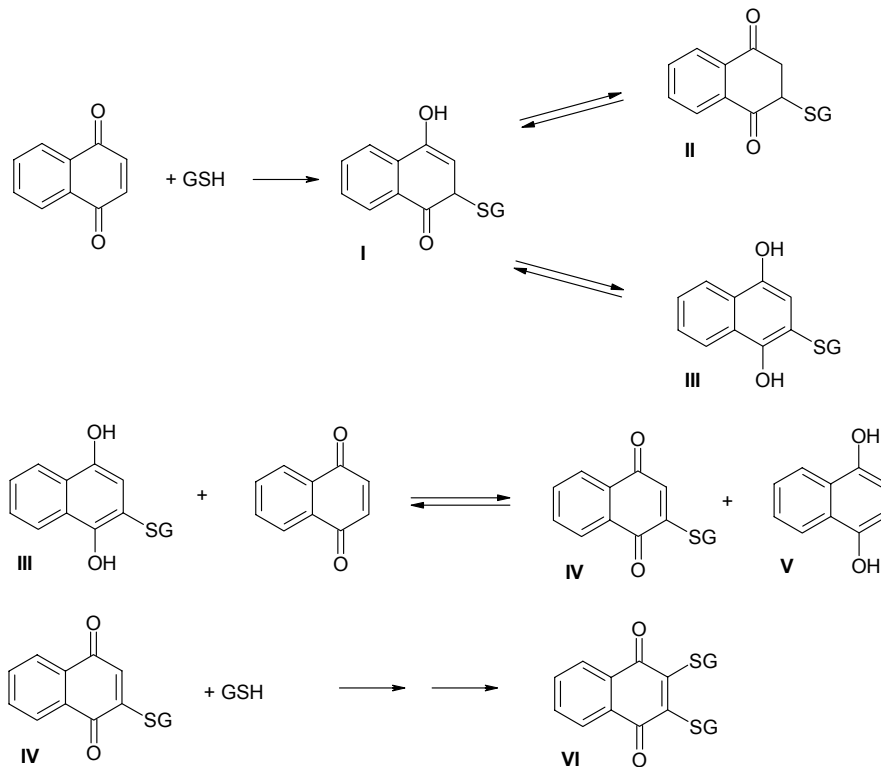
Der analytische Beweis der erfolgten Konjugation der Edukte GSH und Chinon und damit die Überprüfung der GSx-Nettobilanzierung, auf deren Grundlage die Auswertung der Ergebnisse zur Konjugatbildung basiert, war notwendig. Zu diesem Zweck wurden sowohl Versuche an Modellsystemen, die ausschließlich GSH und die einzelnen Chinone enthielten, als auch Zellinkubationen durchgeführt. Der qualitative Nachweis der entstandenen Thioetherkonjugate erfolgte mittels HPLC-AP-ESI-MSD. Die Überprüfung der Thioetherkonjugate erfolgte für BQ, Durochinon, 1,4-NQ, MD, Dichlon sowie PHEQ.

Für die Chinone Durochinon und PHEQ wurden keine Thioetherkonjugate nachgewiesen. Die über die GSx-Nettobilanz ermittelte GSH-Konjugation beider Chinone von 12,0 bzw. 12,8 % (siehe Tabelle 15 und Anhang 9.16, Tabelle A40) muss somit als Messungenauigkeit dieser indirekten Auswertung interpretiert werden.

Die Thioetherkonjugate von BQ, 1,4-NQ, MD und Dichlon waren sowohl im Modellsystem als auch im Inkubationsmedium der EPC-Zellen detektierbar. Der Nachweis entsprechender Konjugate im Zellpellet der EPC-Zellen war nicht zu führen.

Bei der Interpretation der Spektren waren direkt nach Beginn der Reaktion bei 1,4-NQ und MD zwei dicht aufeinander eluierende Peaks im Chromatogramm (Abbildung A6, Anhang) zu detektieren, deren Masse sich jeweils um zwei  $m/z$  unterschieden. Nach 24 h Reaktionszeit war jeweils nur noch der Peak mit der um zwei  $m/z$  geringeren Masse zu detektieren.

Für die Chinone BQ, 1,4-NQ und Dichlon wurde ebenfalls ein Dithioetherkonjugat nachgewiesen. Diese Beobachtungen sind mit dem in Abbildung 43 dargestellten Reaktionswegen zu erklären.



**Abbildung 43: Mechanismus der GSH-Konjugation von Chinonen am Beispiel von 1,4-NQ**

Hierbei kommt es im ersten Reaktionsschritt nach dem nukleophilen Angriff des GSH über den Mechanismus der 1,4-Michael-Addition zur Bildung des 3-Glutathionyl-1,4-Dihydroxynaphthalins (III). Das Gleichgewicht der tautomeren Grenzstrukturen I – III liegt dabei klar auf Seite der aromatischen Struktur III.

Im nächsten Schritt wird III durch nicht GSH-konjugiertes 1,4-NQ unter Bildung von 3-Glutathionyl-1,4-NQ (IV) und 1,4-Dihydroxynaphthalin (V) reduziert (WEBB, 1966). Durch einen wiederholten nukleophilen Angriff von GSH kommt es zur Bildung des 2,3-Diglutathionyl-1,4-NQ (VI), dessen Bildung mittels AP-ESI-MSD qualitativ nachgewiesen wurde.

Die Verbindung III wurde als das intermediär gebildete Konjugat mit der um 2 m/z höheren Masse angesehen, woraus dann IV nach 24 h Inkubationszeit hervorging.

Die exemplarischen Darstellungen der Inkubation von 1,4-NQ mit GSH (Verbindungen III und IV) zeigen Abbildungen A6 und A7 im Anhang 9.8.

## 7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Nachweis eines durch marine Sedimentextrakte verursachten oxidativen Stress in der permanenten Fischzelllinie EPC. Als Untersuchungsmaterial wurden neben den marinen Sedimentextrakten ISIS-1 bis ISIS-7 weitere, unterschiedlich belastete komplexe Proben (Sedimente aus Industriehafen und Elbe Hamburg) untersucht. Zum anderen wurden Einzelsubstanzen getestet, die über bekannte oxidativ wirkende Potentiale verfügen. Die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse gliedert sich in drei Teile. Zunächst wird die Eignung der EPC-Zellen als biologisches Untersuchungsmaterial zum Nachweis von oxidativem Stress diskutiert. Es folgt die Diskussion, inwiefern das Redoxsystem GSx geeignet ist, oxidativ wirksame Stressoren aus den marinen Sedimenten mittels BDF zu identifizieren. Den Abschluss bildet die Bewertung der Eignung des Redoxsystems GSx im Vergleich mit allen in der ISIS-Biotestbatterie enthaltenen Biotests.

### 7.1 Eignung der EPC-Zelllinie zum Nachweis von oxidativem Stress

#### 7.1.1 Antioxidative Enzymsysteme

Von den fünf untersuchten antioxidativen Enzymsystemen der EPC-Zelle antwortete ausschließlich KAT mit einer Aktivitätssteigerung auf die eingesetzten oxidativen Stressoren Wasserstoffperoxid und Menadion. Über das Enzym GPx sind keine Aussagen möglich, da der Grundgehalt der Zellen unterhalb der NG der Bestimmungsmethoden lag. Es wäre denkbar, dass im Verlauf der Kultivierung der permanenten EPC-Zelllinie die Aktivität an GPx heruntergefahren bzw. komplett verloren wurde. Die durchschnittlichen KW der einzelnen Enzyme zeigt Tabelle 16.

**Tabelle 16: Enzymaktivitäten der EPC-Zelllinie (KW).** Alle Angaben bezogen auf ein mg Protein

SOD	KAT	GPx	GR	GST	GSH	GSSG
3-5 U	2-4 U	n.d.	0,8-1,3 U	0,4-0,5 U	60-160 nmol	n.d.

Für die drei Enzyme SOD, GR und GST war über den gesamten Untersuchungszeitraum keine über das SN der Methoden hinausgehende Aktivitätssteigerung zu bestimmen. Um Aussagen über die möglichen Ursachen des unterschiedlichen Verhaltens der KAT auf einen induzierten oxidativen Stress zu erläutern, ist es notwendig, die regulatorischen Mechanismen, die zur Induktion der Enzyme führen, näher zu betrachten.

Generell gibt es zwei mögliche Wege, die Aktivität spezifischer Enzyme zu steigern: zum einen über die Wege der Genexpression (Transkription, Translation) und zum anderen über post-transkriptionelle Mechanismen.

Untersuchungen an *E. coli* haben gezeigt, dass die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress über das OxyR- und SoxR-Regulon gesteuert wird, über die eine Gruppe von Schutzenzymen angeschaltet werden (STORZ und IMLAY, 1999; HILDAGO und DEMPLE, 1994). Durch Wasserstoffperoxid wird das OxyR-Regulon spezifisch aktiviert, wobei STORZ et al. (1990) annahmen, dass dies über eine direkte Oxidation und einer damit verbundenen Konformationsänderung der Proteinstruktur erfolgt. Das OxyR-Regulon reguliert die Expression der KAT und sieben weiterer Gene, darunter auch für GR. Über den SoxR Transkriptionsfaktor wird u.a. SOD reguliert (STORZ und IMLAY, 1999).

Zwar wurde in eukaryotischen Zellen bis jetzt kein entsprechendes System nachgewiesen, jedoch gibt es deutliche Hinweise, dass bei der Regulation der zellulären Antwort auf oxidativen Stress spezifische Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen (MOUREL und BAROUKI, 1999). Hierzu zählen vor allem das sogenannte „antioxidant-responsive element“ (ARE) (HAYES und MCLELLAN, 1999; RUSHMORE et al., 1991) und die Transkriptionsfaktoren NFkappaB, AP-1 und SP-1 (CARGNONI et al., 2002; RAHMAN et al., 2002). ZHOU et al. (2001) zeigten in ihren Untersuchungen an Muskelzellen, dass NFkappaB und AP-1 aktiv die Regulierung von GPx und KAT bei der Antwort auf oxidativen Stress steuern, wobei die Rolle des NFkappaB der des AP-1 dominiert.

Im inaktivierten Zustand liegt NFkappaB an ein Inhibitorprotein IkappaB gebunden im Zytoplasma vor. Auf ein Aktivierungssignal hin wird IkappaB phosphoryliert und abgebaut. Das nun aktivierte NFkappaB wandert in den Zellkern, bindet dort an seine Erkennungssequenz und induziert dadurch die Transkription seiner Zielgene. NFkappaB wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert, jedoch bevorzugt von Peroxiden. Dies deutet darauf hin, dass NFkappaB eher mit dem OxyR-System übereinstimmt als mit dem SoxR-System und man davon ausgehen kann, dass auch in eukaryotischen Zellen diese beiden Signalwege unterschieden werden können (MEYER, 2000).

Die Regulation der GST wird über das ARE gesteuert, wobei das ARE vor allem durch Wasserstoffperoxid und phenolische Redoxcykler aktiviert wird (RUSHMORE et al., 1991). Die Regulation der Transkription der SOD wird u.a. von SP-1 gesteuert (SEO et al., 1996).

Die in der Literatur angegebenen unterschiedlichen Regulationsmechanismen der antioxidativen Enzyme SOD, KAT, GPx, GR und GST liefern ausreichend Hinweise, dass die Genexpression dieser in eukaryotischen Zellen sehr differenziert abläuft. Inwiefern diese Mechanismen ebenfalls für die EPC-Zellen Gültigkeit besitzen und weshalb die Enzyme SOD, GR und GST keine positive Stressantwort gaben, ist nicht näher aufzuklären.

Die Tatsache jedoch, dass nur für KAT eine Aktivitätssteigerung beobachtet wurde, läßt die Vermutung zu, dass sich die Regulation der KAT in den EPC-Zellen von der übrigen untersuchten Enzyme unterscheidet. Hierbei ist ein dem *NFkappaB* ähnlicher Mechanismus denkbar. *NFkappaB* reguliert die Enzyme KAT und GPx (ZHOU et al., 2001), wobei laut HADDAD (2002) die Veränderung der Redox-Homeostase in der Zelle für die Aktivierung von *NFkappaB* verantwortlich ist. CARGONI et al. (2002) zeigten bei ihren Untersuchungen eine signifikante Korrelation zwischen der Aktivierung von *NFkappaB* und der Akkumulation von GSSG und folgerten daraus, dass *NFkappaB* direkt über eine Verschiebung des Thiolstatus der Zelle aktiviert wird. In dieser Arbeit wurde nur für Wasserstoffperoxid und Menadion eine Dosis-abhängige KAT-Aktivitätssteigerung beobachtet. Beide Substanzen erhöhen den GSSG-Spiegel der Zelle signifikant, so dass auch für die EPC-Zellen ein direkter Zusammenhang zwischen der Veränderung des Redoxsystems GSx und einer KAT-Induktion (siehe auch 5.5.5 und 7.1.2) besteht.

Es ist seit langer Zeit bekannt, dass MD die Wasserstoffperoxid-Bildung in Lebermikrosomen von Ratten stimuliert (GILETTE et al., 1957; SATO et al., 1962). Die Ein-Elektronen-Reduktion des MD mittels des Redox-Cycling über das mikrosomale CYP450-System resultiert in einer vermehrten Bildung von SORA (IYANAGI und YAMAZAKI, 1970) (siehe Abbildung 4). Diese werden über SOD katalytisch abgebaut, bzw. zerfallen spontan zu Wasserstoffperoxid und Wasser. Die Dosis-abhängige Wasserstoffperoxid-Induktion der KAT in EPC-Zellen wurde bereits gezeigt. Es ist zu vermuten, dass die MD-Induktion der KAT über sekundär gebildetes Wasserstoffperoxid abläuft. Der relative Induktionsfaktor von 2,0 für 25 µM MD entsprach dem ermittelten Induktionsfaktor für 100 µM Wasserstoffperoxid. Dieses Ergebnis zeigt, dass im Verlauf der Inkubation pro Molekül MD vier Moleküle Wasserstoffperoxid generiert wurden, indem über Redox-Cycling des MD zuerst SORA und in der Folge Wasserstoffperoxid entsteht. Die bei höherer MD-Konzentration zu beobachtende fast vollständige KAT-Inhibierung hat ihre Ursache in der vermehrten SORA-Bildung. KONO und FRIDOVICH (1982) beschrieben *in-vitro* die Inhibierung von isolierter Rinderleber-KAT durch ein SORA-generierendes System aus Xanthin und Xanthinoxidase. Sie ermittelten eine 60-%ige Inhibierung nach einer Inkubationszeit von drei Stunden, wobei eine Wechselwirkung zwischen den SORA und dem Eisen-(III) im Hämanteil der KAT zum Eisen-(II), welches die inaktive Form der KAT darstellt, als Ursache der Inaktivierung postuliert wird. Dieser Wirkungsmechanismus erscheint ebenfalls für die KAT der EPC-Zellen Gültigkeit zu besitzen.

Die Menadion-abhängige KAT-Aktivitätssteigerung wurde jedoch im Verlauf der Untersuchungen nicht bestätigt, so dass diese Aussagen für die EPC-Zellen vorerst eingeschränkt gelten und nochmals zu überprüfen wären.

MEYER (2000) kam bei der Untersuchung zeitlicher Verläufe von Genexpression und Enzymaktivitäten für SOD, KAT und GPx in zwei primären Zelllinien zu der Folgerung, dass KAT die erste Stufe einer komplexen antioxidativen Abwehrstrategie zu sein scheint.

In diesem Zusammenhang könnte auch die Ursache für die in den EPC-Zellen zu beobachtende Steigerung der KAT-Aktivität liegen. Aufgrund der stark verlangsamten Stoffwechselaktivität der EPC-Zellen (siehe auch Paracetamol-Versuch unter Kapitel 5.2) erscheint es denkbar, dass die Genexpression und Proteinsynthese ebenfalls langsamer ablaufen, als in primären Zelllinien. Dies könnte dazu geführt haben, dass innerhalb der Inkubationszeit von 24 h nur die KAT-Genexpression angeschaltet wurde, was durch die Ergebnisse der Zeitreaktion zur KAT-Aktivität nach Inkubation mit 0,1 mM Wasserstoffperoxid belegt wird (Kapitel 5.4.2, Abbildung 16).

Der Vergleich mit den Ergebnissen von MEYER (2000), die für Jurkatzellen und humane Hautfibroblasten Induktionsfaktoren von 10 bzw. 12 ermittelte, zeigt deutlich, dass die EPC-Zellen bei weitem nicht so empfindlich auf Wasserstoffperoxid reagieren. Man muss hierbei jedoch in Betracht ziehen, dass es sich bei den von MEYER (2000) verwendeten Zellsystemen um primäre Zelllinien handelte. Insofern spiegelt das Ergebnis für die EPC-Zellen abermals die Situation für eine permanente Zelllinie mit der ihr eigenen verminderten metabolischen Aktivität wider.

Inwiefern eine verlängerte Inkubationszeit andere Ergebnisse in Hinsicht auf SOD, GR und GST geliefert hätten, wurde nicht überprüft. Dies lag darin begründet, dass nicht die Aufklärung der regulatorischen Mechanismen der antioxidativen Abwehrstrategie im Vordergrund der Untersuchungen stand, sondern die Eignung der EPC-Zellen zur Detektion von oxidativem Stress für biologische Kurzzeittests. Hierfür ist zu resümieren, dass von den untersuchten Enzymen nur über die KAT Aussagen zum induzierten oxidativen Stress, wenn auch eingeschränkt, möglich waren.

Eine weitere mögliche Erklärung für die KAT-Sonderstellung ist darin zu sehen, dass für die KAT-Induktion keine Genexpression sondern lediglich post-transkriptionelle Mechanismen verantwortlich waren. Es existieren demnach für die EPC-Zelle vermutlich „schnell“ anzuschaltende Mechanismen, die keine Proteinsynthese erforderlich machen. Eine Beteiligung von ROS bei der Stimulation von Protein-Phosphorylierungen, wodurch es zur In- bzw. Aktivierung von Enzymen kommt, beschreiben SUZUKI et al. (1997). Daneben könnte auch die Oxidation von Sulfhydrylgruppen und eine damit verbundene Konformationsänderung zu einer Aktivitätssteigerung führen. Ob diese Mechanismen auch bei der Aktivierung von antioxidativen Enzymen eine direkte Rolle spielen, ist jedoch nicht vollständig geklärt (MEYER, 2000).

Die Überprüfung der KAT-Induktion durch die Inkubation mit Sedimentrohextrakten und GPC-Fractionen der Proben ISIS-2 und ISIS-3 lieferte die Erkenntnis, dass für das Untersuchungsmaterial der marinen Sedimentextrakte keine Aussagen zum oxidativen Stress mit der verwendeten EPC-Zelllinie möglich waren. Für keine der untersuchten Proben wurde eine KAT-Aktivitätssteigerung beobachtet. Es ist denkbar, dass durch die hohe Stoffbelastung der unverdünnten Extrakte und Fraktionen der Zellapparat so schwerwiegend geschädigt wurde, dass die zur KAT-Induktion notwendigen Signal- und Reaktionskaskaden nicht mehr ungestört ablaufen konnten. Die beobachteten Abnahmen der KAT-Aktivität sind wahrscheinlich über die direkte Schädigung des Enzyms zu erklären.

Es wurden nur für die Rohextrakte und die noch elementaren Schwefel enthaltene GPC-NF von ISIS-3 deutliche KAT-Inhibitionen bis auf 30 % Restaktivität gemessen. Diese zeugen primär nicht von oxidativem Stress durch vermehrte ROS-Bildung, sondern resultieren vermutlich aus einer direkten Inaktivierung durch Bestandteile der eingesetzten Extrakte. Es steht außer Frage, dass eine drastische KAT-Inhibierung sekundär zu einem oxidativen Stress in der Zelle führen könnte, da dies einen geringeren Schutz der Zelle vor Schadstoffeinwirkung bedeutet. In Vereinbarung mit der Zielsetzung der Untersuchungen ist die Anwendung der KAT als biologischer Marker zur Detektion von oxidativem Stress jedoch nur als gering aussagekräftig zu interpretieren.

## **7.1.2 Redoxsystem GSx**

### **7.1.2.1 Empfindlichkeit der Methode**

Das Redoxsystem GSx erwies sich als ein sensibler Marker zur Detektion von oxidativem Stress, ausgelöst durch eine Vielzahl von ROS-bildenden Verbindungen. Für die Sensitivitätsprüfung erfolgte eine Bestätigung der von VANDEPUTTE et al. (1994) durchgeführten Studie. Bei ihren Untersuchungen an isolierten Rattenhepatozyten ermittelten sie die maximale GSSG-Bildung bei ca. 8 nmol/mg Protein für 50  $\mu$ M MD. Für die verwendeten EPC-Zellen lag dieser Wert bei 7,7 nmol/mg Protein für 25  $\mu$ M MD.

Anhand des Vergleiches beider Zellkulturen wird deutlich, dass die permanente EPC-Zelllinie eine gegenüber den primären Hepatozyten vergleichbare Empfindlichkeit in Bezug auf den oxidativen Stressor MD aufweist. Auch LIU et al. (1993) beschreiben vergleichbare GSSG-Gehalte für zwei primäre Zellkulturen aus Mäusehepatozyten.

Eine mögliche Wirkungsweise des MD liegt in der Bildung von SORA, welche die Vorstufe von Wasserstoffperoxid darstellt, das wiederum unter Oxidation von GSH zu GSSG durch GPx abgebaut wird. Die Ergebnisse der Modellinkubation (siehe Kapitel 6.4.3) zeigen, dass die direkte, enzymunabhängige Reaktion von MD mit GSH ein weiterer möglicher Reaktionsmechanismus ist, der zur Bildung von GSSG führt.

VANDEPUTTE et al. (1994) beschreiben einen dominierenden externen GSSG-Anteil gegenüber dem internen Anteil, vermutlich als Konsequenz eines aktiven Ausschleusungsprozesses zum Schutz der Zelle vor toxischen Effekten des GSSG (MEISTER und ANDERSON, 1983; SALNIKOW et al., 1994). Für die EPC-Zellen scheint bis zu einer MD-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  der aktive Ausschleusungsprozess vollständig das gebildete GSSG ins externe Medium zu transportieren. Durch eine vermehrte GSSG-Bildung, verursacht durch eine erhöhte MD-Konzentration, erreicht dieser Schutzmechanismus seine Grenze und GSSG akkumuliert verstärkt in der Zelle.

Eine mögliche Erklärung der internen GSSG-Akkumulation könnte eine Sättigung der aktiven Ausschleusung von GSSG aus der Zelle in der gegebenen Zeit sein. MEISTER und ANDERSON (1983) beschreiben eine ATP-Abhängigkeit dieser Ausschleusung. Denkbar wäre daher eine ungenügende ATP-Menge in der Zelle bzw. eine Veränderung des Energiehaushaltes der Zelle bei höheren Konzentrationen als mögliche Ursache (CROUCH et al., 1993). Eine weitere Erklärung liegt in der von ISHIKAWA et al. (1986) beschriebenen kompetitiven Hemmung der Ausschleusung von GSH-Konjugaten und GSSG. Sie beschreiben, dass sowohl GSSG als auch GSH-Konjugate über denselben Zellwandcarrier aktiv ausgeschleust werden und um diesen konkurrieren. Bei übermäßiger Konjugatbildung wäre so der aktive GSSG-Transportmechanismus ins externe Zellmedium gestört und es erfolgt eine interne GSSG-Akkumulation, wie sie hier bei der MD-Inkubation zu beobachten war.

Die Bestimmung der Parameter GSH und GSSG nach der Methode von VANDEPUTTE et al. (1994) erwies sich als sehr gut geeignet, Veränderungen im Redoxsystem GSx, verursacht durch chemische Stressoren, empfindlich in der EPC-Zelllinie nachzuweisen.

#### **7.1.2.2 Positivkontrolle**

Das oxidative Potential auf das Redoxsystem GSx der in 5.5.3 untersuchten Substanzen MD (VANDEPUTTE et al., 1994), Kupfer-(II)-chlorid (BURGESS et al., 2000) und Diamide (BIAGLOW et al., 2000) wurde bestätigt. Alle drei Verbindungen stellen somit eine geeignete Positivkontrolle für eine GSSG-Bildung dar, wobei die Wirkungsweisen der gewählten Positivkontrollen variieren. MD und Kupfer(II)-Ionen bilden durch Übertragung von einem Elektron auf Sauerstoff SORA, welches die Vorstufe des prooxidativ wirkenden Wasserstoffperoxids darstellt (VANDEPUTTE et al., 1994; FLOWERS-GEARY et al., 1993). Die Übertragung des Elektrons wird beim MD durch das relativ stabile  $\pi$ -Elektronensystem und bei Kupfer(II)-Ionen durch Reduktion zu Kupfer(I)-Ionen im Redoxcyclus ermöglicht (LIU et al., 1993; ZER et al., 1991). Diamid wirkt als direktes Thiol-Oxidans (BIAGLOW et al., 2000).



Bei allen Positivkontrollen war mit einer zunehmenden Konzentration eine steigende GSSG-Bildung, sowohl extern als auch intern, und eine Abnahme des GSH-Gehaltes zu beobachten. Es wird jedoch deutlich, dass der GSH-Gehalt der Zellen stärker abnimmt, als dass GSSG entsteht.

Eine mögliche Erklärung ist die in der Literatur beschriebene GST-katalysierte Konjugatbildung von MD und Diamid (BIAGLOW et al., 2000; WALLACE, 1989) bzw. Komplexbildung von Kupfer (FREEDMANN et al., 1989) mit GSH. Mit steigender Schadstoffkonzentration wird GSH durch Konjugat- bzw. Komplexbildung dem GSx-Pool entzogen und kann analytisch nicht mehr erfasst werden. Auch bei 200  $\mu\text{M}$  Kupfer(II)-chlorid und 200  $\mu\text{M}$  Diamid verhält es sich ähnlich. Die erfolgte Konjugatbildung wurde für MD mittels HPLC-APIES-MSD qualitativ nachgewiesen.

Ein Vergleich der drei Positivkontrollen machte deutlich, dass 25  $\mu\text{M}$  MD marginal die stärkste GSSG-Bildung aller drei Verbindungen auslöste. Ferner stellt MD laut Angaben in der Literatur eine ROS-generierende Verbindung dar und wurde dadurch einem direkten Thioloxidans wie Diamid vorgezogen. Von dem Einsatz von Kupfer(II)-chlorid als Positivkontrolle wurde abgesehen, da in den zu untersuchenden Sedimentextrakten keine Metallionen mehr vorliegen. Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde 25  $\mu\text{M}$  MD als Positivkontrolle für den GSSG-Test eingeführt.

Die Transformation der GSSG-Bildung in nmol/mg Protein durch die Bezugnahme des Effektes der Positivkontrolle in MÄ in Anlehnung an die Auswertung des DIN-Verfahrens 38415-T1 (Achetylcholinesterase-Hemmwirkung) verbesserte die Reproduzierbarkeit der GSSG-Bestimmung deutlich. Diese Umformung war notwendig geworden, da durch die Inkubation der EPC-Zellen von vier aufeinander folgenden Zellgenerationen mit jeweils der identischen Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  MD die GSSG-Bildung um den Faktor 7 streute (2-14 nmol/mg Protein). Die alleinige Betrachtung der GSSG-Gehalte in nmol/mg Protein hätte zweifelsfrei eine große Unsicherheit in Bezug auf vergleichende Untersuchungen unterschiedlicher Proben zur Folge gehabt.

### 7.1.2.3 GSH-Konjugation

Bei der Inkubation der EPC-Zellen mit Paracetamol (siehe Kapitel 5.2) wurde für das Redoxsystem GSx ausschließlich eine GSH-Konjugation beobachtet. Der Mechanismus der GSH-Konjugation läuft über das Intermediat N-Acetyl-p-benzochinonimin, welches durch Oxidation der Ausgangssubstanz bei der zellulären Entgiftung entsteht und mit GSH nach dessen elektrophiler Addition das entsprechende Glutathionkonjugat bildet (TIMBRELL, 1991). Eine GSSG-Bildung, wie sie von ADAMSON und HARMAN (1993) durch Inkubation mit 1mM Paracetamol

für 25 h an kultivierten Mäusehepatocyten beschrieben wurde, war mit der EPC-Zelllinie nicht zu bestätigen.

Im Vergleich mit den Ergebnissen von TEE et al. (1987), WILSON et al. (1991) und VANDEPUTTE et al. (1994), die keine GSSG-Bildung, jedoch eine 50 %-ige Konjugation durch 5 mM Paracetamol für primäre Zellkulturen ermittelten, liegt die Konjugation für die EPC-Zellen weit unterhalb dieser Angaben. Selbst eine Inkubation mit 10 mM Paracetamol führte bei den EPC-Zellen maximal zu einer GSH-Konjugation von 21 %. Es scheint, als ob die notwendige Transformation des Paracetamols zum reaktiven Intermediat bei der permanente Zelllinie langsamer abläuft als bei primären Zellen, was durch eine verminderte metabolische Aktivität erklärbar ist. Trotz allem weist die EPC-Zelllinie noch eine ausreichende Stoffwechselaktivität auf, um die durch Schadstoffe induzierte GSH-Konjugation nachzuweisen.

#### **7.1.2.4 Einfluss einzelner Enzymsysteme auf die GSSG-Bildung**

Durch die Untersuchungen zum Einfluss ausgesuchter antioxidativer Enzyme auf die GSSG-Bildung der Positivkontrolle MD (siehe Kapitel 5.5.5) wurde ermittelt, dass in erster Linie die Inhibierung der Enzyme SOD und GR eine Verstärkung, die der KAT und GSH-Synthase eine Verringerung der GSSG-Bildung bewirkten.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass vor allem durch eine Inhibierung von SOD und GR der durch MD induzierte oxidative Stress verstärkt wird. Dies erscheint durchaus plausibel, da durch die Hemmung der SOD durch MD entstandene SORA in der Zelle akkumulieren. SORA werden dann entweder mittels SOD und KAT gerichtet umgesetzt oder sie zerfallen, vermutlich bei erhöhter Konzentration bevorzugt, spontan und ungerichtet zu Wasserstoffperoxid. Dessen Entgiftung geht abschließend primär über im Zytosol vorliegendes GPx - und nicht über in den Peroxisomen lokalisiertes KAT wie bei der gerichteten Entgiftung - mit der Bildung der Messgröße GSSG einher. Erfolgt ferner eine Hemmung der GR wie hier mit BCNU, wird die Rückreduktion des gebildeten GSSG unterbunden und die Messgröße GSSG akkumuliert.

Theoretisch wäre durch eine KAT-Hemmung ebenfalls eine Effektverstärkung zu erwarten, da infolgedessen ein Weg der Wasserstoffperoxid-Entgiftung ausgeschaltet wird. Somit wäre nur noch der GPx-gesteuerte Abbau funktionsfähig, was eine verstärkte GSSG-Bildung zur Folge hätte. Statt dessen wurde eine geringere GSSG-Bildung beobachtet. Eine mögliche Erklärung liegt hier eventuell in der unterschiedlichen Lokalisierung der Enzyme KAT und GPx in den Organellen der EPC-Zelle. Die erhaltenen Ergebnisse weisen vermutlich darauf hin, dass der GPx-gesteuerte Abbau des Wasserstoffperoxids den KAT-Abbauweg überwiegt. Somit

bliebe die KAT-Inhibierung durch AMT ohne verstärkende Folgen auf die GSSG-Bildung. Die Ursachen für die beobachtete geringere GSSG-Bildung durch die Inkubation der Zellen mit AMT sind anhand der erhaltenen Daten nicht näher zu erörtern.

Durch BSO wurden sowohl KAT als auch die GSH-Synthase signifikant gehemmt. Daraus resultiert der stärkste „protektive“ Einfluss in Verbindung mit MD auf die EPC-Zellen. Es wurden noch ca. 30% des GSSG-Gehaltes nachgewiesen. Diese Tatsache ist über die Verringerung des GSH-Pools der Zelle durch BSO zu erklären, da im Vergleich zum KW deutlich weniger GSH zur Wasserstoffperoxid-Entgiftung zur Verfügung stand und somit weniger GSSG gebildet wurde.

Als Resümee dieser Untersuchung ist festzuhalten, dass eine Effektverstärkung von MD auf die GSSG-Bildung durch die Inhibierung der Enzyme SOD und GR zu erwarten war. Ferner war durch eine GSH-Depletion und durch die Hemmung der KAT-Aktivität eine Effektmaskierung möglich. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren GSSG-Gehalte dürfen jedoch nicht als Schutzmechanismus der EPC-Zelle durch die Behandlung mit den spezifischen Enzyminhibitoren interpretiert werden. Sie stellen vielmehr falsch negative Effekte dar, denn die erfolgte Inhibierung der Schutzenzyme kann nicht mit einem Schutz der Zelle vor oxidativer Schädigung einhergehen. Erst durch die Bestimmung weiterer sensitiver biologischer Marker wie beispielsweise SOD, KAT und MDA könnte die Aussagekraft zum real in der Zelle existierenden oxidativen Schädigungspotential konkretisiert werden. Da jedoch nur auf das Redoxsystem GSx als valider und sensitiver Messparameter zurückgegriffen werden konnte (siehe Kapitel 5.2 und 6.2), war eine detailliertere Aussage nicht möglich.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen sehr anschaulich, wie sensitiv und hochkomplex das Zusammenspiel der antioxidativen Kräfte in der lebenden Zelle ist. Schon geringe Änderungen in der Aktivität einzelner Enzyme oder auch Veränderungen im GSx-Spiegel haben große Auswirkungen auf einen betrachteten biologischen Marker. Zum anderen machen sie aber auch deutlich, dass die EPC-Zellen kein optimal geeignetes biologisches Material für entsprechende Untersuchungen darstellt.

Abschließend muß deutlich darauf hingewiesen werden, dass hier nur ein kleiner Ausschnitt des Gesamtsystems der EPC-Zelle und nur die Auswirkungen durch Inkubation mit MD betrachtet wurde. Der Einfluss einer Vielzahl weiterer Faktoren bleibt unberücksichtigt.

### 7.1.3 Untersuchung von Naphthochinonderivaten

Der „Redox-Cycler“ MD ist in der Literatur seit fast zwei Jahrzehnten als Leitsubstanz zur Induktion von oxidativem Stress in zellulären Systemen beschrieben (BESTWICK und MILNE, 2001; LEE et al., 2001; CHIOU und TZENG, 2000; CHIOU et al., 1999; KOSSENJANS et al., 1996; HASSPIELER und DiGIULIO, 1992; GABAI et al., 1990; DiMonte et al., 1984). Hierbei handelt es sich vornehmlich um medizinische Studien. Studien über MD, die sich auf Wechselwirkungen von Umweltproben mit biologischen Testsystemen beschäftigen, sind nicht publiziert.

Stattdessen existieren Studien zum induzierten oxidativen Stress 1,4-NQ, da für diese Verbindung eine Umweltrelevanz abzuleiten ist. LEMAIRE und LIVINGSTON (1997) zeigten in ihren Untersuchungen an Lebermikrosomen der Flunder (*Platichthys flesus*) einen von der 1,4-NQ-Konzentration abhängigen vermehrten molekularen Sauerstoffverbrauch. Die Autoren gehen davon aus, dass 1,4-NQ in einem Ein-Elektronen-Schritt zum Semichinonanionradikal reduziert wird und anschließend durch Elektronenübertragung auf Sauerstoff unter Bildung von SORA regeneriert wird. In Übereinstimmung zu deren Ergebnissen zeigten SJÖLIN und LIVINGSTON (1997) auch in Mikrosomen der Verdauungsdrüsen der Muschel *Mytilus edulis* L. ein NADPH-abhängiges Redox-Cycling von 1,4-NQ und eine ROS-Bildung.

Der jährliche nationale Eintrag von 1,4-NQ in die Umwelt durch Verbrennungsprozesse in stationären Anlagen sowie der photochemischen Umwandlung von Naphthalin dürfte in der Größenordnung von 100 t pro Jahr liegen. Die Emissionen aus dem Kfz-Verkehr sind nicht näher quantifizierbar (BUA, 1999).

Untersuchungen zum Vorkommen in der Umwelt sind nur begrenzt vorhanden. ALLEN et al. (1997) identifizierten 1,4-NQ im Aerosol nahe einem Verkehrsknotenpunkt in Boston, USA, neben 18 weiteren oxidierten PAK. LEWIS et al. (1995) wiesen 1,4-NQ neben anderen Chinonen und oxidierten PAK partikelgebunden in der Luft des Stadtgebietes von Leeds, England, nach. MEYER (2000) wies 1,4-NQ in mehreren mit Schweröl kontaminierten Altlasten nach.

1,4-NQ wurde national in die Wassergefährdungsstufe 2 (wassergefährdend) eingestuft. Für eine ökologische und toxikologische Empfehlung läßt die geringe Datenlage keine abschließende Bewertung zu. In Anbetracht der vergleichsweise geringen Umweltexposition stehen entsprechende Untersuchungen nicht im Vordergrund des Interesses (BUA, 1999).

Trotz allem ist 1,4-NQ in einer Liste der US-EPA enthalten, in der mehr als 200 Stoffe aufgeführt sind, auf die das Grundwasser in den USA in der Nähe von Sondermülldeponien zu überwachen ist. 1,4-NQ wurde nur in 0,1 % aller untersuchten Proben nachgewiesen (GARMAN et al., 1987) und gilt als ein „nicht

häufig nachgewiesenes Organikum“. Dies liegt eventuell in dessen raschem biologischen Abbau begründet.

Die Ergebnisse der zehn untersuchten NQ-Derivate und vier weiterer Chinone ergab eine sehr differenzierte Antwort im GSSG-Test (siehe 6.4).

Betrachtet man die zehn NQ-Derivate, so ist ein starker Substituenteneinfluss auf die GSSG-Bildung zu erkennen. Obwohl alle NQ die gleiche funktionelle Gruppe aufweisen, ist ihr physikalisch-chemisches Verhalten sowie der Toxizitätsmechanismus von den vorliegenden Substituenten abhängig (ÖLLINGER und KAGEDAL, 2001). Die Substituenten haben einen entscheidenden Einfluss, welcher Art die Toxizität des Chinons in der Zelle ist: entweder die Bildung von Addukten, vor allem mit Thiolen wie GSH, oder das Redox-Cycling (ÖLLINGER und BRUNMARK, 1991). Der erste Prozess ist verantwortlich für die toxische Wirkung von BQ und seinen Derivaten, wobei keine Bildung von GSSG zu beobachten ist (ROSSI et al., 1986). Die Untersuchungen von ROSSI et al. (1986) wurden in dieser Arbeit bestätigt.

Der zweite Prozess ist laut KNÜPPEL (1995) stark abhängig vom Redoxpotential der Chinone. Sie untersuchte den prooxidativen Einfluss verschiedener Anthrachinonderivate auf das Redoxsystem primärer Hepatocyten. Je positiver das Redoxpotential der Anthrochinone, desto größer war die zu messende GSSG-Bildung. ÖLLINGER und BRUNMARK (1991) zeigten in ihren Untersuchungen mit 1,4-NQ, Lawson, Juglon und Naphtharazin, dass die Stellung und Anzahl der Hydroxylgruppen im 1,4-NQ-Körper deutliche Auswirkungen für die GSSG-Bildung hatte. Sie inkubierten primäre Hepatozyten mit 3,5  $\mu\text{M}$  der Chinone für 10 Minuten und beobachteten die stärkste GSSG-Bildung für Naphtharazin, gefolgt von Juglon, 1,4-NQ und Lawson (ohne genaue Angabe der GSSG-Gehalte). Die durch die Inkubation der EPC-Zellen erhaltenen GSSG-Bildungen bestätigen diese Ergebnisse weitestgehend, wobei die Reihenfolge der GSSG-Bildung Juglon, Naphtharazin, 1,4-NQ und Lawson war (siehe Abbildung 40 und Tabelle 15, Kapitel 6.4.1). Somit ist die EPC-Zelllinie in der Lage, die mit primären Zellen erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen und sie ist als biologisches System für entsprechende Untersuchungen von NQ-Derivaten geeignet.

Vergleicht man die hier erhaltenen Ergebnisse der GSH-Konjugation und der GSSG-Bildung mit dem Substituentenmuster der Chinone, so haben vor allem die Methylgruppe an R1 und die Hydroxylgruppe an R3 einen verstärkenden Effekt auf die GSSG-Bildung, wohingegen die Hydroxylgruppe in R1 einen inhibierenden Effekt aufweist.

Durch die Hydroxylgruppe an R1 bei Lawson wird die Elektronendichte der Doppelbindung C2=C3 erhöht, wodurch zum einen das Redoxpotential um fast

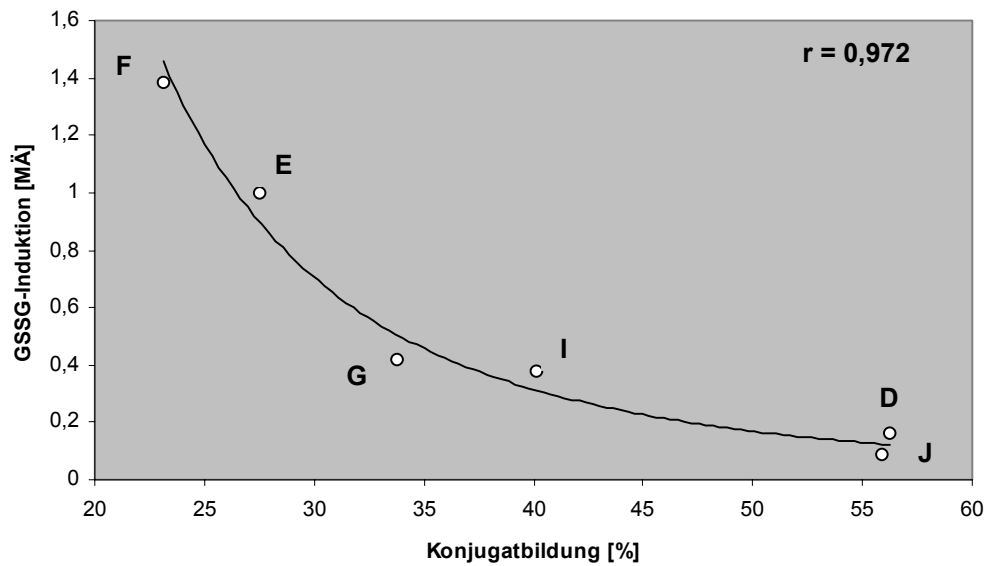
300 mV stark abfällt und zum anderen der nukleophile Angriff des GSH erschwert wird. Die Erhöhung der Elektronendichte kann über die Stabilisierung der chinoiden Struktur durch Tautomerisierung (*ortho*-1,2-Chinon neben *para*-1,4-Chinon) erklärt werden. Dies führt dazu, wie die Untersuchungen mit den EPC-Zellen zeigten, dass im Vergleich zum 1,4-NQ keine Konjugatbildung und eine geringere GSSG-Bildung stattfand.

Die Einführung einer Methylgruppe in R1 führte bei BUFFINGTON et al. (1989) zu einer Erniedrigung des Redoxpotentials von 45 mV gegenüber 1,4-NQ bzw. um 60 mV gegenüber Juglon. Die Einführung einer Hydroxylgruppe in R3 zeigte dagegen eine Erhöhung des Redoxpotentials um ca. 30 mV. Demzufolge wäre durch Inkubation mit den methylierten 1,4-NQ eine geringere GSSG-Bildung zu erwarten, für die hydroxylierten 1,4-NQ dagegen eine erhöhte GSSG-Bildung.

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass durch den Substituenteneinfluss der Hydroxylgruppe an R3 die GSSG-Bildung zunahm, die Methylgruppe jedoch entgegen dem theoretischen Modell die GSSG-Bildung ebenfalls verstärkte.

Durch die Einführung der Methylgruppe an R1 wurde die Möglichkeit der Konjugatbildung des Chinons erschwert, da zum einen die Elektronendichte an C2=C3 erhöht wurde (positiver induktiver Effekt der Methylgruppe) und zum anderen eine GSH-Angriffsstelle blockiert wurde.

In Abbildung 42 wurde gezeigt, dass die theoretische Anzahl der GSH-Bindungsstellen mit der beobachteten GSH-Konjugatbildung korreliert. Dadurch wird der interne GSH-Spiegel nicht so drastisch heruntergefahren wie bei 1,4-NQ, was zu einer verstärkten Beteiligung des verbliebenen GSH an der Autoxidation der Chinone führte und in einer erhöhten GSSG-Bildung resultierte.



**Abbildung 44: Korrelation zwischen GSSG-Bildung und GSH-Konjugation**

Aus Abbildung 44 ist zu erkennen, dass die GSH-Konjugation die GSSG-Bildung hemmte. Die Auswertung der Datensätze für 1,4-NQ **D**, MD **E**, Plumbagin **F**, Juglon **G**, Naphtharazin **I** und Dichlon **J** zeigt in Abbildung 44 eine klare Korrelation mit  $r = 0,972$  zwischen der GSSG-Bildung in MÄ und der GSH-Konjugation. Diese sechs Chinone wiesen alle einen 1,4-NQ-Grundkörper auf, sie induzierten die GSSG-Bildung und waren allesamt in der Lage, GSH zu konjugieren.

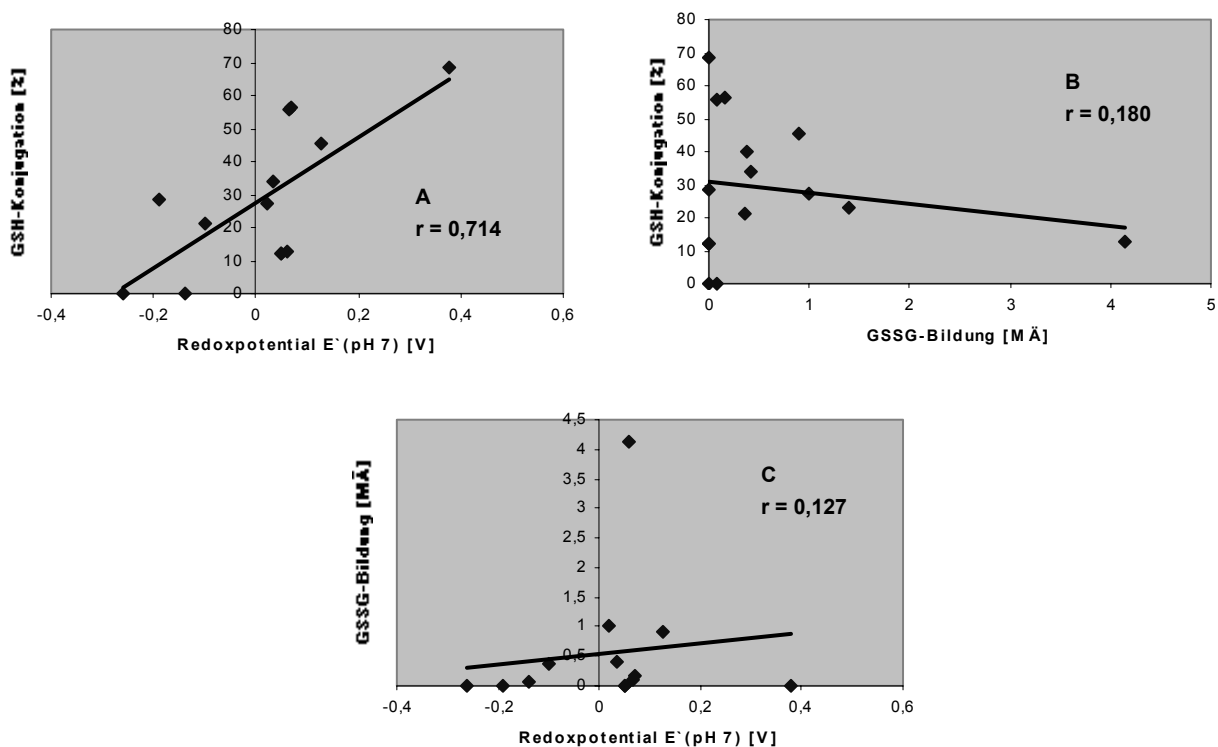
Erweitert man den Datensatz um alle untersuchten Chinone, so verschlechterte sich der Zusammenhang beider Parameter. Dies macht deutlich, dass er keine unbegrenzte Gültigkeit besitzt und beim Auftreten unterschiedlicher Einflussfaktoren zunehmend unpräziser wird. Dennoch werden die Ergebnisse des knockout-Versuches insofern wiedergespiegelt, dass eine verstärkte Konjugatbindung von GSH – hier an die Chinone - den Zellpool an GSH so stark herabsetzt, dass die GSSG-Bildung gestört wird (siehe 5.5.5).

Der in der Literatur (KNÜPPEL, 1995; ÖLLINGER und BRUNMARK, 1991; BUFFINGTON et al., 1989) beschriebene starke Zusammenhang zwischen dem Redoxpotential des Chinons und dem prooxidativen Einfluss auf die Zelle wurde mit den Ergebnissen des GSSG-Testes nicht bestätigt.

In Abbildung 45 sind die Korrelationen der Parameter GSH-Konjugation/Redoxpotential (A) GSH-Konjugation/GSSG-Bildung (B) GSSG-Bildung/Redoxpotential (C), dargestellt (Angaben der Redoxpotentiale nach WEBB (1966)). Daraus wird ersichtlich, dass nur zwischen der GSH-Konjugation und dem Redoxpotential der Chinone ein direkter Zusammenhang ( $r=0,714$ ) zu bestehen scheint. Trotz allem ist eine Tendenz der erhöhten GSSG-Bildung bei positiven

Redoxpotentialen zu erkennen. Die Reduzierung der GSSG-Bildung auf nur einen Parameter ist jedoch nicht möglich, da in diesem Zusammenhang auch die GSH-Konjugation der Chinone einen entscheidenden Einfluss auf die GSSG-Bildung aufweist.

Diese Ergebnisse sprechen für die These, dass nicht die Konjugatbildung, die Reduktion oder die ROS-Bildung einzeln für die toxischen Effekte der Chinone verantwortlich sind, sondern dass das Resultat der toxischen Wirkung dieser Verbindungsklasse stets ein Gemisch dieser möglichen Wirkungen ist. Allein mit Hilfe von physikalisch-chemischen Parametern ist eine Abschätzung der Wirkung oftmals sehr genau möglich, die Untersuchungen an den EPC-Zellen zeigte jedoch, dass die komplexen, in der lebenden Zelle vorherrschenden Reaktionen nicht immer korrekt im Modell vorhersehbar sind.



**Abbildung 45: Korrelationen der Parameter GSH-Konjugation [%], GSSG-Bildung [MÄ] und Redoxpotential  $E'$  [V] der untersuchten Chinone**

Aus den Ergebnissen ist abermals zu folgern, dass durch den Einsatz der EPC-Zellen als biologisches Testsystem der Nachweis von oxidativem Stress nur eingeschränkt möglich ist. Nur das Redoxsystem GSx stellt einen sensitiven und spezifischen Messparameter dar, wobei in erster Linie chinoide Strukturen schon im unteren  $\mu\text{M}$ -Bereich eine starke GSSG-Bildung verursachen. Weitere in der Literatur (siehe Tabelle 7 und 8) oft beschriebene oxidative Stressoren, wie Nitroaromaten und Bipyridile (Redox-Cycler), zeigten erst einen oxidativen Einfluss im mM-Bereich



auf die EPC-Zellen (Daten hier nicht gezeigt). Das bedeutet, dass vermutlich nicht das Redox-Cycling und die damit verbundene ROS-Bildung für die GSSG-Bildung primär verantwortlich ist, sondern für die hier erhaltenen Ergebnisse hauptsächlich eine direkte GSH-Oxidation, wie sie für die Verbindungen MD, PHEQ, S<sub>8</sub> und Wasserstoffperoxid im Modellsystem gezeigt wurden, verantwortlich sind. Um den Einfluss der Toxizität von zunächst metabolisch zu aktivierenden Verbindungen über CYP450 zu messen, ist die permanente EPC-Zelllinie aufgrund dessen ihrer metabolischen Aktivität kaum geeignet.

## **7.2 Nachweis von oxidativen Stressoren in marinen Sedimentextrakten mittels BDF**

### **7.2.1 Rohextrakte**

Die erhaltenen Ergebnisse belegen, dass das Redoxsystem GSx ein einfach und schnell durchzuführendes Testsystem darstellt, welches ausreichend empfindlich ist, die unterschiedlichen Belastungsniveaus der untersuchten Proben zu detektieren. Es war mit diesem Testsystem möglich, hochbelastete Proben des Hamburger Industriehafens, mittel stark belastete Proben der Elbe und schwach belastete aus Nord- und Ostsee eindeutig zu klassifizieren. So lag der Effekt für den Veringkanal im Durchschnitt um den Faktor 140 höher als für die marinen Sedimentextrakte. Für den Seehafen-4 lag der Faktor bei 40 und für die Elbsedimente noch beim Faktor 4.

Der immense Effekt des Veringkanals ist eventuell mit der hohen Belastung an PAK zu erklären. Nach GÖTZ (2001) liegt der Gehalt an EPA-PAK bei ca. 20 g/kg Sediment. PAH-Gehalte in dieser Größenordnung werden weder in nationalen Sedimentproben (Hamburger Hafen) noch international erreicht. HO et al. (2002) führen die PAK-Konzentration von sechs Sedimenten auf, die im industriellen Einflußbereich (Hafengebiet, Industriegebiet), u.a. im New Yorker und Baltimorer Hafen, liegen. Für das Sediment in Nähe einer Erdölraffinerie ermittelten sie PAK-Gehalte von 1,5 g/kg Sediment. Die übrigen fünf Sedimente lagen im Bereich von 2-100 mg/kg Sediment.

Nach Auskunft des Amtes für Strom und Hafengebäude der Hansestadt Hamburg handelt es sich beim Veringkanal um einen der am höchsten belasteten Standorte im Hafengebiet. Im Vergleich hierzu liegt der EPA-PAK-Gehalt für die am höchsten belastete Probe der marinen Sedimente (ISIS-3) aus der Kieler Förde bei 10 mg/kg (ISIS, 2001) noch über den durchschnittlichen Gehalten für die Elbeproben Seemannshöft und Blankenese mit 4 mg/kg Sediment (ARGE-ELBE, 2000). Die übrigen ISIS-Proben lagen im Bereich von 0,1 bis 1 mg/kg Sediment.

Die Überprüfung der prooxidativen Wirkung der PAK auf das Redoxsystem GSx erschien von besonderem Interesse. Hierbei wurde für die getesteten PAK

Naphthalin, Phenanthren, Pyren, Fluoranthen und Benz[e]pyren keine GSSG-Bildung nachgewiesen (Daten hier nicht gezeigt). Die Aussagen von WINSTON und DI GIULIO (1991), die einen durch PAK ausgelösten oxidativen Stress für aquatische Lebewesen beschreiben, wurde nicht bestätigt. Statt dessen wurde nur für oxidierte PAK, und hier ausschließlich für die Chinone des Naphthalins und des Phenanthrens, eine deutliche Verschiebung des GSx-Spiegels auf die oxidierte Seite beobachtet. Der Grund dieser PAK-Insensitivität ist darin zu sehen, dass erst durch die metabolische Aktivierung der PAK mittels CYP450 zum Chinon die biologische Wirkung eintritt, die EPC-Zellen jedoch kaum CYP450-Aktivität aufweisen.

### 7.2.2 Plausibilitätsprüfung der Effekte von PHEQ und S<sub>8</sub>

Die Untersuchung der BDF-Proben zeigte deutlich die praktischen Grenzen der BDF im marinen Bereich auf. Sind die Effekte auf Basis der Rohextrakte noch sehr gut zu detektieren, so nehmen diese im Verlauf der Fraktionierung merklich ab. Es war dennoch möglich, ca. 20 % des Effektes der Rohextrakte in der HPLC-F4 für ISIS-2 und ISIS-6 zu verfolgen. Dies reichte jedoch nicht aus, um die verursachenden Einzelsubstanzen zu identifizieren. Die in der HPLC-F4 noch ausgeprägten Effekte für ISIS-2 und ISIS-6 konnten nicht auf die verursachenden Substanzen reduziert werden, da sie sich in der darauf folgenden, relevanten Stufe IV komplett aufgelöst haben. Eine Überprüfung von 13 Einzelsubstanzen, die Inhaltsstoffe der HPLC-F4 waren, führten bis auf PHEQ zu keiner GSSG-Bildung.

Die Plausibilitätsprüfung der Stoffe PHEQ und S<sub>8</sub> konnte nur grob abgeschätzt erfolgen, da beide Substanzen nicht in den ISIS-Proben quantifiziert wurden. Zur Abschätzung wurden für PHEQ die Daten der Benchmark-Konzentrationen (0,2 MÄ), für die HPLC-F4 der Proben ISIS-2 und ISIS-6 und für S<sub>8</sub> die Daten der nicht entschwefelten GPC-NF ISIS-3 genutzt. Für die qualitativ abgeschätzten Konzentrationen der Analyte in den ISIS-Proben gelten folgende Einschränkungen:

**PHEQ:** Statt PHEQ wurde der Gehalt an Phenanthren (PHE), welches die Ausgangsverbindung von PHEQ ist, zur Abschätzung verwendet. Hierbei galt die Annahme, dass 1% des PHE-Gehaltes der Proben zu PHEQ, dem dominierenden PHE-Oxidationsprodukt, umgewandelt wurde und in der HPLC-F4 der ISIS-Proben enthalten war. Die PHE-Gehalte der ISIS-Proben lagen bei 5 µg/g TOC (ISIS-2) und 2 µg/g TOC (ISIS-6) (ISIS, 2000; 2001).

**S<sub>8</sub>:** Die GPC-NF ISIS-3 war eine an Schwefel gesättigte DMSO-Lösung, was makroskopisch an Schwefel-Kristallen zu erkennen war. Bei Lösungsversuchen

wurde festgestellt, dass eine gesättigte DMSO-Lösung in etwa 200 µg S<sub>8</sub>/mL enthielt. Dies entsprach einer Konzentration in der Testlösung von 2000 ng/mL. In Tabelle 17 sind die Daten gegenübergestellt.

**Tabelle 17: Vergleich abgeschätzter Konzentrationen von PHEQ und S<sub>8</sub> in ISIS-Proben mit den Benchmark-Konzentrationen der Reinsubstanzen PHEQ und S<sub>8</sub>.**

<sup>a</sup>Die PHEQ-Konzentrationen errechnen sich aus dem absoluten PHE-Gehalt/g TOC und der TOC-Menge der Benchmark-Konzentration. Die resultierende PHE-Konzentration stellt nach Division mit dem Faktor 100 die abgeschätzte PHEQ-Konzentration dar. <sup>b</sup>Divisor aus der Benchmark-Konzentration der Reinsubstanz und der abgeschätzten Konzentration in den Proben.

	Substanz	Benchmark-Konzentration Reinsubstanz [ng/mL]	Benchmark-Konzentration Probe [µg TOC/mL]	Konzentration Reinsubstanz <sup>a</sup> -abgeschätzt- [ng/mL]	Faktor <sup>b</sup>
ISIS-2	PHEQ	30	900 (HPLC-F4)	0,05	600
ISIS-6	PHEQ	30	740 (HPLC-F4)	0,015	2000
ISIS-3	S <sub>8</sub>	256	340 (GPC-NF)	2000	<b>0,12</b>

Anhand des dargestellten Vergleiches wird deutlich, dass der PHEQ-Effekt nicht durch den Effekt in den HPLC-F4 plausibel erklärt werden kann. Der hohe Faktor von 600 bzw. 2000 zeigt zudem, dass selbst ein Anteil des Effektes durch PHEQ nicht wahrscheinlich ist. Da alle im GSx-Test überprüften, relevanten Einzelsubstanzen der HPLC-F4 allein keinen Effekt induzierten, liegt die Vermutung nahe, dass erst durch deren additive bzw. synergistische Wirkung ein oxidativer Stress für die EPC-Zellen auftrat. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Stufe IV, in der durch die Fraktionierung des Substanzgemisches in zehn Unterfraktionen der Effekt der Stufe III aufgelöst wurde.

Der Effekt der GPC-NF ISIS-3 ließ sich dagegen mit dem Effekt der Reinsubstanz S<sub>8</sub> plausibel belegen. Da S<sub>8</sub> jedoch einen originären Sedimentbestandteil darstellt, ist die toxikologische Relevanz dieses Ergebnisses schwer einzustufen und sie wird in der Literatur gegensätzlich diskutiert (siehe folgendes Kapitel 7.2.3).

Als Fazit der durchgeführten Untersuchungen ist festzuhalten, dass die Identifizierung von toxisch relevanten Einzelsubstanzen mit dem Ansatz der BDF in marinen Sedimentextrakten nicht gelang. Es kann nur für die Substanzklasse der Chinone der Verdacht ausgesprochen werden, dass sie zum Teil für die beobachteten Effekte in der HPLC-F4 verantwortlich waren. In diesem Zusammenhang wurde ein möglicher Wirkungsmechanismus für die immense GSSG-Bildung von PHEQ in den EPC-Zellen über dessen mögliche Inhibierung von

GR und der von SMITH und EVANS (1984) beschriebenen SOD-Inhibierung aufgestellt (siehe 6.4.4).

PHEQ ist wie MD oder 1,4-NQ in der Lage über Redoxcyclen ROS zu generieren (KUMAGAI et al., 2002; HASSPIELER und DI GIULIO, 1994; JARABAK und HARVEY, 1993). Aus den Ergebnissen mit den „knock-out“ Zellen ist abzuleiten, dass durch die Inhibierung der Enzyme SOD und GR die durch Chinone (MD) verursachte GSSG-Bildung gesteigert wurde. Dazu passend beschrieben JARABAK und HARVEY (1993), dass der Zusatz von SOD den durch PHEQ verursachten oxidativen Stress inhibiert. Die im Vergleich zu MD verstärkte GSSG-Bildung von PHEQ erscheint aufgrund der von SMITH und EVANS (1984) beschriebenen SOD-Inhibierung und der hier erstmals beschriebenen GR-Inhibierung plausibel erklärbar.

### 7.2.3 Schwefelsensitivität des Redoxsystems GSx

Die Ergebnisse der BDF Stufe II NF ergaben für die nicht bzw. unvollständig entschwefelten Fraktionen NF ISIS-3 und ISIS-6 eine starke GSSG-Bildung. Der Wirkmechanismus des durch S<sub>8</sub> verursachten Effekts auf das Redoxsystem GSx ist bisher nicht näher bekannt. Dagegen ist die Datenlage zur toxischen Wirkung von S<sub>8</sub> auf die Lumineszenz von Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*) im sogenannten Leuchtbakterientest gut dokumentiert (SALIZZATO et al., 1998; SVENSSON et al., 1996; PARDOS et al., 1999; JACOBS et al., 1992; SVENSSON et al., 1998). Die dort angegebenen EC<sub>50</sub>-Werte liegen im Bereich von 10-30 µg S<sub>8</sub>/L.

Im Rahmen der ISIS-Biotestbatterie war der Leuchtbakterientest enthalten; der EC<sub>50</sub>-Wert liegt in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten bei 59 µg S<sub>8</sub>/L (REINEKE, 2002). Die Benchmark-Konzentration für S<sub>8</sub> im GSx-Test lag bei 260 µg/L. Ein direkter Vergleich der Benchmark-Konzentration mit den EC<sub>50</sub>-Werten des Leuchtbakterientests ist aufgrund der unterschiedlichen statistischen Auswertung jedoch nicht möglich. Die Aufnahme von EC<sub>50</sub> für den GSx-Testes war auszuschliessen, da die ermittelten Effekte nicht in einer hierfür nötigen prozentualen Skalierung von 0-100% anzugeben waren, da das Testsystem keine limitierende Obergrenze besitzt.

S<sub>8</sub> kommt ubiquitär als Makrobestandteil in marinen und Süßwassersedimenten vor (BROUWER und MURPHY, 1995; MORSE et al., 1987). FABRI et al. (2001) quantifizierten S<sub>8</sub> in zwei Küstensedimenten aus dem Einzugsbereich der Stadt Ravenna (Italien) an einem Tiefgradienten bis 45 cm Sedimenttiefe. Sie wiesen den Hauptanteil an S<sub>8</sub> in der oberen Sedimentschicht kleiner 10 cm nach, wobei Gehalte von ca. 0,5 mg/g Sediment bestimmt wurden. Ab einer Tiefe von ca. 30 cm war kein S<sub>8</sub> mehr nachweisbar. Sie folgern daraus, dass S<sub>8</sub> durch chemische und biologische

Oxidation von Sulfiden in der Sedimentoberfläche entsteht, während in der Tiefe die Pyritbildung für die  $S_8$ -Abnahme verantwortlich ist.

Der analytische Nachweis von  $S_8$  in der Sedimentoberfläche erklärt die Anwesenheit von  $S_8$  in organischen Lösungsmittel-extrakten von Sedimenten, welche in der Regel aus der oberen Sedimentschicht (0-5 cm) gewonnen werden. JAKOBS et al. (1992), SALIZZATO et al. (1998) sowie SVENSSON et al. (1996) führten in teilweise dem TIE-Konzept angelehnten Untersuchungen einen Großteil der Sedimenttoxizität auf  $S_8$  zurück. Die Ergebnisse von PARDOS et al. (1999) zeigen, dass die korrekte Abschätzung der Gesamtoxizität von Sedimentrohextrakten die quantitative Abtrennung von  $S_8$  zwingend erforderlich macht. Ansonsten würden toxische Effekte anthropogener Schadstoffe maskiert werden (JACOBS et al., 1992).

Im Rahmen der vorgestellten Untersuchungen erfolgte die  $S_8$ -Abtrennung in der Stufe II der BDF. Das Auftreten von  $S_8$  in den Fraktionen der Stufe III und IV ist somit auszuschließen.

Über die toxische Relevanz von  $S_8$  herrscht in der Literatur keine Übereinstimmung. JACOBS et al. (1992) gehen davon aus, dass von  $S_8$  kein schädigendes Potential für aquatische Organismen ausgeht, sofern sie sich optimal an ihren Lebensraum in der „reduzierenden, anoxischen Umwelt“ adaptiert haben. Die Autoren behaupten, dass  $S_8$  hauptsächlich im anoxischen Milieu entsteht. Diese These kann durch die Untersuchungsergebnisse der Probe ISIS-3 bestätigt werden, da dieses Sediment als einziges deutliche Hinweise auf eine anoxische Charakteristik aufwies. Zum einen war bei der Probennahme deutlich der Geruch von Schwefelwasserstoff wahrzunehmen, zum anderen ein optisch-qualitativer Nachweis von  $S_8$  in Form von auskristallisierten Schwefelkristallen in der DMSO-Lösung der Fraktion GPC-NF gegeben. Diese Befunde gehen mit einer beobachteten Toxizität im Leuchtbakterientest einher (ISIS, 2000; 2001), der äußerst sensitiv  $S_8$  anzeigt.

SVENSON et al. (1996) resümieren dagegen, dass  $S_8$  mit einer bewiesenen Fischtoxizität *in vitro* einhergeht und nicht ausschließlich einen spezifischen Effekt auf die Bakterienlumineszenz der Leuchtbakterien ausübt. Sie wiesen neben einer akuten Toxizität von  $S_8$  für *Vibrio fischeri* diese ebenfalls an Zebrafischlarven (8h, *Danio rerio*) mit einer  $EC_{50}$  von ca. 500  $\mu\text{g/L}$  und in Barschlarven (4d, *Perca fluviatilis*) mit ca. 75  $\mu\text{g/L}$  nach. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen PARDOS et al. (1999), die allerdings deutlich höhere  $EC_{50}$ -Werte für die grüne Mikroalge (96h, *Selenastrum capricornutum*) mit kleiner als 1  $\text{mg/L}$  und für den Test an Invertebraten (48h, *Daphnia magna*) mit ca. 800  $\mu\text{g/L}$  ermittelten. Diese Untersuchungen zeigen übereinstimmend, dass der toxische Effekt des  $S_8$  nicht auf *Vibrio fischeri* begrenzt ist.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass  $S_8$  einen prooxidativen Einfluss auf das Redoxsystem GSx ausübt. Inwiefern dieser Einfluss eine akute Toxizität aquatischer Organismen bewirkt, ist anhand der Daten nicht abzuschätzen. Es kann jedoch eine Verbindung zur Aussage von SVENSSON et al. (1998) gezogen werden, die behaupten, dass die akute Toxizität von  $S_8$  durch eine mögliche Beteiligung an Redoxreaktionen bedingt sein könnte. Sie machen keine näheren Angaben, ob sich diese Reaktionen auf die geogene Umwelt beschränken, oder ob sie auch für biologische Systeme gelten.

Der mögliche Mechanismus einer durch  $S_8$  ausgelösten GSSG-Bildung leitet sich aus der bereits SUZUKI und WERKMAN (1959) bekannten, nicht-enzymatischen und direkten Reduktion von Schwefel zu Schwefelwasserstoff durch GSH ab. 1965 war es ebenfalls SUZUKI, der den nukleophilen Angriff eines Glutathionanions auf  $S_8$  unter Ringöffnung des Achtrings beschrieb. Die relativ instabile lineare Polysulfid-GSH-Verbindung ( $GSS_nH$ ) zerfällt in der Folge in GSSG und zwei reduzierte Polysulfide ( $HS_{(n-x)}R$ ).

Einen vergleichbaren, jedoch über GST katalysierten nukleophilen Angriff von GSH auf Disulfide wurde 1990 von JAKOBY und ZIEGLER beschrieben. Ihre Ausführungen beziehen sich nicht direkt auf die Reaktion zwischen  $S_8$  und GSH, belegen aber ebenfalls die mögliche Wechselwirkung von GSH mit Schwefelverbindungen. Gleiches gilt für die der GSx-Bestimmung zugrunde liegende Reaktion zwischen GSH und dem Ellman's Reagenz DTNB, welches ebenfalls ein Disulfid darstellt und unter GSSG-Bildung direkt reduziert wird.

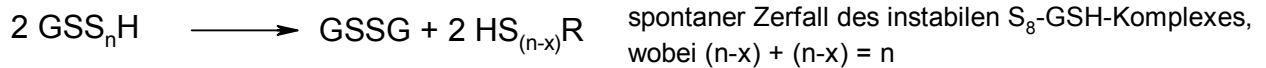
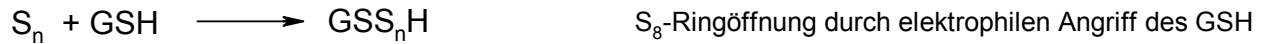
Durch die Ergebnisse aus dem Modellversuch (siehe 6.4.3) wurde der entscheidende Hinweis für den in Abbildung 46 postulierten Wirkungmechanismus des elementaren Schwefels erhalten:

Zum einen entstand bei der Inkubation von GSH und  $S_8$  Schwefelwasserstoff, welcher olfaktometrisch nachgewiesen wurde. Zum anderen wurde GSSG nicht stöchiometrisch durch  $S_8$  gebildet, da pro Mol  $S_8$  mehrere Mol GSSG gebildet wurden. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass auf der Basis der Ergebnisse von SUZUKI und WERKMAN (1959) sowie SUZUKI (1965)  $S_8$  bei ausreichendem GSH-Überschuss vollständig zu Schwefelwasserstoff reduziert wird, wobei ein Molekül  $S_8$  acht Moleküle GSSG durch die Reduktion von 16 Molekülen GSH bildet.

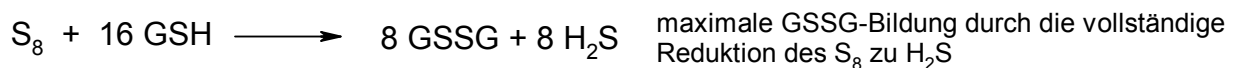
**bekannt:**



**möglicher Mechanismus einer spontanen, nicht-enzymatische S<sub>8</sub>-Reduktion:**



**postuliert:**



#### **Abbildung 46: Abgeleiteter Reaktionsmechanismus der GSSG-Bildung von S<sub>8</sub> in EPC-Zellen**

Der aus dem Modellsystem abgeleitete Wirkmechanismus ist nur eingeschränkt auf die Ergebnisse der GSSG-Bildung im zellulären System zu übertragen. So wurde bei der Zellinkubation mit 8,65 µM S<sub>8</sub> im Vergleich zum Modellversuch eine um den Faktor 8 geringere GSSG-Bildung [MÄ] gemessen. Hierbei könnten folgende Aspekte eine Ursache des stark gehemmten prooxidativen Einflusses auf das Redoxsystem GSx im Zellmodell sein:

1. Die Transformation der GSSG-Bildung in MÄ ist für die Diskrepanz verantwortlich, da die Wirkmechanismen von S<sub>8</sub> und MD in der Zellinkubation bzw. im Modellsystem unterschiedlicher Art sind.
2. Die vorherrschenden Reaktionsbedingungen im Zytosol der EPC-Zellen (pH, Salzgehalt) variieren ausreichend vom Modellsystem (PBS), so dass die zur GSSG-Bildung notwendige Entstehung des Glutathionanions unterdrückt wird.
3. Die Stabilität des vermutlich entstandenen S<sub>8</sub>-GSH-Adduktes (GSS<sub>n</sub>H) ist im Zytosol größer als im Modell, woraus eine geringere GSSG-Bildung resultiert.
4. S<sub>8</sub> kann nur begrenzt die Zellmembran passieren, wodurch die Reaktionswahrscheinlichkeit der Edukte GSH und S<sub>8</sub> zum Produkt GSSG stark herabgesetzt würde.
5. S<sub>8</sub> bzw. das S<sub>8</sub>-GSH-Addukt wird aktiv und effektiv aus der Zelle ausgeschleust.
6. Durch den Einfluss antioxidativer Schutzmechanismen wird die direkte GSH-Oxidation unterdrückt.
7. Der Großteil des gebildeten GSSG wird durch GR zu GSH reduziert.
8. Weitere, nicht näher zu evaluierende Schutzmechanismen der EPC-Zelle bewirken die Unterdrückung der als toxisch einzustufenden GSSG-Bildung.

Inwiefern diese möglichen Ursachen tatsächlich für die im Zellmodell unterdrückte GSSG-Bildung verantwortlich sind, ist aufgrund der Datenlage nicht für alle Punkte näher zu bestimmen.

Dass die Ursache der unterschiedlichen Effekte in der Transformation der Effekte in MÄ liegt, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da der Unterschied des Anteils an GSSG [%] am GSx ebenfalls den Faktor 8 aufweist. Ferner ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass der als lipophil einzustufende S<sub>8</sub> im Vergleich zu anderen lipophilen Substanzen wie Menadion oder PHEQ zu einem geringeren Anteil in das Zellinnere gelangen sollte.

Die aktive Ausschleusung von S<sub>8</sub>-GSH-Addukten ist nicht auszuschließen, kann allerdings anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bewiesen werden.

Aufgrund der erhaltenen Erkenntnisse über das Testsystem GSx spielt das Enzym GR eine entscheidende Rolle in der effektiv in der Zelle nachzuweisenden GSSG-Menge, da GR den GSx-Spiegel zu Gunsten GSH aufrechterhält. GR war, wie andere Enzyme auch, nicht im Modellsystem enthalten. Es ist somit plausibel erklärbar, warum der GSSG-Gehalt in der EPC-Zelle deutlich geringer als der Gehalt im Modell war. Abschließend ist zu sagen, dass vermutlich erst durch die Summe der gezeigten Faktoren die Ursache für die geringere GSSG-Bildung in den EPC-Zellen bedingt ist.

### 7.3 Eignung des Redoxsystems GSx als Biotest für die BDF

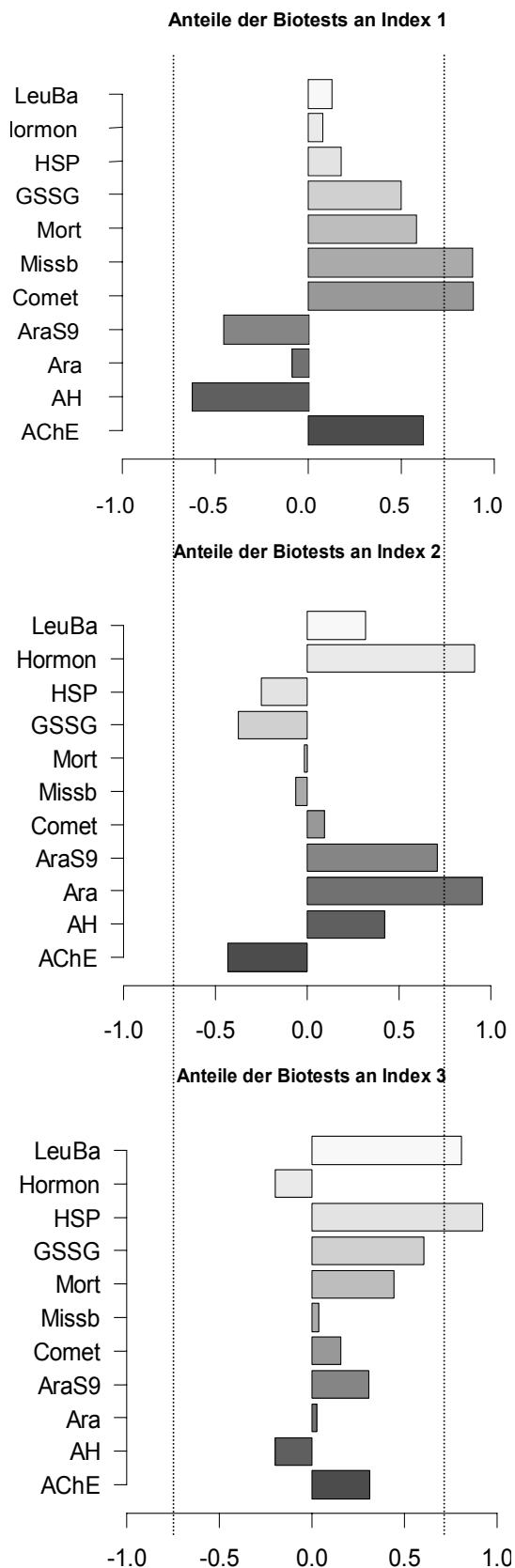
Die von dem Projektteilnehmer Herrn Werner Wosniok, Institut für Mathematik der Universität Bremen, durchgeführten statistischen Auswertungen der gesamten Daten aller Biotestergebnisse der ISIS-Biotestbatterie über Faktorenanalyse ergab drei Indizes, wobei jeder Index ein unterschiedliches Wirkungsmuster repräsentiert. Die wesentlichen sechs Biotests dieser Indizes sind neben der durch sie erklärten Varianz in Tabelle 18 aufgeführt.

Abbildung 47 zeigt die Anteile aller Biotests an dem jeweiligen Index, wobei per Definition nur für Tests mit einer „Ladung“ (Gewicht) von  $|0,71|$  ein Haupteinfluss auf den jeweiligen Index besteht.

**Tabelle 18: Auswahl der statistisch relevanten Biotests der ISIS-Biotestbatterie für die durchgeführten Untersuchungen der marinen Sedimentextrakte.**

Index	wesentliche Komponenten	erklärte Varianz
1	Comet-Assay, Fischei-Missbildung	28,8 %
2	Ara-Test, Hormonelle Aktivität	26,7 %
3	hsp70-Induktion, Leuchtbakterientest	21,5 %
	Summe	77,0 %





**Abbildung 47: Anteile der einzelnen Biotests an den Indizes 1-3.**

Die drei Indizes erklären 77,0 % der Gesamtvarianz aller 11 Biotests, sie sind somit aus statistischer Sicht als minimale Biotest-Batterie für BDF-Untersuchungen mariner Sediment-extrakte anzusehen.

Für den Index 1 sind dies die Biotests zur Genotoxizität (Comet-Assay) und zur Fischei-Missbildung an *Danio rerio*, für den Index 2 die Testsysteme zur Mutagenität (Ara-Test) und zur hormonellen Aktivität und für den letzten Index 3 der Leuchtbakterientest und die hsp70-Induktion.

Das Redoxsystem GSx (GSSG) ist für alle drei Indizes ohne signifikante Bedeutung. Das heißt, dass dieser Biotest für eine minimale BDF-Biotestbatterie nicht zu empfehlen wäre. Jedoch zeigt Abbildung 47, dass die GSSG-Bildung an allen drei Indizes mit geringeren Anteilen als  $|0,71|$  beteiligt ist. Am stärksten ist der Beitrag am Index 3 mit einer Ladung von  $|0,6|$ , gefolgt von Index 1 mit  $|0,49|$  und zuletzt Index 2 mit  $|0,37|$ . Die Ladungen aller Biotests sind im Anhang 9.16, Tabelle A41 dokumentiert.

Die Bedeutung des Redoxsystems GSx für die durchgeführten Untersuchungen hat sich nicht gezeigt, d.h. dieser Biotest ist als redundant anzusehen.

#### 7.4 Bewertung der Ergebnisse

Um zu einer realistischen Abschätzung und Bewertung der erhaltenen Ergebnisse zu kommen, soll die Beantwortung der folgenden Fragen dienen:

1. Ist die EPC-Zelllinie ein geeignetes biologisches System zum Nachweis von oxidativem Stress?
2. Sind unterschiedlich stark belastete Sedimente anhand des Biotests klar voneinander zu differenzieren?
3. Wurden Effekte in marinen Sedimenten nachgewiesen?
4. Wurden oxidativ wirksame und toxisch relevante Einzelsubstanzen mittels BDF identifiziert?
5. Ist die GSSG-Bildung ein geeigneter Messparameter in der BDF?

Die EPC-Zelllinie stellte sich als kein optimal geeignetes biologisches Material zur Untersuchung von oxidativem Stress dar. Dies zeigt sich auch darin, dass in der Literatur bisher erst zwei Arbeiten existieren, die die EPC-Zellen für entsprechende Studien verwendet haben (WRIGHT et al., 2000; GEORGE et al., 2000), obwohl diese Zelllinie bereits seit 20 Jahren für biologische Untersuchungen genutzt wird - hauptsächlich zu Untersuchungen des invasiven Verhaltens von Fischviren (NIELSEN und BUCHMANN, 2000; LORENZEN et al., 1999; FIJAN et al., 1983).

Einzig das Redoxsystem GSx zeigte eine sensitive und reproduzierbare Antwort auf den Einsatz oxidativer Stressoren. Die Bildung von GSSG ist ein etablierter Marker für oxidativen Stress und kann dazu dienen, erste Anhaltspunkte für eine beginnende oxidative Schädigung zu liefern. Um die Aussagekraft zum induzierten oxidativen Stress allerdings zu erhöhen, wäre es notwendig, Testsysteme zu verwenden, die ebenfalls für die antioxidativen Schutzenzyme spezifische Testantworten zeigen, bzw. durch oxidativen Stress verursachte Schädigungen (MDA) aufzeigen.

Durch den Einsatz des Redoxsystems GSx als alleinigen Messparameter war es möglich, das oxidative Stresspotential der drei unterschiedlichen Belastungsgruppen Industriehafen HH, Elbe HH sowie Nordsee, Ostsee klar voneinander zu unterscheiden. Für Fragestellungen, die die Einstufung oxidativer Potentiale komplexer Proben zur Grundlage haben, würde sich der Einsatz dieses Testsystems anbieten. Hierfür wäre eine vorherige Entschwefelung der Rohextrakte aufgrund der gezeigten Schwefelsensitivität des Redoxsystems GSx zwingend erforderlich. Ferner erwies sich das Testsystem als sehr gut geeignet, die zellulären GSx-Reaktionen mit chinoiden Substanzen zu untersuchen.

Die dritte Frage kann bejaht werden, wobei die dort beobachteten Effekte als sehr schwach einzustufen sind. Sogar die als „hochbelastet“ geltenden marinen Sedimente ISIS-1, ISIS-2 (Deutsche Bucht, Einzugsgebiet Elbe, Weser), ISIS-3 (Kieler Förde) und ISIS-6 (Odermündung) zeigten im Vergleich zu den Proben aus Elbe und Hafen HH nur geringe Effekte. Diese Ergebnisse spiegeln die vorherrschende Belastungssituation im marinen Raum wider: Vergleichsweise geringe Schadstoffniveaus induzieren schwach toxische Effekte.

Die Identifizierung der die GSSG-Bildung verursachenden Substanzen mittels BDF führte nur für  $S_8$  zum Erfolg. Die toxikologische Relevanz des originär im Sediment vorkommenden  $S_8$  ist bislang nicht geklärt. Anhand der beobachteten GSSG-Bildung ist es nicht möglich, ein Gefährdungspotential für marine Organismen abzuleiten. Hierzu wäre die Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse näher zu untersuchen.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Datenmatrix der ISIS-Biotestbatterie wird deutlich, dass es sich bei dem Redoxsystem GSx um einen redundanten Biotest handelt, der nicht für eine BDF-Biotestbatterie zu empfehlen wäre.

## 8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zum Nachweis bisher unbekannter, toxikologisch relevanter Substanzen in marinen Sedimenten geleistet werden. Als Untersuchungsstrategie wurde die Biotest-dirigierte Fraktionierung angewandt. Hierzu wurden sieben Sedimentextrakte aus der Nordsee (Deutsche Bucht und Skagerrak) und Ostsee (Kieler Förde, Arkonabecken, Odermündung und Gotlandtief) auf ihr oxidatives Schädigungspotential für das verwendete biologische Material der permanenten Zelllinie *Epithelioma papulosum cyprini* EPC untersucht.

Im Voraus der Untersuchungen der marinen Sedimentextrakte wurden für die EPC-Zelllinie eine Sensitivitätsprüfung auf die zur Bestimmung von oxidativem Stress in zellulären Systemen etablierten enzymatischen Parameter Superoxiddismutase (SOD), Katalase (KAT), Glutathion-Peroxidase (GPx), Glutathion-Reduktase (GR), Glutathion-S-Transferase (GST), das Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd und das Redoxsystem Glutathion (GSx) durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass nur die biologischen Marker KAT und das Redoxsystem GSx ausreichend empfindlich genug waren, oxidativen Stress spezifisch zu detektieren.

Die Überprüfung der Kompatibilität der Biotests mit den zur Extraktion und Fraktionierung verwendeten Lösungsmitteln ergab keine nennenswerten Interferenzen mit den Biotests. Die Inkubationsbedingungen für die beiden biologischen Marker KAT und GSx wurden optimiert. Die Steigerung der KAT-Aktivität der EPC-Zellen war nur durch die Inkubation mit Wasserstoffperoxid reproduzierbar, beim Einsatz weiterer oxidativer Stressoren war die KAT-Induktion nicht ausreichend empfindlich.

Für das Redoxsystem GSx zeigte eine Vielzahl von Substanzen eine positive Antwort. Hierbei wurde Menadion als optimale Positivkontrolle für den Biotest ermittelt. Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Methode wurde die Auswertung optimiert, wodurch dann ein direkter Vergleich der Messergebnisse unterschiedlicher EPC-Zellgenerationen möglich war.

Zum Abschluss der methodischen Arbeiten wurde durch spezifische Inhibition der Enzyme SOD, KAT, GR, DT-Diaphorase und GSH-Synthase für die Enzyme SOD und GR der größte positive Einfluss auf die durch Menadion verursachte GSSG-Bildung beobachtet.

Eine Schwefelsensitivität des Redoxsystems GSx wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben und ein möglicher GSSG-Bildungsmechanismus, ausgehend von GSH und elementarem Schwefel S<sub>8</sub>, vorgeschlagen.

Zur Klassifizierung der durch die Inkubation mit den marinen Sedimentextrakten verursachten Effekte wurden jeweils zwei Rohextrakte aus der Hamburger Elbe und dem Hamburger Industriehafen mit dem Biotest GSx untersucht. Hierbei war eine Einstufung der Grundbelastung der Rohextrakte der drei Gruppen eindeutig über die beobachteten Effekte der GSSG-Bildung durchführbar.

Zieht man die Ergebnisse der GSSG-Bildung für die untersuchten Fraktionen der BDF in die Klassifizierung mit hinein, so wurde eine Effektklassifizierung (0-4) in fünf Klassen vorgenommen.

Bei den Untersuchungen der BDF-Fractionen der Proben ISIS-2 (Deutsche Bucht), ISIS-3 (Kieler Förde) und ISIS-6 (Odermündung) waren die Effekte der GSSG-Bildung bis in die dritte Untersuchungsstufe (HPLC-Fractionen) nachzuvollziehen. Eine weitere Fraktionierung der HPLC-Fractionen führte zu einer kompletten Auflösung der zuvor beobachteten Effekte der dritten Untersuchungsstufe. Die Effekte der HPLC-Fraktion 4 der Proben ISIS-2 und ISIS-6 repräsentierte noch circa 20 % des Effektes der Rohextrakte; die Identifizierung der verursachenden Einzelverbindung über Einzelstoffprüfung von 13 in der HPLC-F4 nachgewiesenen Einzelsubstanzen wurde indes nicht erreicht.

Dies spricht für einen additiven oder synergistischen Effekt des immer noch komplex vorliegenden Schadstoffgemisches in der HPLC-F4. Es war nur für die Substanzklasse der oxidierten PAK, und hier ausschließlich für chinoide Verbindungen wie 9,10-Phenanthrenchinon, ein begründeter Verdacht auszusprechen, dass sie einen Beitrag zur beobachteten biologischen Wirkung auf die EPC-Zellen haben. In diesem Zusammenhang wurde erstmals die inhibierende Wirkung von 9,10-Phenanthrenchinon auf das Enzym GR beschrieben.

Bei der Untersuchung von 14 ausgewählten Chinonen wurden stark von den vorliegenden Substituenten (-CH<sub>3</sub>, -OH) abhängige Einflüsse auf die GSSG-Bildung beobachtet. Daneben stellte das Vermögen der Chinone GSH zu konjugieren, einen entscheidenden, hemmenden Einfluss auf die GSSG-Bildung dar.

Die abschließende statistische Auswertung der ISIS-Biotestbatterie, in der neben dem Redoxsystem GSx noch 10 weitere Biotests zur Untersuchung der marinen Sedimentextrakte implementiert waren, ergab, dass es sich bei dem Redoxsystem GSx um einen redundanten Biotest handelt, der prioritär nicht für eine BDF-Biotestbatterie zu empfehlen wäre.

Für konkrete Fragestellungen zum induzierten oxidativen Stress stellt das Redoxsystem GSx der permanenten EPC-Zelllinie jedoch einen spezifischen und empfindlichen biologischen Marker dar.

## Summary

The aim of this study was to investigate so far unknown toxic substances in marine sediments. The detection is based on the biotest-directed fractionation. Seven organic sediment extracts from the North Sea and the Baltic Sea were examined for their oxidative potential for the used permanent fish cell line *Epithelioma papulosum cyprini* EPC. A sensitivity test for the EPC-cells was performed to verify suitable biological markers for the determination of oxidative stress in the cellular system of EPC.

From the enzymatic and non enzymatic parameters tested, like superoxide dismutase (SOD), catalase (KAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), malondialdehyde, and redox system glutathione GSx only KAT and GSx were sensitive enough to detect oxidative stress.

The compatibility of the biotests with the organic solvents used for extraction and fractionation was tested and no interferences with the biotests were observed. Furthermore, the parameters for incubation of the EPC-cells were optimized.

The induction of the antioxidative enzyme KAT was only reproducible when hydrogen peroxide was used as oxidative stimulant. Further oxidative stressors showed no effect. On the other hand, a lot of compounds lead to a positive response for the redox system GSx. Menadione was found as the optimal positive control for this biotest. For the direct comparison of the obtained data from different EPC-cell generations the evaluation was optimized which increased the method reproducibility remarkably.

The specific inhibition of the antioxidative enzymes SOD, KAT, GR, DT-diaphorase, and glutathione-synthase showed the largest influence for SOD and GR as far as the menadione induced formation of oxidized glutathione GSSG is concerned.

In this study the sensitivity of the redox system GSx for elemental sulphur was described the first time and a possible mechanism for the GSSG-formation was proposed.

For classification of the observed effects from the seven marine sediment extracts, two crude extracts from the river Elbe and from the industrial area of the port of Hamburg were investigated, respectively. Thereby, a ranking of contamination for the three groups of crude extracts was definitely possible. Including the results of the GSSG-formation for the three steps of fractionation of the BDF-procedure a classification in five groups (0-4) was made.

The effects for the samples ISIS-2 (German Bay), ISIS-3 (Kiel), and ISIS-6 (mouth of the river Oder) were still existing after the third step of fractionation (HPLC-fractions 1-6). The effects that could have been observed in the HPLC-fractions 1-6 disappeared after further fractionation. HPLC-fraction 4 represented about 20 % of the effects from the crude extracts of ISIS-2 and ISIS-6. The identification of the causing agents was not achieved. Therefore, it seemed that synergistic and/or antagonistic effects were responsible for the GSSG-formation in the still complex mixture of compounds in HPLC 4.

Only for quinones of polycyclic aromatic hydrocarbons, namely 9,10-phenanthrenequinone, a contribution to the biological effect was possible. In this connection, the inhibitory effect of 9,10-phenanthrenequinone for the enzyme GR was described for the first time.

By investigating 14 different quinones for their ability to form GSSG in the EPC-cells, a correlation to present substituents (-CH<sub>3</sub>, -OH) at the quinoid structure was determined. Furthermore, the ability of the quinones to conjugate with GSH to form GSH-conjugates had a significant negative influence for the GSSG-formation.

Finally, the statistical interpretation of the whole ISIS-biotest battery with 11 different biotests participating showed that the redox system GSx is redundant for the investigation of marine sediment extracts and is not recommendable for a BDF-biotest battery. Only for special questions of inducible oxidative stress the use of GSx of the permanent EPC cell line will be a specific and sensitive biological marker.

## 9 Anhang

### 9.1 Zellaufarbeitung

Die Zellaufarbeitung erfolgte modifiziert nach Bunke (2000) und Kammann et al. (2001).

#### 9.1.1 Reagenzien und Lösungen

<b>PBS</b> 10,0 mM Phosphat-Puffer 2,7 mM KCl 137 mM NaCl	7,95 g Natriumchlorid 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g Kaliumchlorid 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 mL bidest Wasser
<b>FKS</b> Fötales Kälberserum	gebrauchsfertige Lösung der Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>EDTA-Trypsin</b> 0,02 % EDTA 0,05 % Trypsin	gebrauchsfertige Lösung der Fa. Sigma, Deisenhofen

#### 9.1.2 Durchführung

- Nährmedium aus der Zellkulturflasche abdekantieren
- 3 mL Trypsin-EDTA-Lösung zugeben
- nach 10 Minuten Zellen durch Schwenken und eventuell durch leichten Schlag der Kulturflasche an der Handkante die Zellen vollständig lösen
- 3 mL FKS-Lösung sofort hinzugeben
- Zellsuspension mehrerer Zellkulturflaschen zusammengeben (poolen)
- jeweils 300 - 600 µL der Zellsuspension in 1,5 mL-Eppendorf Reaktionsgefäße pipettieren, sowie zweimal 400 µL für die Gesamt-LDH-Bestimmung
- 4 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen und je 1 mL PBS zugeben und gut durchmischen (Waschschrift)
- Waschschrift wiederholen
- Inkubation nach erneuter Zugabe von je 1 mL PBS (bzw. 0,95 mL PBS für die Gesamt-LDH-Bestimmung)

## 9.2 Inkubation der Zellen

### 9.2.1 Reagenzien und Lösungen

<b>PBS</b> 10,0 mM Phosphat-Puffer 2,7 mM KCl 137 mM NaCl	7,95 g Natriumchlorid 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g Kaliumchlorid 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 mL bidest Wasser
<b>Lysislösung</b> LDH-Toxkit	Gebrauchsfertige Lösung der Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>1 M Salzsäure</b>	10 mL 37 %ige Salzsäure ad 100 mL bidest Wasser



### 9.2.2 Durchführung

- je 10 µL der in DMSO aufgenommenen Inkubationslösungen bzw. 50 µL Lysislösung zur Bestimmung der Gesamt-LDH werden in ein 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und gut durchmischt
- mitgeführte Kontrollwerte werden nicht inkubiert
- nach Inkubation von 120 Minuten bei Raumtemperatur wird für 4 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugiert
- vom Überstand werden 500 µL in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und hiervon je zweimal 120 µL direkt zur LDH-Bestimmung eingesetzt, der restliche Überstand wird mit 5 µL 1M Salzsäure angesäuert
- angesäuerte Inkubationslösung direkt zur externen GSH-Bestimmung einsetzen oder bei -80°C für maximal 7 Tage lagern
- jeweils 120 µL der angesäuerten Inkubationslösung für die externe GSSG-Bestimmung in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettieren und ebenfalls für maximal 7 Tage bei -80 °C lagern
- restlichen Überstand verwerfen, 1 mL PBS hinzugeben und gut durchmischen (Waschschritt)
- für 4 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugieren; Überstand verwerfen
- gewaschenes Zellpellet bei -80 °C für maximal 7 Tage lagern

### 9.3 SOD-Bestimmung

Die Bestimmung der SOD wird nach SUN et al. (1988) durchgeführt.

#### 9.3.1 Reagenzien und Lösungen

<b>Kaliumphosphatpuffer KPP</b> 0,1 M	13,2 g tri-Kaliumphosphat mit 0,1 M Salzsäure pH 6,5 einstellen ad 500 ml bidest Wasser
<b>Natriumcarbonat-Lösung</b> 400 mM	21,2 g Dinatriumcarbonat ad 50mm ml bidest. Wasser
<b>BSA-Lösung</b> 1 g/L	100 mg BSA ad 100 mL bidest. Wasser
<b>Xanthin-Lösung</b> 3 mM	45,6 mg Xanthin ad 100 mL bidest. Wasser
<b>EDTA-Lösung</b> 6 mM	111,7 mg EDTA ad 100 mL bidest. Wasser
<b>NBT<sup>®</sup>-Lösung</b> 0,3 mM	122,6 mg NBT ad 500 ml bidest. Wasser
<b>Ammoniumsulfat-Lösung</b> 2 M	2,64 g Ammoniumsulfat ad 10 mL bidest. Wasser
<b>Xanthionoxidase (XOD)</b>	12,43 U/mL gebrauchsfertig Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>XOD-Lösung</b> 0,2 U/mL	32,2 µL XOD ad 2 mL eiskalter Ammoniumsulfat-Lösung bei -18°C einen Monat haltbar
<b>SOD-Reagenzlösung</b>	40 mL Xanthinlösung 20 mL EDTA-Lösung 20 mL NBT-Lösung 12 mL Natriumcarbonat-Lösung 6 mL BSA-Lösung ad 100 mL bidest. Wasser. Die Lösung ist vor jeder Messung frisch anzusetzen

<b>SOD</b>	3350 U/mg Feststoff Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>SOD-Stammlösung</b> 737 U/ml	1,1 mg SOD ad 5 mL bidest. Wasser
<b>SOD-Standards</b> 2,95 U/ml 2,46 U/ml 1,48 U/ml 1,23 U/ml 0,62 U/ml	6 µL SOD-Stammlösung ad 1,5 ml bidest. Wasser 5 µL SOD-Stammlösung ad 1,5 mL bidest. Wasser 1:2 Verdünnung des Standards 2,95 U/mL 1:2 Verdünnung des Standards 2,46 U/mL 1:2 Verdünnung des Standards 1,23 U/mL vor jeder Messung frisch ansetzen und auf Eis kühlen

### 9.3.2 Durchführung

- Die bei  $-80\text{ °C}$  eingefrorenen Zellpellets werden unmittelbar vor der Analyse mit  $500\text{ µL}$   $0,1\text{M}$  KPP versetzt und am Ultraschall-Homogenisator behandelt.
- Homogenisat 15 Minuten bei  $5000\text{g}$  bei  $4\text{ °C}$  zentrifugieren
- $330\text{ µL}$  der Probe, Standard, bzw. Blindwert (KPP) sowie  $820\text{ µL}$  SOD-Reagenzlösung in jeweils ein Reaktionsgefäß pipettieren
- durch Zugabe von  $50\text{ µL}$  XOD-Lösung die Reaktion starten
- nach Reaktionszeit von 45 Minuten bei RT werden je  $300\text{ µL}$  in eine Kavität der Microtiterplatte pipettiert
- Messung der Microtiterplatte bei der Wellenlänge von  $590\text{ nm}$

Anmerkung: Es erfolgte eine Umwandlung der erhaltenen neg. Extinktionsabnahmen in der graphischen Darstellung (A1) durch Multiplikation mit dem Faktor  $-1$ .

### 9.3.3 Externe Kalibrierung

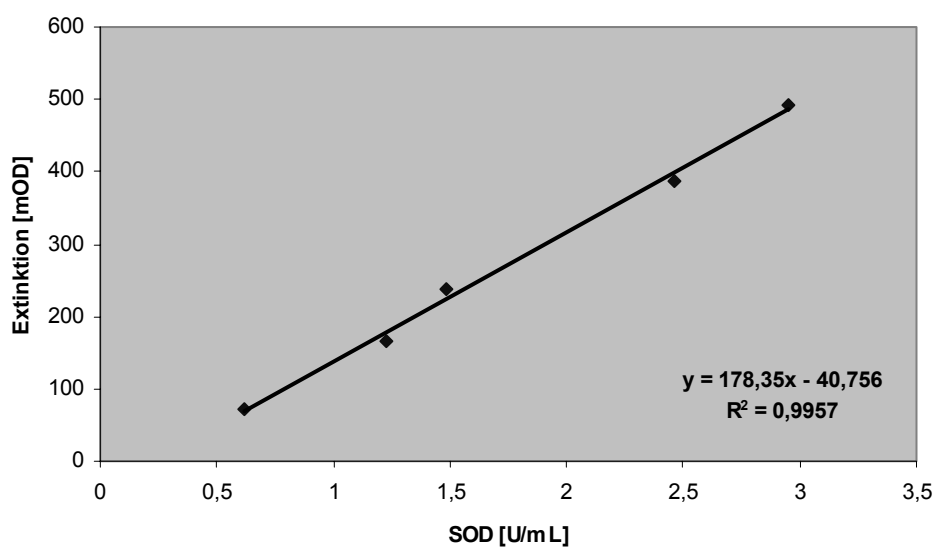


Abbildung A1: Externe Kalibrierung von SOD

### 9.3.4 Berechnung der SOD-Gehalte

Der Gehalt an SOD wird in SOD-Äquivalente (bovine erythrocytes) angegeben und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{SOD-Äquivalente [mU/mg Protein]} = \frac{\text{SOD}_{\text{Regr}} [\text{mU/ml}] * F_P * F_V * V [\mu\text{l}]}{\text{Prot. [mg/Flasche]} * 1000}$$

$\text{SOD}_{\text{Regr}}$  = SOD-Gehalt berechnet aus der Kalibriergeraden [mU/ml]

$F_P$  = Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung

$F_V$  = Verdünnungsfaktor der Probenlösung

$V$  = in KPP-Puffer aufgenommenes Volumen der Pellets [ $\mu\text{l}$ ]

Prot. = Proteingehalt einer Zellkulturflasche [mg/Flasche]

1000 = Umrechnungsfaktor von  $\mu\text{l}$  auf ml

### 9.3.5 Verfahrenskenndaten für die Gesamtmethode

Tabelle A1: Verfahrenskenndaten für die SOD-Bestimmung

	SN ( $\alpha = 0,05$ )	CV	NG	BG
SOD	13,5 %	8,8 %	0,3 mU/ml	1,0 mU/ml

## 9.4 KAT-Bestimmung

Die KAT-Bestimmung erfolgte modifiziert nach Johannson und Borg (1988)

### 9.4.1 Reagenzien und Lösungen

<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer</b> 250 mM	8,51 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 250 ml bidest. Wasser mit 1 M NaOH pH 7 einstellen bei 4 °C haltbar
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer</b> 25 mM	10 ml 250 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer ad 100 ml bidest. Wasser
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung</b> 0,27%-ig (w/v)	0,8 ml 30%-iges Wasserstoffperoxid ad 100 ml bidest. Wasser
<b>KOH-Lösung</b> 7,8 M	21,88 g Kaliumhydroxid ad 50 ml bidest. Wasser
<b>Salzsäure-Lösung</b> 0,48 M	10 ml 37%-ige Salzsäure ad 200 ml bidest. Wasser
<b>Purpald<sup>®</sup>-Lösung</b> 34,2 mM	0,4999 g Purpald <sup>®</sup> ad 100 ml Salzsäure-Lösung
<b>KOH-Lösung</b> 0,47 M	2,64 g Kaliumhydroxid ad 100 ml bidest. Wasser
<b>KIO<sub>4</sub>-Lösung</b> 65,2 mM	0,7498 g Kaliumperiodat ad 50 ml 0,47 M KOH-Lösung
<b>KAT-Stammlösung I</b> 20 mg/ml	20 mg KAT ad 1 ml 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer
<b>KAT-Stammlösung II</b> 0,4 mg/ml	20 $\mu\text{l}$ KAT-Stammlösung I ad 1 ml 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (1:50 Verdünnung)

KAT-Standards	
8 µg/ml	20 µl KAT-Stammlösung II ad 1 ml 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (1:50 Verdünnung)
4 µg/ml	1:2 Verdünnung des Standards 8 µM
2 µg/ml	1:2 Verdünnung des Standards 4 µM
1 µg/ml	1:2 Verdünnung des Standards 2 µM
0,5 µg/ml	1:2 Verdünnung des Standards 1 µM
0,25 µg/ml	1:2 Verdünnung des Standards 0,5 µM
	vor jeder Messung frisch ansetzen und auf Eis kühlen

### 9.4.2 Durchführung

- Die bei – 80 °C eingefrorenen Zellpellets werden unmittelbar vor Gebrauch mit 300 µl 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer versetzt und am Ultraschall-Homogenisator behandelt.
- 50 µl 250 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, 50 µl Methanol und 100 µl Standardlösung bzw. Probenlösung werden in Reaktionsgefäße pipettiert. Meist ist eine 1/2- oder 1/4-Verdünnung der Probenlösung notwendig.
- Als Blindwert werden 100 µl 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer eingesetzt.
- Nach Zugabe von 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wird 20 Minuten bei RT geschüttelt.
- Zum Stoppen der Reaktion werden jeweils 50 µl 7,8 M KOH-Lösung und sofort 100 µl Purpald<sup>®</sup>-Lösung hinzugegeben, um die Inkubation zu starten.
- Nach exakt 10 Minuten Inkubationszeit unter ständigem Schütteln werden jeweils 50 µl KIO<sub>4</sub>-Lösung hinzugegeben.
- Nach 2minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 2000 x g zur Austreibung der Luftblasen, werden sofort 180 µl der Katalase-Standards bzw. der Proben in jeweils eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert.
- Der gebildete Farbkomplex wird bei 540 nm als Endpunkt photometrisch gegen den Blindwert vermessen. Der Farbkomplex ist laut JOHANSSON und BORG (1988) eine Stunde stabil.
- Aus dem gleichen Zellhomogenisat erfolgt die Proteinbestimmung nach 7.6.

### 9.4.3 Externe Kalibrierung

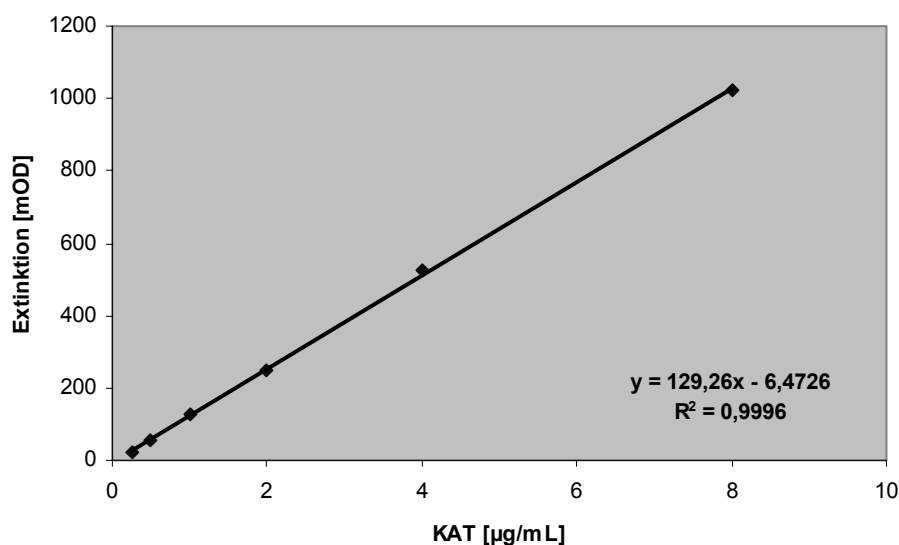


Abbildung A2: Externe Kalibrierung KAT

### 9.4.4 Berechnung der KAT-Gehalte

Die Berechnung der KAT-Gehalte erfolgt nach:

$$\text{KAT} = \frac{C_{\text{lin.Regr.}} \cdot \text{VF} \cdot \text{UF(Flasche)} \cdot 0,3}{\text{Pr}} \cdot 2,33$$

KAT	= KAT-Gehalt [U/mg Protein]
$C_{\text{lin.Regr.}}$	= über lineare Regression ermittelter KAT-Gehalt [ $\mu\text{g/ml}$ ]
VF	= Verdünnungsfaktor der Zellsuspension zur KAT-Bestimmung = $100 \mu\text{l Standard} / x \mu\text{l Zellsuspension}$
UF(Flasche)	= Umrechnungsfaktor auf eine Flasche ( $6000 \mu\text{l}$ ): bei Einsatz von $900 \mu\text{l Zellsuspension}$ = 6,67 bei Einsatz von $700 \mu\text{l Zellsuspension}$ = 8,57
0,3	= Aufnahmevolumen des Zellpellets [ml]
2,33	= Faktor zur Umrechnung in Aktivität als Rinderkatalase-Äquivalente: $1 \mu\text{g KAT}$ entsprechen laut Herstellerangabe 2,33 U
Pr	= Proteingehalt der jeweiligen Flasche [mg/Flasche]

### 9.4.5 Verfahrenskennndaten für die Gesamtmethode

**Tabelle A2: Verfahrenskennndaten der KAT-Bestimmung**

CV	NG	BG
13,6 %	0,22 $\mu\text{g/ml}$	0,66 $\mu\text{g/ml}$

### 9.5 GPx-Bestimmung

Die Bestimmung der GPx erfolgte nach CHIU et al. (1976).

#### 9.5.1 Reagenzien und Lösungen

<b>Tris-Puffer</b> 160 mM	4,85 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 27,1 mg EDTA mit 0,1 M Salzsäure pH 7,6 einstellen ad 250 mL bidest Wasser
<b>NADPH-Reagenz</b> 0,8 mM GSH 0,38 mM NADPH 9 U/mL GR	2,5 mg GSH 3,2 mg NADPH 67,2 $\mu\text{L GR}$ (1340 U/mL; Sigma, Deisenhofen) ad 10 mL Tris-Puffer
<b>tert-Butylhydroperoxid-Lösung</b> 0,05 %	1:160 Verdünnung mit bidest. Wasser einer 80-%igen, kommerziell erhältlichen Reagenzlösung
<b>GPx-Stammlösung</b> 110,7 U/mL	0,9 mg GPx (123 U/g; Sigma, Deisenhofen) ad 1 mL bidest. Wasser
<b>GPx-Standards</b> 13,8 U/mL 11,1 U/mL 5,6 U/mL 3,5 U/mL 2,8 U/mL 1,8 U/mL	50 $\mu\text{L GPx-Stammlösung}$ ad 400 $\mu\text{L Tris-Puffer}$ 10 $\mu\text{L GPx-Stammlösung}$ ad 100 $\mu\text{L Tris-Puffer}$ 1:2 Verdünnung des Standards 11,1 U/mL 1:4 Verdünnung des Standards 13,8 U/mL 1:2 Verdünnung des Standards 5,6 U/mL 1:2 Verdünnung des Standards 3,5 U/mL vor jeder Messung frisch ansetzen und auf Eis kühlen

### 9.5.2 Durchführung

- Die bei  $-80\text{ °C}$  eingefrorenen Zellpellets werden unmittelbar vor der Analyse mit  $300\text{ }\mu\text{L}$   $0,16\text{ M}$  Tris-Puffer versetzt und am Ultraschall-Homogenisator behandelt.
- Homogenisat 15 Minuten bei  $5000g$  bei  $4\text{ °C}$  zentrifugieren
- $15\text{ }\mu\text{L}$  der Probe, Standard, bzw. Blindwert (Tris-Puffer) sowie  $75\text{ }\mu\text{L}$  Tris-Puffer und  $75\text{ }\mu\text{L}$  NADPH-Reagenz in jeweils eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettieren
- Reaktion durch Zugabe von  $75\text{ }\mu\text{L}$  *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung starten
- Die NADPH-Oxidation wird kinetisch bei der Wellenlänge von  $340\text{ nm}$  verfolgt
- Parameter Microtiterplattenreader: Schüttelzeit: 5 Sekunden  
Zeit zwischen den Messzyklen: 30 Sekunden  
Anzahl der Messzyklen: 10  
Wellenlänge:  $340\text{ nm}$

### 9.5.3 Externe Kalibrierung

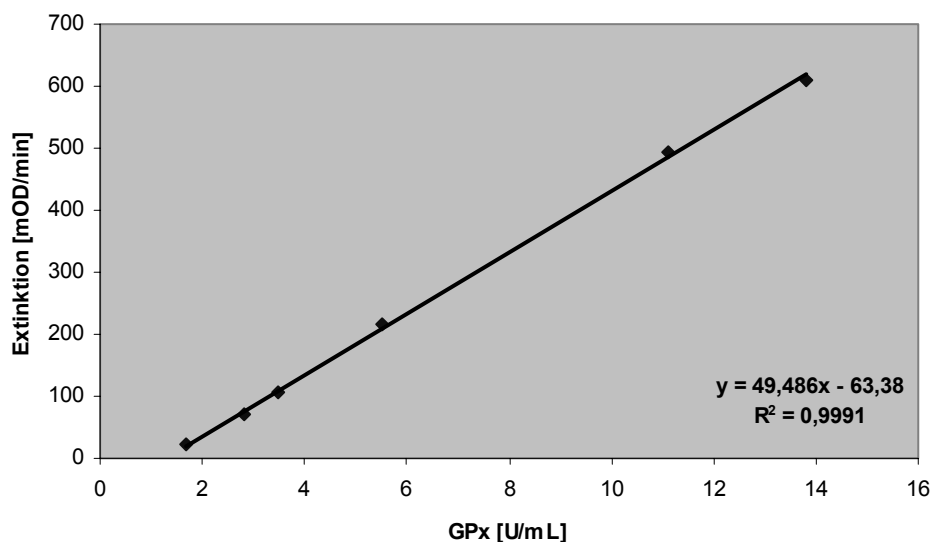


Abbildung A3: Externe Kalibrierung von GPx

### 9.5.4 Berechnung der GPx-Gehalte

Der Gehalt an GPx wird in GPx-Äquivalente (bovine erythrocytes) angegeben und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{GPx-Äquivalente [U/mg Protein]} = \frac{\text{GPx}_{\text{Regr.}} [\text{U/ml}] * V [\mu\text{l}] * F_P * F_V}{\text{Prot.} [\text{mg/Flasche}] * 1000}$$

$\text{GPx}_{\text{Regr.}}$  = GPx-Gehalt berechnet aus der Kalibriergeraden [U/ml]

$V$  = in KPP-Puffer aufgenommenes Volumen der Pellets [ $\mu\text{l}$ ]

$F_P$  = Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung

$F_V$  = Verdünnungsfaktor der Probenlösung

Prot. = Proteingehalt der jeweiligen Flasche [mg/Flasche]

1000 = Umrechnungsfaktor von  $\mu\text{l}$  auf ml

### 9.5.5 Verfahrenskenndaten für die Gesamtmethode

Anmerkung: Die GPx-Aktivitäten der Kontrollwerte sind zu gering und liegen unterhalb der Nachweisgrenze des Testes. Somit kann kein SN und kein CV berechnet werden.

**Tabelle A3: Verfahrenskenndaten für die GPx-Methode**

	SN ( $\alpha = 0,05$ )	CV	NG	BG
GPx	n.b.	n.b.	1,085 U/ml	3,255 U/ml

### 9.6 GR-Bestimmung

Die Bestimmung der GR erfolgte modifiziert nach WILHELM et al. (2001).

#### 9.6.1 Reagenzien und Lösungen

<b>Tris-Puffer</b> 160 mM	4,85 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 27,1 mg EDTA mit 0,1 M Salzsäure pH 7,6 einstellen ad 250 mL bidest Wasser
<b>NADPH-Reagenz</b> 1mM GSSG 0,25 mM NADPH	6,2 mg GSSG 2,1 mg NADPH ad 10 mL Tris-Puffer
<b>GR-Stammlösung</b> 6,7 U/mL	10 $\mu$ L GR-Lösung (1340 U/mL; Sigma, Deisenhofen) ad 2 mL Tris-Puffer
<b>GR-Standards</b> 3,35 U/mL 1,68 U/mL 1,34 U/mL 0,67 U/mL 0,34 U/mL 0,17 U/mL	500 $\mu$ L GR-Stammlösung ad 1,0 ml Tris-Puffer 1:2 Verdünnung des Standards 3,35 U/mL 1:5 Verdünnung der GR-Stammlösung 1:2 Verdünnung des Standards 1,34 U/mL 1:2 Verdünnung des Standards 0,67 U/mL 1:2 Verdünnung des Standards 0,34 U/mL vor jeder Messung frisch ansetzen und auf Eis kühlen

#### 9.6.2 Durchführung

- Die bei  $-80$  °C eingefrorenen Zellpellets werden unmittelbar vor der Analyse mit 300  $\mu$ L 0,16 M Tris-Puffer versetzt und am Ultraschall-Homogenisator behandelt.
- Homogenisat 15 Minuten bei 5000g bei 4 °C zentrifugieren
- 15  $\mu$ L der Probe, Standard, bzw. Blindwert (Tris-Puffer) sowie 125  $\mu$ L Tris-Puffer in jeweils eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettieren
- Reaktion durch Zugabe von 125  $\mu$ L NADPH-Reagenz starten
- Die NADPH-Oxidation wird kinetisch bei der Wellenlänge von 340 nm verfolgt
- Parameter Microtiterplattenreader: Schüttelzeit: 5 Sekunden  
Zeit zwischen den Messzyklen: 30 Sekunden  
Anzahl der Messzyklen: 7  
Wellenlänge: 340 nm

### 9.6.3 Externe Kalibrierung

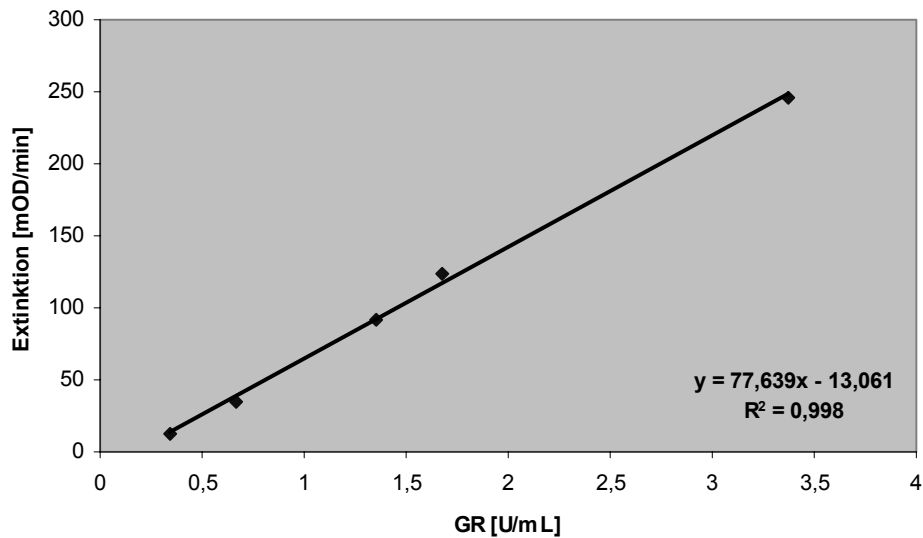


Abbildung A4: Externe Kalibrierung von GR

### 9.6.4 Berechnung der GR-Gehalte

Der Gehalt an GR wird in GR-Äquivalente angegeben und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{GR-Äquivalente [U/mg Protein]} = \frac{\text{GR}_{\text{Regr}} [\text{U/ml}] * V [\mu\text{l}] * F_P * F_V}{\text{Prot. [mg/Flasche]} * 1000}$$

- GR<sub>Regr</sub> = GR-Gehalt berechnet aus der Kalibriergeraden [U/ml]
- V = in KPP-Puffer aufgenommenes Volumen der Pellets [μl]
- F<sub>P</sub> = Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung
- F<sub>V</sub> = Verdünnungsfaktor der Probenlösung
- Prot. = Proteingehalt der jeweiligen Flasche [mg/Flasche]
- 1000 = Umrechnungsfaktor von μl auf ml

### 9.6.5 Verfahrenskenndaten für die Gesamtmethode

Tabelle A4: Verfahrenskenndaten für die GR-Bestimmung				
	SN (α = 0,05)	CV	NG	BG
GR	27,6 %	17,9 %	0,218 U/ml	0,654 U/ml



## 9.7 GST-Bestimmung

Die GST-Bestimmung erfolgte nach der Methode von HABIG et al. (1974) und WHEATLEY et al. (1994).

### 9.7.1 Reagenzien und Lösungen

<b>Kaliumphosphatpuffer KPP</b> 0,1 M	13,2 g tri-Kaliumphosphat mit 1 M Salzsäure pH 6,5 einstellen ad 500 ml bidest Wasser
<b>GSH-Lösung</b> 1,65 mM	12,7 mg GSH ad 25 mL KPP
<b>CDNB-Lösung</b> 28 mM	11,3 mg CDNB ad 2 mL Ethanol (96-%ig)
<b>GST-Stammlösung</b> 71 U/mL	Gebrauchsfertig von Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>GST-Standards</b> I: 1420 mU/mL II: 710 mU/mL III: 355 mU/mL IV: 178 mU/mL V: 89 mU/mL	20 µl GST-Stammlösung ad 1 ml bidest. Wasser 500 µl GST-Standard I ad 1 ml bidest. Wasser 500 µl GST-Standard II ad 1 ml bidest. Wasser 500 µl GST-Standard III ad 1 ml bidest. Wasser 500 µl GST-Standard IV ad 1 ml bidest. Wasser Standards täglich frisch ansetzen und auf Eis lagern

### 9.7.2 Durchführung

- Die bei -80 °C eingefrorenen Zellpellets werden unmittelbar vor der Analyse mit 300 µL 0,1M KPP versetzt und am Ultraschall-Homogenisator behandelt.
- Homogenisat 15 Minuten bei 5000g bei 4 °C zentrifugieren
- 100 µL der Probe, Standard, bzw. Blindwert (KPP) sowie 170 µL GSH-Lösung (finale Konzentration 1mM) in jeweils eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettieren
- Reaktion durch Zugabe von 10 µL CDNB-Reagenz (finale Konzentration 1 mM) starten
- Die Bildung des CDNB-GSH-Konjugates wird kinetisch bei der Wellenlänge von 340 nm verfolgt
- Parameter Microtiterplattenreader: Schüttelzeit: 5 Sekunden  
Zeit zwischen den Messzyklen: 15 Sekunden  
Anzahl der Messzyklen: 20  
Wellenlänge: 340 nm

### 9.7.3 Externe Kalibrierung

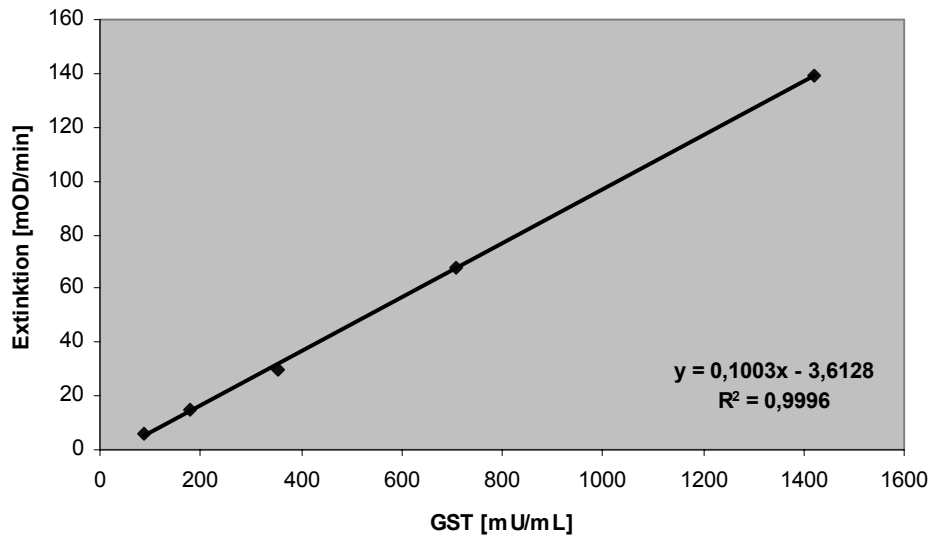


Abbildung A5: Externe Kalibrierung von GST

### 9.7.4 Berechnung der GST-Gehalte

Der Gehalt an GST berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{GST-Äquivalente [mU/mg Protein]} = \frac{\text{GST}_{\text{Regr. [mU/ml]} * V [\mu\text{l}] * F_V * F_P}{\text{Prot. [mg/Flasche]} * 1000}$$

$\text{GST}_{\text{Regr}}$  = GST-Gehalt berechnet aus der Kalibriergeraden [mU/ml]

$V$  = in KPP-Puffer aufgenommenes Volumen der Pellets [ $\mu\text{l}$ ]

$F_P$  = Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung

$F_V$  = Verdünnungsfaktor der Probenlösung

Prot. = Proteingehalt der jeweiligen Zellkulturflasche [mg/Flasche]

1000 = Umrechnungsfaktor von  $\mu\text{l}$  auf ml

### 9.7.5 Verfahrenskenndaten für die Gesamtmethode

Tab. A5: Verfahrenskenndaten für die GST-Bestimmung

	SN ( $\alpha = 0,05$ )	CV	NG	BG
GST	25,9 %	16,8 %	95,4 mU/ml	286,0 mU/ml

## 9.8 HPLC-MSD-Bestimmung von Chinon-Thioetherkonjugaten

### 9.8.1 Reagenzien und Lösungen

<b>PBS</b> 10,0 mM Phosphat-Puffer 2,7 mM KCl 137 mM NaCl	7,95 g Natriumchlorid 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g Kaliumchlorid 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 mL bidest Wasser
<b>Perchlorsäure</b> 0,6 M	10,05 g Perchlorsäure (60 %-ig) ad 10 mL dest. Wasser
<b>Chinon-Reagenz-Lösung</b> 28 mM	30-50 mg (je nach Chinon) ad 1 mL DMSO 1:10 Verdünnung in DMSO
<b>GSH-Lösung</b> 1,65 mM	12,7 mg GSH ad 25 mL PBS
<b>GST-Stammlösung</b> 71 U/mL	gebrauchsfertige Lösung Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>GST-Standardlösung</b> 1420 mU/mL	20 µL GST-Stammlösung ad 1 mL
<b>GSH-Konjugatlösung</b> 1 mM GSH 1 mM Substrat (Chinon) 500 mU/mL GST	170 µL GSH-Lösung 100 µL GST-Standardlösung 10 µL Substrat
<b>Ammoniumformiat-Lösung</b> 1 mM pH 3,9	7,5 mL Ammoniaklösung (25 %-ig) ad 1 L bidest Wasser 10 mL ad 1 L bidest. Wasser mit Ameisensäure pH 3,9 einstellen

### 9.8.2 Durchführung

- Direkte Inkubation und anschließende Aufarbeitung der EPC-Zellen nach 9.1 und 9.2. 1 mL des Inkubationsmediums für die HPLC-Messung abnehmen.
- Zellpellet in 500 µL PBS aufnehmen und am Ultraschallhomogenisator homogenisieren
- Zusatz von 1 mL 0,6 M Perchlorsäure zur Proteinfällung
- 10 Minuten auf Eis lagern
- Zentrifugation bei 5000g, 4 °C für 15 Minuten
- Überstand zur HPLC-Messung einsetzen
- GSH-Konjugat-Lösungen (mit und ohne GST) direkt zur HPLC-Messung einsetzen

### 9.8.3 HPLC-Bedingungen

#### Geräteparameter:

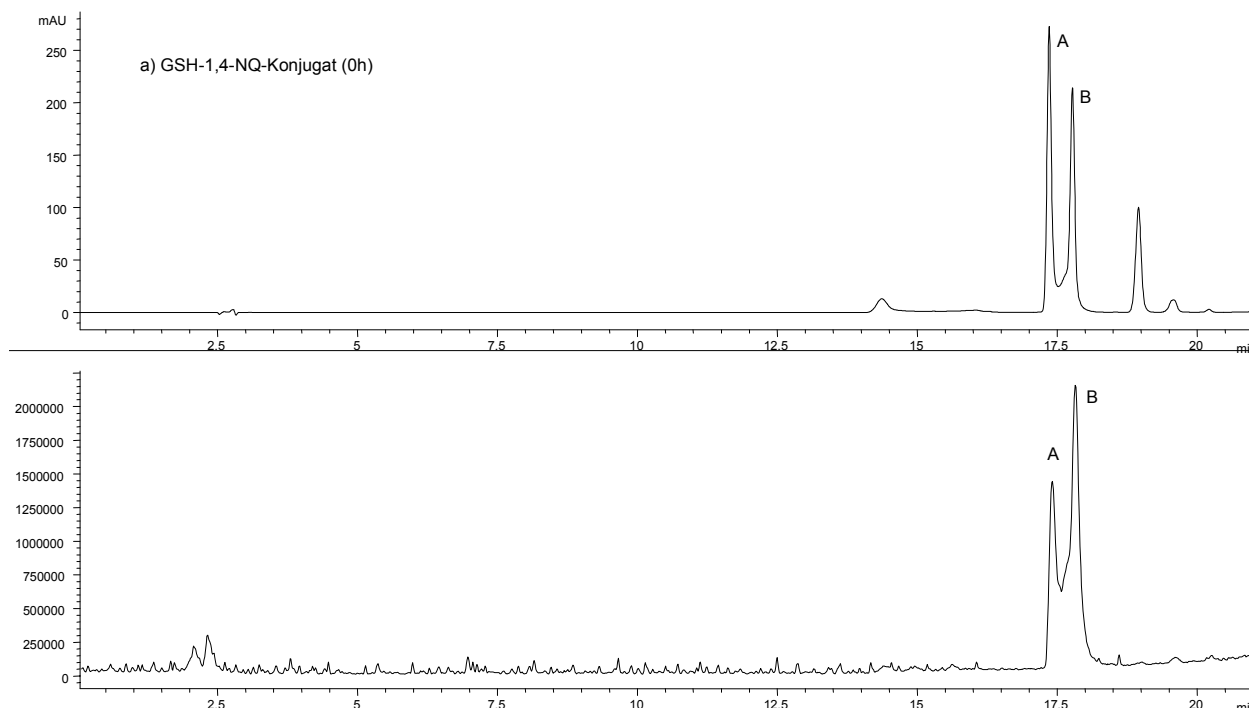
HPLC-Anlage	Series 1100, Agilent Technologies
MSD	MSD Series 1100, Agilent Technologies
	Ionisationsmodus: Elektrospray positiv
	Nebulizer pressure: 40 psig
	Drying gas temperature: 300 °C
	Drying gas flow: 8 L/min, Stickstoff
	Capillary voltage: 4000 V

Säule Multospher-100; RP-18; 5  $\mu$ M; 250 x 4 mm  
 Auswertung Chem-Station, Rev. A 08.03, Agilent Technologies  
 Flow 1 mL/min  
 Detektionswellenlänge 340 nm  
 Temperatur RT

Tabelle A6: Gradient zur Trennung der Chinon-Thioetherkonjugate

Zeit [min]	Ammoniumformiat	Acetonitril
	[%]	[%]
0	90	10
10	90	10
20	50	50
25	50	50
28	90	10
35	90	10

Chromatogramme der direkten, GST-unabhängigen Konjugation von 1,4-NQ mit GSH:



**Abbildung A6: GSH-1,4-NQ-Konjugat direkt nach Starten der Reaktion. A= 3-Glutathionyl-1,4-Dihydroxynaphthalin; B= 3-Glutathionyl-1,4-NQ (Strukturen siehe Abbildung 42, Kapitel 5.5.2)**

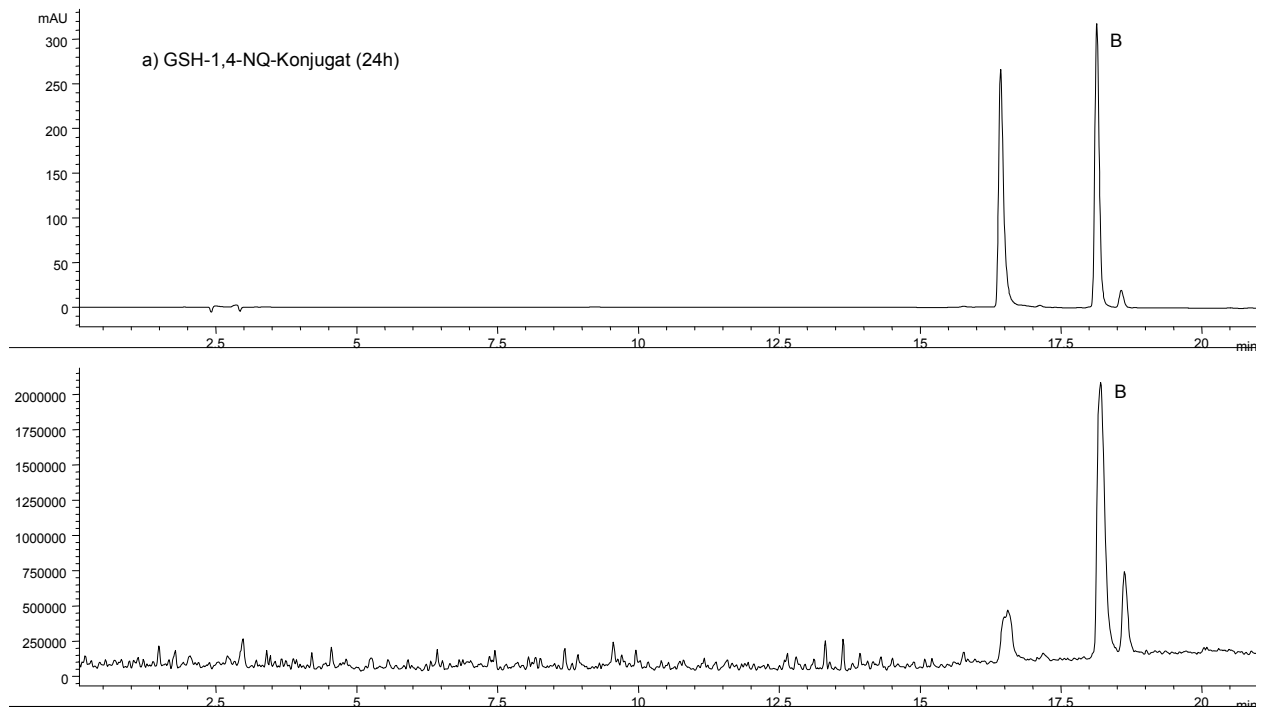


Abbildung A7: GSH-1,4-NQ-Konjugat nach Reaktionszeit von 24 h

### 9.8.4 MSD-Spektren

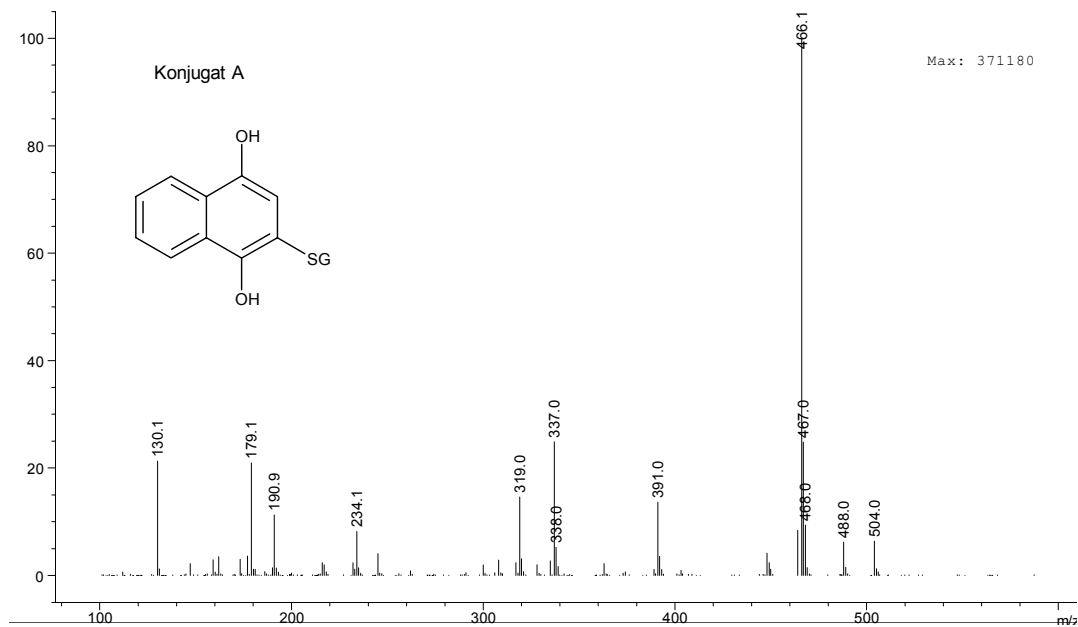


Abbildung A8: Spektrum von 3-Glutathionyl-1,4-Dihydroxynaphthalin

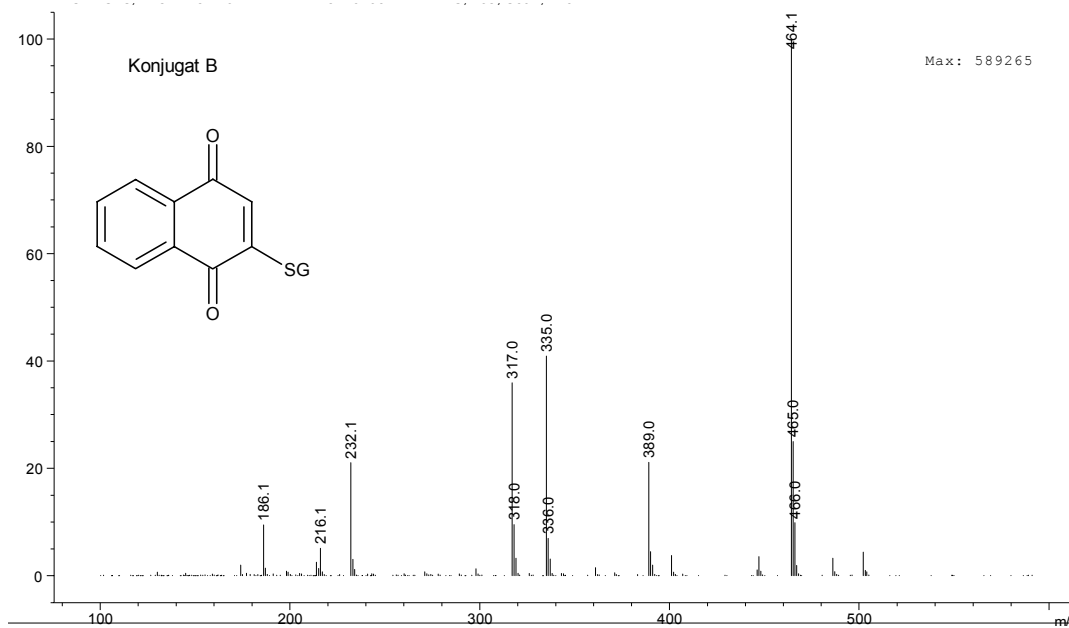


Abbildung A9: Spektrum von 3-Glutathionyl-1,4-NQ

## 9.9 GSx-Bestimmung

Die GSx-Bestimmung erfolgt modifiziert nach Vandeputte et al. (1994).

### 9.9.1 Reagenzien und Lösungen

<b>PBS</b> 10,0 mM Phosphat-Puffer 2,7 mM KCl 137 mM NaCl	7,95 g Natriumchlorid 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g Kaliumchlorid 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 mL bidest Wasser
<b>GSH-Puffer</b> 143,0 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6,3 mM EDTA	19,73 g Natriumdihydrogenphosphat 2,35 g EDTA ad 1000 ml bidest. Wasser mit 1 M NaOH pH 7,4 einstellen bei 4 °C haltbar
<b>DTNB-Lösung</b> 10 mM	0,040 g DTNB ad 10 ml GSH-Puffer max. 1 Woche bei 4 °C haltbar
<b>Salzsäure (HCl)</b> 1 M	10 ml 37 %ige HCl ad 100 ml bidest. Wasser
<b>Salzsäure (HCl)</b> 10 mM	1 ml 1 M HCl ad 100 ml bidest. Wasser
<b>Salzsäure SSA</b> 10 mM HCl 1,3-%ig SSA (w/v)	1 ml 1 M HCl 1,3 g Sulfosalicylsäure-Dihydrat ad 100 ml bidest. Wasser
<b>SSA-Lösung</b> 6,5-%ig (w/v)	3,25 g Sulfosalicylsäure Dihydrat ad 50 ml bidest. Wasser
<b>daily reagent</b> pro 96-well-Platte	6 mg NADPH 2 ml DTNB-Lösung 18 ml GSH-Puffer an jedem Messtag frisch ansetzen, bis zum Gebrauch auf Eis kühlen

<b>GR</b> Proteingehalt 2,8 mg/ml Aktivität 168 U/mg	gebrauchsfertig
<b>GR-Lösung</b> pro 96-well-Platte	145 µl GR ad 7855 µl GSH-Puffer
<b>GSH-Stammlösung I</b> 80 mM	12,5 mg GSH ad 500 µl Salzsäure SSA max. 8 Tage bei – 80 °C haltbar
<b>GSSG-Stammlösung I</b> 40 mM	12,5 mg GSSG ad 500 µl Salzsäure SSA max. 8 Tage bei – 80 °C haltbar
<b>GSH-Stammlösung II</b> 0,8 mM	10 µl GSH-Stammlösung I ad 1 ml Salzsäure SSA (1:100 Verdünnung)
<b>GSSG-Stammlösung II</b> 0,4 mM	10 µl GSSG-Stammlösung I ad 1 ml Salzsäure SSA (1:100 Verdünnung)
<b>GSH-Standards</b> 8 µM 4 µM 2 µM 1 µM 0,5 µM	10 µl GSH-Stammlösung II ad 1 ml Salzsäure SSA (1:100 Verdünnung) 1:2 Verdünnung des Standards 8 µM 1:2 Verdünnung des Standards 4 µM 1:2 Verdünnung des Standards 2 µM 1:2 Verdünnung des Standards 1 µM vor jeder Messung frisch ansetzen und auf Eis kühlen
<b>GSSG-Standards</b> 8 µM 4 µM 2 µM 1 µM 0,5 µM 0,25 µM	20 µl GSSG-Stammlösung II ad 1 ml Salzsäure SSA (1:50 Verdünnung) 1:2 Verdünnung des Standards 8 µM 1:2 Verdünnung des Standards 4 µM 1:2 Verdünnung des Standards 2 µM 1:2 Verdünnung des Standards 1 µM 1:2 Verdünnung des Standards 0,5 µM vor jeder Messung frisch ansetzen und auf Eis kühlen

## 9.9.2 Durchführung

### 9.9.2.1 GSH-Bestimmung

#### internes GSH:

- Die nach 8.2.2 erhaltenen Zellpellets werden mit 300 µL 10 mM Salzsäure versetzt und mittels Ultraschallhomogenisator homogenisiert.
- Je zweimal 5 µL zur Proteinbestimmung einsetzen und restliches Zellhomogenisat mit 50 µL 6,5%-iger SSA-Lösung zur Proteinfällung versetzen und 10 Minuten auf Eis kühlen.
- Zentrifugation für 15 Minuten bei 2000g und 4°C
- 55 µl der GSH-Standards bzw. 5 µL des Überstandes und 50 µL 10 mM Salzsäure (1:11 Verdünnung) werden in je eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 µL daily-reagent versetzt, als Blindwert 55 µL 10 mM Salzsäure einsetzen
- je Kavität rasch 40 µL GR pipettieren und die kinetische Messung bei 405 nm starten
- Parameter Microtiterplattenreader: Schüttelzeit: 5 Sekunden  
(für GSH und GSSG) Zeit zwischen den Messzyklen: 15 Sekunden  
Anzahl der Messzyklen: 25  
Wellenlänge: 405 nm

externes GSH:

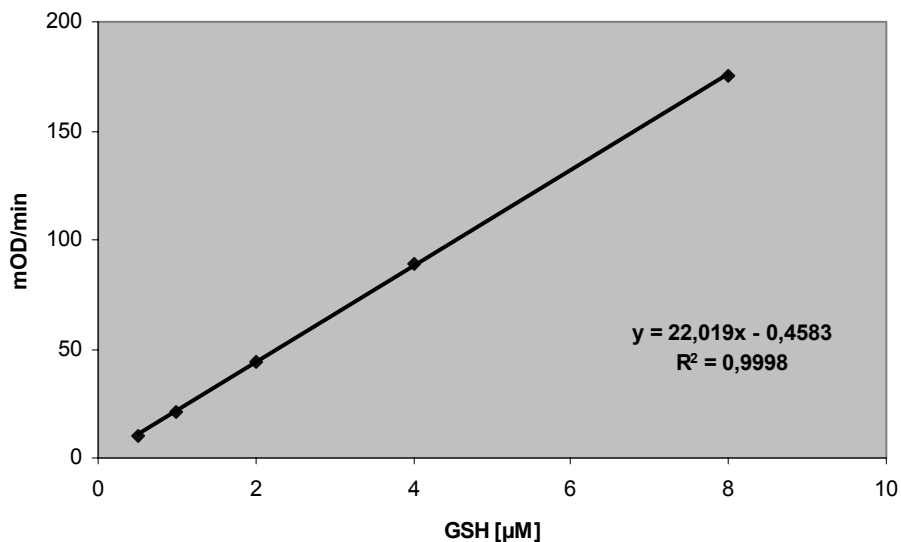
- der nach 8.2.2 erhaltene Überstand kann direkt zur externen GSH-Bestimmung eingesetzt werden.
- 40 µl der GSSG-Standards und des Überstandes werden in je eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Messung erfolgt wie beschrieben.

**9.9.2.2 GSSG-Bestimmung**internes GSSG:

- 100 µl des nach Proteinfällung (siehe 8.3.2.1) erhaltenen Überstandes werden unter dem Abzug zur GSH-Derivatisierung mit 5 µl 2-Vinylpyridin versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.
- 40 µl der GSSG-Standards bzw. des derivatisierten Überstandes werden in je eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert und kinetisch wie beschrieben vermessen.

externes GSSG:

- 100 µl des nach 8.2.2 erhaltenen Überstandes werden unter dem Abzug zur GSH-Derivatisierung mit 5 µl 2-Vinylpyridin versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.
- 40 µl der GSSG-Standards bzw. des derivatisierten Überstandes werden in je eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert und kinetisch wie beschrieben vermessen.

**9.9.3 Externe Kalibrierung****Abbildung A10 : Externe Kalibrierung der GSH-Bestimmung**



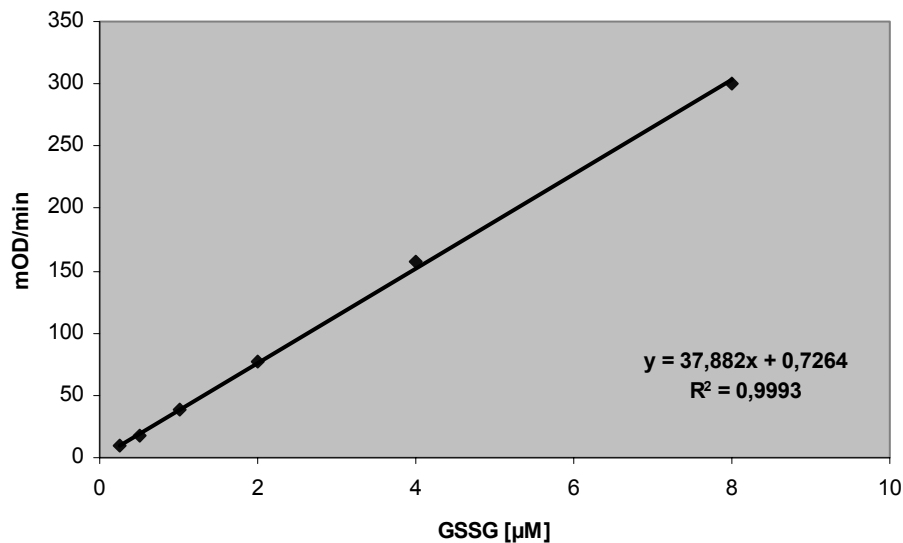


Abbildung A11: externe Kalibrierung der GSSG-Bestimmung

### 9.9.4 Berechnung der GSx-Gehalte

Die Berechnung der GSx-Gehalte erfolgt nach:

$$\text{int. GSSG} = \frac{C_{\text{lin.Regr.}} \cdot \text{VF} \cdot \text{UF(Flasche)} \cdot 0,34 \cdot 0,30 \cdot 1000 \cdot 110}{\text{Pr} \cdot 0,29 \cdot 100}$$

$$\text{int. GSH} = \left( \frac{C_{\text{lin.Regr.}} \cdot \text{VF} \cdot \text{UF(Flasche)} \cdot 0,34 \cdot 0,30 \cdot 1000}{\text{Pr} \cdot 0,29 \cdot 1000} \right) - (2 \cdot \text{int. GSSG})$$

- int. GSSG = interner GSSG-Gehalt [nmol/mg Protein]  
 int. GSH = interner GSH-Gehalt [nmol/mg Protein]  
 $C_{\text{lin.Regr.}}$  = über lineare Regression ermittelter interner GSH-Gehalt [µmol/l], beinhaltet auch den internen GSSG-Gehalt  
 VF = Verdünnungsfaktor der zur Bestimmung eingesetzten Probenlösung = 10  
 UF(Flasche) = Umrechnungsfaktor auf eine Flasche (6000 µl): bei Einsatz von 900 µl Zellsuspension = 6,67  
 bei Einsatz von 700 µl Zellsuspension = 8,57  
 0,34 = Volumen nach der Proteinfällung [ml]  
 0,30 = Aufnahmevolumen des Zellpellets [ml]  
 Pr = Proteingehalt der jeweiligen Flasche [mg/Flasche]  
 0,29 = Restvolumen nach Abnahme von 2 Mal 5 µl zur Proteinbestimmung [ml]  
 1000 = Umrechnungsfaktor von µmol/l auf nmol/l  
 1000 = Umrechnungsfaktor von l auf ml  
 110/100 = Umrechnungsfaktor, da vor Bestimmung 2 Mal 5 µl zur Proteinbestimmung abgenommen wurden  
 2 int. GSSG = Anteil an internem GSSG [nmol/mg Protein] in der internen GSH-Bestimmung

$$\text{ext. GSSG} = \frac{C_{\text{lin.Regr.}} \cdot \text{UF(Flasche)}}{\text{Pr}}$$

$$\text{ext. GSH} = \frac{(C_{\text{lin.Regr.}} - \text{ext. GSSG}) \cdot \text{UF(Flasche)} \cdot 2}{\text{Pr}}$$

- ext. GSSG = externer GSSG-Gehalt [nmol/mg Protein]  
 ext. GSH = externer GSH-Gehalt [nmol/mg Protein]  
 $C_{\text{lin.Regr.}}$  = über lineare Regression ermittelter externer GSH-Gehalt [µmol/l], beinhaltet auch den externen GSSG-Gehalt  
 UF(Flasche) = Umrechnungsfaktor auf eine Flasche (6000 µl)  
 2 = Umrechnung der GSSG-Standards auf GSH: 1 Mol GSSG entspricht 2 Mol GSH  
 Pr = Proteingehalt der jeweiligen Flasche [mg/Flasche]

### 9.9.5 Verfahrenskennndaten für die Gesamtmethode

Tabelle A7: Verfahrenskennndaten der GSx-Bestimmung

	CV	NG	BG
ext. GSH	15,6 %	0,44 µM	1,32 µM
int. GSH	8,7 %		
GSSG	-	0,18 µM	0,54 µM

### 9.10 MDA-Hydrolyse

Die MDA-Hydrolyse erfolgte nach BEHRENS und MADERE (1991).

#### 9.10.1 Reagenzien und Lösungen

<b>Schwefelsäure</b> 1 %-ig	10,2 mL 98 %-ige Schwefelsäure ad 1000 mL dest Wasser
<b>MDA-Stammlösung</b>	220mg Malondialdehyd-bis(diethylacetal) ad 100 mL 1%-ige Schwefelsäure

#### 9.10.2 Durchführung

- MDA-Stammlösung nach 2, 4, und 6 Stunden Reaktionszeit im Dunkeln 1:100 (v:v) mit bidest. Wasserverdünnen
- Absorption photometrisch bei 245 nm messen

#### 9.10.3 Ergebnisse der Messung

Tabelle A8: Überprüfung der MDA-Hydrolyse

	Reaktionszeit 2 h	Reaktionszeit 4 h	Reaktionszeit 6 h
<b>Extinktion [mOD]</b>	1739	1726	1745

### 9.11 TBARS-Bestimmung

Die MDA-Bestimmung als TBARS erfolgte modifiziert nach UCHIYAMA und MIHARA (1978), KNÜPPEL (1995) und HOVING et al. (1992).

#### 9.11.1 Reagenzien und Lösungen

<b>Hank`s Puffer</b> 5,4 mM KCl 0,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 13 mM NaHCO <sub>3</sub> 137 mM NaCl	0,4 g Kaliumchlorid 0.1 g Kaliumdihydrogenphosphat 0.1 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 1,273 g Natriumhydrogencarbonat 8,0 g Natriumchlorid ad 1000 mL bidest. Wasser; mit 2 M Salzsäure pH 7,35 einstellen
<b>BHT-Lösung</b> 2 %-ig	0,4 g HBT ad 20 mL Ethanol abs.
<b>DTBA-Lösung</b> 0,6 %-ig	300 mg DETBA ad 50 mL Natriumhydroxid-Lösung 50 mM

<b>NaOH-Lösung</b> 50 mM	2 g Natriumhydroxid-Plätzchen ad 100 mL dest. Wasser
<b>Phosphorsäure</b> 1 %-ig	1,2 mL 85 %-ige Phosphorsäure ad 100 mL dest. Wasser
<b>Salzsäure (HCl)</b> 2 M	20 ml 37 %ige HCl ad 100 ml bidest. Wasser
<b>Cumolhydroperoxid-Lösung</b> 800 µM	15 µL 80 %-ige Cumolhydroperoxid-Lösung ad 1 mL DMSO
<b>MDA-Stammlösung</b> 60 µM	26,4 mg Malondialdehyd-bis(diethylacetal) ad 200 mL bidest. Wasser; 1:10 mit bidest. Wasser verdünnen
<b>MDA-Standards</b> 1,5 µM 3,0 µM 7,5 µM 15,0 µM 30,0 µM 60,0 µM	50 µL MDA-Stammlösung ad 2 mL bidest. Wasser 100 µL MDA-Stammlösung ad 2 mL bidest. Wasser 250 µL MDA-Stammlösung ad 2 mL bidest. Wasser 500 µL MDA-Stammlösung ad 2 mL bidest. Wasser 1000 µL MDA-Stammlösung ad 2 mL bidest. Wasser 2000 µL MDA-Stammlösung

### 9.11.2 Durchführung

- 60 µL Cumolhydroperoxid-Lösung in die Zellkulturflasche pipettieren
- bei RT 40 Minuten inkubieren
- Herstellung des Zellpellets nach 8.1
- Zellpellet in 180 µL Hank`s Puffer aufnehmen, am Ultraschallhomogenisator homogenisieren
- 20 µL für die Proteinbestimmung abnehmen
- in 2 mL Probengefäße überführen, 10 µL BHT-Lösung und 125 µL DETBA-Lösung hinzugeben; gut durchmischen
- Zugabe von 375 µL 1 %-iger Phosphorsäure; gut durchmischen
- Inkubation im Thermoblock bei 100 °C für 55 Minuten
- Proben auf Eisbad abkühlen
- Farbstoff mit 500 µL 1-Butanol extrahieren, zur besseren Phasentrennung 5 Minuten bei 10000 U/min zentrifugieren
- 200 µL der organischen Phase in Kunststoffküvetten überführen
- 1800 µL 1-Butanol zugeben
- photometrische Messung bei 540 nm gegen den Chemikalienblindwert

### 9.11.3 Externe Kalibrierung

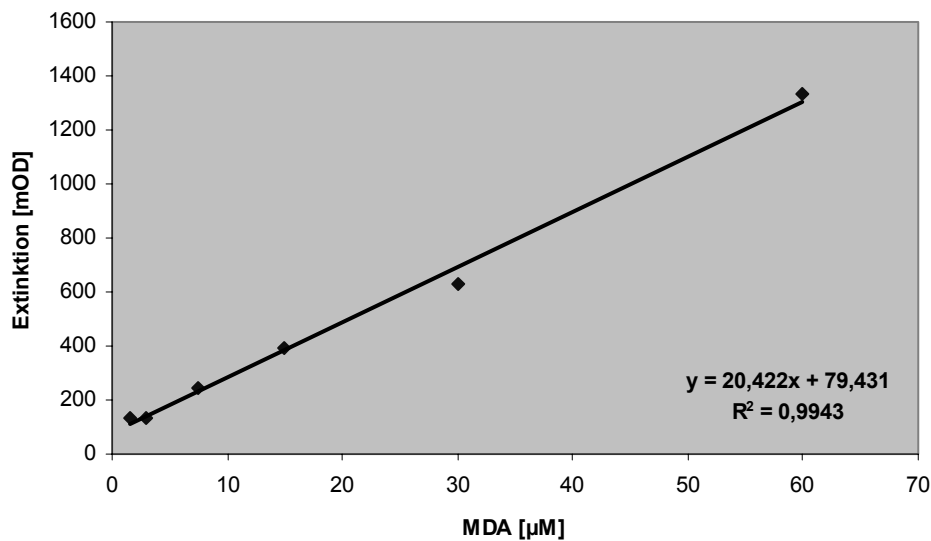


Abbildung A12: Externe Kalibrierung der MDA-Bestimmung

### 9.11.4 Ergebnisse der Messung

**Tabelle A9: Einzelergebnisse des TBARS-Assay.** (n.b. = nicht bestimmbar; Extinktionen der KW und Probe lagen unterhalb der Kalibrierung von 1,5 µM und unterhalb der NG der Methode.

Probe	Extinktion [mOD]	MDA-Gehalt
KW 1	85	n.b.
KW 2	92	n.b.
Inkubation 1	85	n.b.
Inkubation 2	89	n.b.

### 9.11.5 Verfahrenskennndaten für die Gesamtmethode

**Tabelle A10: Verfahrenskennndaten der TBARS-Bestimmung**

CV	NG	BG
9,7 %	5,0 µM	13,1 µM

### 9.12 HPLC-Bestimmung von MDA

Die Bestimmung wurde modifiziert nach KAWAMOTO et al. (1998) und LAZZARINO et al. (1991) durchgeführt.

#### 9.12.1 Reagenzien und Lösungen

PCA 0,6 M	10,05 g 60 %-ige Perchlorsäure ad 100 mL dest. Wasser
Kaliumcarbonat-Lösung 5 M	69,11 g Kaliumcarbonat ad 100 mL dest. Wasser

<b>Eluent A</b> 10 mM TBAB 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 % Acetonitril	3,22 g Tetrabutylammoniumbromid 1,36 g Kaliumdihydrogenphosphat 10 mL Acetonitril ad 1000 ml bidest. Wasser, pH 7 mit 1 M NaOH Membranfiltration 0,22 µM
<b>Eluent B</b> 2,8 mM TBAB 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 30 % Acetonitril	0,9 g Tetrabutylammoniumbromid 13,6 g Kaliumdihydrogenphosphat 300 mL Acetonitril ad 1000 ml bidest. Wasser, pH 7 mit 1 M NaOH Membranfiltration 0,22 µM

### 9.12.2 Durchführung

- Herstellung des Zellpellets nach 8.1
- 6 mL 0,6 M PCA zugeben
- 10 Sekunden am Ultraschallhomogenisator homogenisieren
- 10 Minuten bei 5000 g und RT zentrifugieren, Überstand abdekantieren
- Überstand mit 5 M Kaliumcarbonatlösung auf pH 7 neutralisieren
- Extrakt membranfiltrieren 0,45 µM und Filtrat zur HPLC-Messung direkt einsetzen

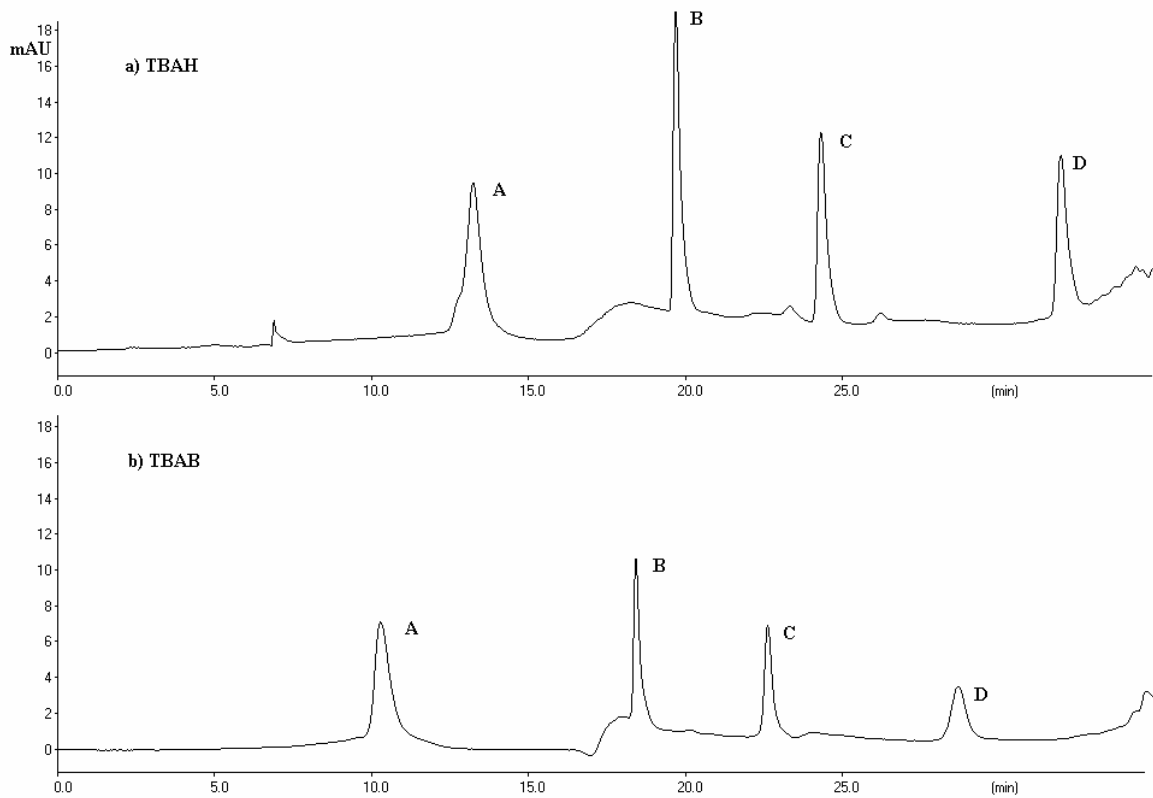
### 9.12.3 HPLC-Bedingungen

#### Geräteparameter:

Pumpe	Merck Hitachi L-6220
Injektor	20 µL Rheodyne Probenschleife
Säule	Nucleosil-120; RP-18; 5 µM; 250 x 4 mm
Detektor	Merck Hitachi L-4000 UVD
Auswertung	Chromstar Software, V4.05, Bruker
Flow	1 mL/min
Detektionswellenlänge	266 nm
Temperatur	RT

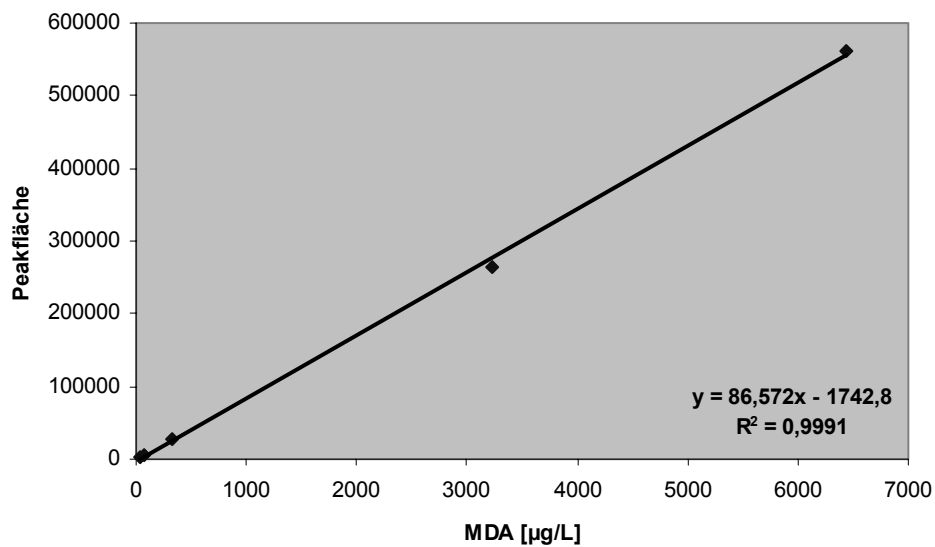
**Tabelle A11: HPLC-Gradient zur MDA-Bestimmung**

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Acetonitril [%]
0	100	0	0
12	100	0	0
14	60	40	0
25	56	44	0
35	0	100	0
40	0	100	0
42	0	50	50
47	0	50	50
49	100	0	0
57	100	0	0



**Abbildung A13: HPLC-Chromatogramm eines Standardgemisches aus MDA (A) und Adenosinphosphaten (B-D).** Oberes Chromatogramm mit TBAH nach LAZARINO et al. (1991); unteres Chromatogramm nach KAWAMOTO et al. (1998).

#### 9.12.4 Externe Kalibrierung



**Abbildung A14: Externe Kalibriergerade der HPLC-Bestimmung MDA**

Die NG und BG wurden zu 25 µg/L bzw. 85 µg/L bestimmt.

### 9.13 LDH-Bestimmung

Die LDH-Bestimmung erfolgte nach der Herstellerangabe der Fa. Sigma, Deisenhofen (Toxkit-007). Im Toxkit-007 waren Substrat-, Färbe-, Enzym- und Lysislösung enthalten (s. 9.13.1).

#### 9.13.1 Reagenzien und Lösungen

<b>PBS</b> 10,0 mM Phosphat-Puffer 2,7 mM KaCl 13,7 mM NaCl	s. 9.1.1
<b>Substratlösung</b>	gebrauchsfertig
<b>Färbelösung</b>	gebrauchsfertig
<b>Enzymlösung</b>	gebrauchsfertig
<b>Lysislösung</b>	gebrauchsfertig
<b>Salzsäure (HCl)</b> 1 M	10 ml 37 %ige HCl ad 100 ml bidest. Wasser
<b>LDH</b> 2500 Units/ 0,6 ml	Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>LDH-Stammlösung</b> 200 mU/ml	4,8 µl LDH ad 100 ml PBS
<b>LDH-Standards</b> 10 mU/ml 50 mU/ml 75 mU/ml 100 mU/ml 150 mU/ml	50 µl LDH-Stammlösung ad 1 ml PBS 250 µl LDH-Stammlösung ad 1 ml PBS 375 µl LDH-Stammlösung ad 1 ml PBS 500 µl LDH-Stammlösung ad 1 ml PBS 750 µl LDH-Stammlösung ad 1 ml PBS vor jeder Messung frisch ansetzen und auf Eis kühlen

#### 9.13.2 Durchführung

- Der nach 7.2.3 erhaltene Überstand wird direkt zur LDH-Bestimmung eingesetzt.
- Es werden je 20 µl Substratlösung, 20 µl Färbelösung und 120 µl der Standards bzw. der Probe in jeweils eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert. Meist ist eine Verdünnung der Probenlösung notwendig. Während bei Kontrollwerten und Positivkontrollen 120 µl eingesetzt werden kann, wird bei stark zytotoxischen Proben eine 1/2- bzw. eine 1/4-Verdünnung und zur Bestimmung der Gesamt-LDH eine 1/10-Verdünnung vorgenommen.
- Als Blindwert werden 120 µl PBS eingesetzt.
- Nach Zugabe von 20 µl Enzymlösung erfolgt eine 20minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur.
- Durch Zugabe von jeweils 20 µl 1 M Salzsäure wird die Reaktion gestoppt.
- Der gebildete Farbkomplex wird bei 490 nm als Endpunkt photometrisch gegen den Blindwert vermessen.
- Aus dem jeweiligen Zellpellet erfolgt die Proteinbestimmung nach 7.6.

### 9.13.3 Externe Kalibrierung

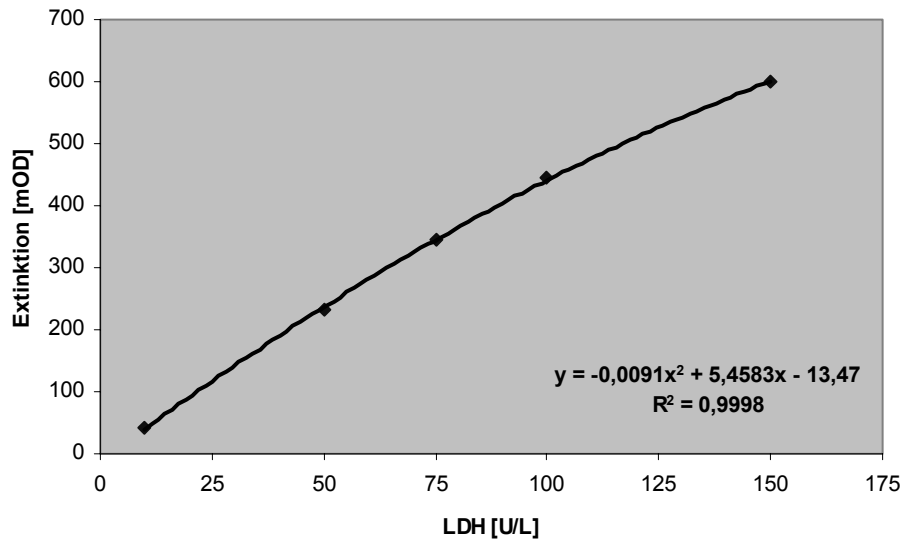


Abbildung A14: Externe Kalibrierung der LDH-Bestimmung

### 9.13.4 Berechnung der LDH-Gehalte

Die Berechnung der LDH-Gehalte erfolgt nach:

$$\text{LDH} = \frac{C_{\text{lin.Regr.}} \cdot \text{VF} \cdot \text{UF(Flasche)}}{\text{Pr}}$$

LDH = LDH-Gehalt [mU/mg Protein]  
 $C_{\text{lin.Regr.}}$  = über lineare Regression ermittelter LDH-Gehalt [mU/ml]  
 VF = Verdünnungsfaktor der zur Bestimmung eingesetzten Probenlösung, bei der Gesamt-LDH-Bestimmung = 10  
 UF(Flasche) = Umrechnungsfaktor auf eine Flasche (6000 µl): bei Einsatz von 900 µl Zellsuspension = 6,67  
 bei Einsatz von 700 µl Zellsuspension = 8,57  
 Pr = Proteingehalt der jeweiligen Flasche [mg/Flasche]

### 9.13.5 Verfahrenskenndaten für die Gesamtmethode

Tabelle A12: Verfahrenskenndaten der LDH-Bestimmung

CV	NG	BG
33,3 %	13,0 mU/ml	38,9 mU/ml

## 9.14 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976).

### 9.14.1 Reagenzien und Lösungen

#### PBS

10,0 mM Phosphat-Puffer  
 2,7 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 13,7 mM NaCl

s. 9.1.1



<b>Lösung 1</b>	35 mg Coomassie Serva Blue G 10 ml 96%-iges Ethanol 20 ml 85%-ige <i>ortho</i> -Phosphorsäure
<b>Lösung 2</b> bei RT im Dunkeln lagern	3 ml Lösung 1 3 ml 85%-ige <i>ortho</i> -Phosphorsäure 1,5 ml 96%-iges Ethanol 42,5 ml bidest. Wasser
<b>BSA-Stammlösung</b> 400 mg/l	20 mg Rinderserumalbumin ad. 50 ml bidest. Wasser
<b>BSA-Standards</b> 10 mg/l 20 mg/l 50 mg/l 100 mg/l 200 mg/l	250 µl BSA-Stammlösung ad 10 ml bidest. Wasser 500 µl BSA-Stammlösung ad 10 ml bidest. Wasser 1250 µl BSA-Stammlösung ad 10 ml bidest. Wasser 2500 µl BSA-Stammlösung ad 10 ml bidest. Wasser 5000 µl BSA-Stammlösung ad 10 ml bidest. Wasser

### 9.14.2 Durchführung

- Die nach 7.3.3 bzw. 7.4.3 erhaltene Zellsuspension wird nach Verdünnung zur Proteinbestimmung eingesetzt.
- Es werden 55 µl BSA-Standards bzw. 5 µl Zellsuspension und 50 µl bidest. in jeweils eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 µl Lösung 2 versetzt.
- Als Blindwert werden 55 µl bidest. Wasser eingesetzt.
- Der gebildete Farbkomplex wird nach 5minütigem Stehen bei Raumtemperatur bei 590 nm als Endpunkt photometrisch gegen den Blindwert vermessen.

### 9.14.3 Externe Kalibrierung

Für die Proteinbestimmung ergibt sich folgende externe Kalibrierung:

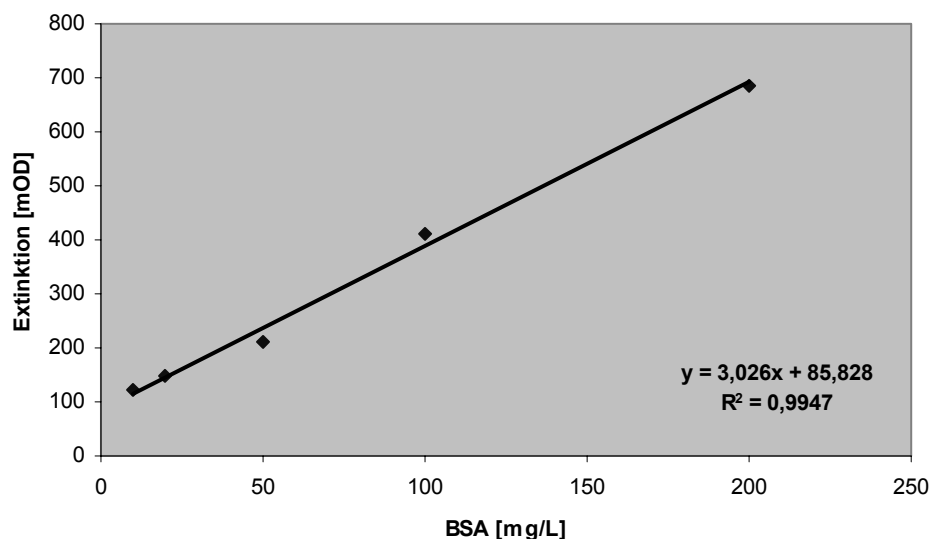


Abbildung A16: externe Kalibrierung der Proteinbestimmung

### 9.14.4 Berechnung der Proteingehalte

Die Berechnung der Proteingehalte erfolgt nach:

$$\text{Protein} = \frac{\text{Clin. Re gr.} \cdot \text{VF} \cdot \text{UF(Flasche)} \cdot 0.3}{1000}$$

Protein	= Proteingehalt [mg/Flasche]
C <sub>lin.Regr.</sub>	= über lineare Regression ermittelter Proteingehalt [mg/l]
VF	= Verdünnungsfaktor der zur Bestimmung eingesetzten Zellsuspension = 11
UF(Flasche)	= Umrechnungsfaktor auf eine Flasche (6000 µl):
0,3	= Aufnahmevervolumen des Zellpellets [ml]
1000	= Umrechnungsfaktor von l auf ml

### 9.14.5 Verfahrenskennndaten für die Gesamtmethode

**Tabelle A13: Verfahrenskennndaten der Proteinbestimmung**

CV	NG	BG
7,3 %	13,7 mg/l	41,2 mg/l

## 9.15 Extraktionsvergleich Ultraschall und Soxhlet

### 9.15.1 Reagenzien und Lösungen

<b>PAK-Standardgemisch</b> 80 mg/L	je 8 mg 9-Hydroxyfluoren, Anthrachinon, 1-Hydroxypyren und 2-Methylantrachinon ad 100 mL Methanol
<b>TFA</b> 0,1 %-ig	1 mL Trifluoressigsäure ad 1000 mL bidest. Wasser
<b>Anionenaustauscher</b> stark basisch	Chromabond SB (Macherey & Nagel, Düren)
<b>Kieselgel</b> 10 % deaktiviert	Kieselgel, Korngröße 40 µm (Baker, Groß-Gerau) 24 h bei 180 °C vollständig aktivieren mit 10 % bidest. Wasser deaktivieren (2h konditionieren)
<b>Natriumsulfat</b> Getrocknet	Natriumsulfat 24 h bei 100 °C trocknen

### 9.15.2 Arbeitsvorschrift Ultraschallextraktion

- 10 g Sediment in 100 mL-Probengefäß mit 1 mL PAK Standardgemisch dotieren
- 2 Minuten am Ultraschallhomogenisator homogenisieren
- Sediment mit 10 g Natriumsulfat vermengen und in Mörser gut verrühren
- ins Probengefäß überführen und 30 mL Dichlormethan sowie 1 mL Heptan zugeben
- 30 Minuten bei max. Schwingung (400/Minute) schütteln und anschließend 30 Minuten im Ultraschallbad extrahieren
- Zentrifugation für 20 Minuten bei 6000 U/min und 4°C; Überstand in 100 mL-Rundkolben über Filterpapier dekantieren
- Extraktion zweimal wiederholen
- Dichlormethan bei 700 mbar und 60°C entfernen
- Heptanphase in 5 mL-Meßkolben überführen, unter Spülen des 100 mL-Rundkolbens mit Heptan bis zur Marke auffüllen
- Heptanextrakt zur Festphasenextraktion (8.14.4) nach MEYER, 1999 einsetzen.

### 9.15.3 Arbeitsvorschrift Soxhletextraktion

- 10 g Sediment in 100 mL-Probengefäß mit 1 mL PAK Standardgemisch dotieren
- 2 Minuten am Ultraschallhomogenisator homogenisieren
- Sediment mit 10 g Natriumsulfat vermengen und in Mörser gut verrühren
- Sediment-Natriumsulfat-Gemisch in die Glasfritte der 200 mL-Soxhletapparatur überführen und oben mit Filterpapier abdecken
- Füllen des Extraktionsmittels (210 mL Dichlormethan/Heptan, 21/1; v/v) und 8 Stunden mit 5-6 Zyklen pro Stunde extrahieren
- Dichlormethan bei 700 mbar und 60°C entfernen
- Heptanphase in 5 mL-Meßkolben überführen, unter Spülen des 100 mL-Rundkolbens mit Heptan bis zur Marke auffüllen
- Heptanextrakt zur Festphasenextraktion (8.14.4) nach MEYER, 1999 einsetzen

### 9.15.4 Festphasenextraktion nach MEYER (1999)

- In einer 8-mL-Glastrennsäule werden unten 0,7 g Anionentauscher und oben 2 g Kieselgel zwischen drei PTFE-Fritten fixiert
- Säule mit 12 mL n-Hexan equilibrieren
- Aufgeben des 5 mL-Heptanextraktes (8.14.1 bzw. 8.14.2)
- Die ersten 4 mL verwerfen (Totvolumen)
- PAK, S-PAK und O-PAK mit 3x1mL n-Hexan Spülen des Probengefäßes), 12 mL n-Hexan/Dichlormethan (85/15, v/v) und 2 mL Dichlormethan eluieren
- Organische Lösungsmittel durch leichten Stickstoffstrom entfernen und Rückstand in 1 mL Acetonitril/0,1 %-ig TFA (v/v) aufnehmen.
- Nach Membranfiltration (0,45 µm) direkt zur HPLC-Bestimmung einsetzen

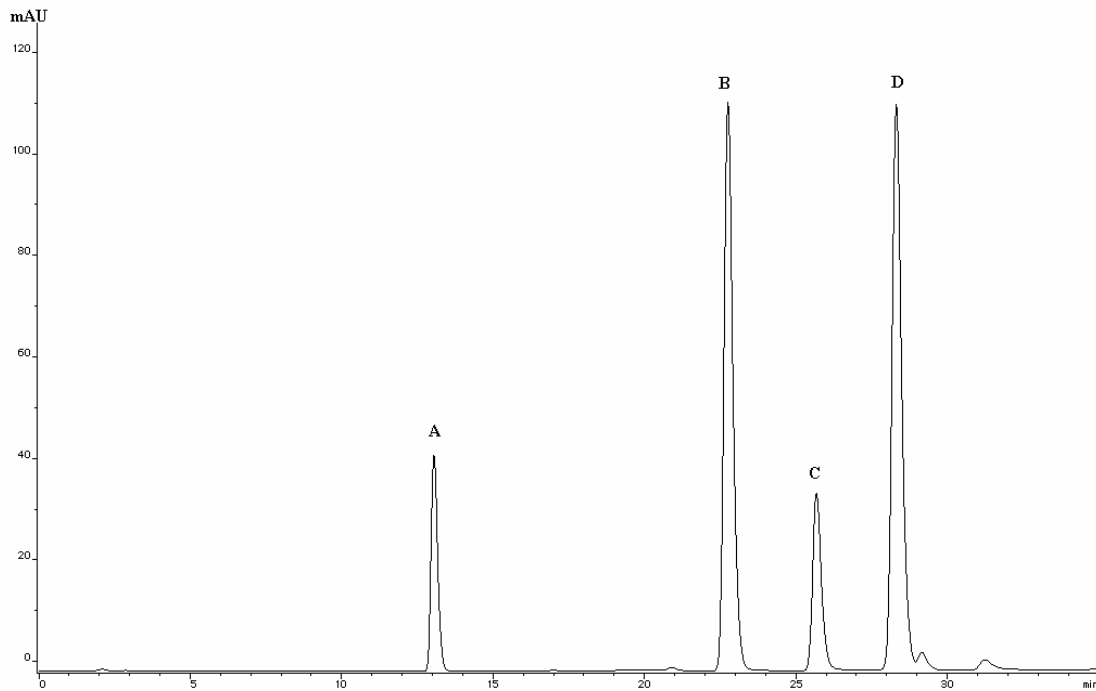
### 9.15.5 HPLC-Bedingungen

#### Geräteparameter:

Pumpe	BinPump G1312A
Autosampler	ALS G1313A
Säule	PAK-III; RP-18; 5 µM; 250 x 4 mm
Detektor	G1315B DAD
Auswertung	ChemStation, Version 8.03, Agilent Technologies
Flow	1 mL/min
Detektionswellenlänge	254 nm
Temperatur	RT

**Tabelle A14: HPLC-Gradient zur Bestimmung der PAK-Metabolite**

Zeit [min]	Acetonitril [%]	TFA [%]
0	30	70
1	30	70
10	45	55
30	70	30
35	80	20
45	80	20
50	30	70
60	30	70



**Abbildung A17: Standardchromatogramm der Dotierlösung zum Extraktionsvergleich.** A: 9-Hydroxyfluoren, B: 1-Hydroxypyren, C: Anthrachinon, D: 3-Methylantrachinon

### 9.15.6 Messdaten des Extraktionsvergleiches

**Tabelle A15: Vergleich der Wiederfindungsraten der vier untersuchten Analyte für die Ultraschallextraktion und die Soxhletextraktion**

Ultraschall-extraktion	9-Hydroxy-flouren	Anthrachinon	1-Hydroxypyren	2-Methyl-anthrachinon
1	42 %	48 %	64 %	51 %
2	73 %	79 %	91 %	87 %
3	87 %	95 %	103 %	98 %
<b>Soxhlet</b>	93 %	98 %	95 %	96 %

### 9.15.7 Extraktion der Sedimente Elbe und Industriehafen Hamburg

Die Extraktion erfolgte nach der Ultraschallextraktion analog 9.15.2, wobei der Extraktionsvorgang insgesamt dreimal durchgeführt wurde. Statt des Keepers Heptan wurde DMSO eingesetzt. Nach dem Entfernen des Extraktionsmittels Dichlormethan wurde der DMSO-Rückstand unter leichtem Stickstoffstrom behandelt, um letzte Reste des Dichlormethans zu entfernen. Parallel zur Sedimentextraktion wurde ein BW (gesamte Extraktion ohne Sediment) hergestellt. Die DMSO-Extrakte wurden direkt (1 %-ig) zur Inkubation der EPC-Zellen (9.2) eingesetzt.

## 9.16 Einzelergebnisse der durchgeführten Untersuchungen

**Tabelle A16: Einzelmesswerte zur Toxizitätsprüfung des Lösungsvermittlers DMSO.** Die Bestimmung der DMSO-Toxizität der direkten Inkubation wurde als Einfachbestimmung durchgeführt.

Probe direkt, 24h	Protein [mg/Flasche]	Probe indirekt, 2 h	Protein [mg/Flasche]	LDH-Freisetzung [%]
KW	1,50	KW	2,47	0,4
		CV	11,4 %	35,9 %
0,5 %	1,63	1,0 %	2,54	1,38
		CV	4,1 %	63,5 %
1,0 %	1,10	2,0 %	2,73	3,1
		CV	6,8 %	13,2 %
2,5 %	0,89	3,0 %	2,66	1,3
		CV	10,1 %	12,9 %
5,0 %	0,95	5,0 %	2,36	2,3
		CV	3,1 %	23,1 %
10,0 %	0,83	10,0 %	1,97	6,9
		CV	2,9 %	6,0 %

**Tabelle A17: Einzelmesswerte der Inkubationsreihe Menadion (Sensitivitätsprüfung)**

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSH int [nmol/mg Protein]	GSSG int [nmol/mg Protein]	GSH ext [nmol/mg Protein]	GSSG ext [nmol/mg Protein]	LDH Freisetzung [%]
KW	2,70	77,77	0,00	7,04	0,00	12,0
CV	1,3 %	0,2 %	-	3,9 %	-	5,7 %
0,25 µM	2,71	73,77	0,00	9,33	0,21	10,2
CV	7,0 %	6,0 %	-	21,8 %	19,1 %	17,3 %
1 µM	2,78	69,47	0,00	9,88	0,88	12,8
CV	1,3 %	5,0 %	-	8,4 %	6,1 %	37,9 %
5 µM	2,76	69,02	0,00	8,35	3,62	10,6
CV	5,0 %	2,5 %	-	20,8 %	6,9 %	36,8 %
10 µM	2,78	56,06	0,14	12,18	5,78	16,8
CV	4,0 %	5,8 %	54,4 %	0,8 %	1,6 %	15,4 %
25 µM	2,73	32,91	1,18	7,83	7,67	18,6
CV	1,4 %	6,9 %	0,8 %	13,2 %	13,4 %	25,8 %
100 µM	3,18	31,13	4,68	5,97	5,46	11,1
CV	24,1 %	11,3 %	19,7 %	8,1 %	7,0 %	21,3 %

**Tabelle A18: Einzelmesswerte der Inkubationsreihe Paracetamol (Sensitivitätsprüfung)**

	Protein [mg/Flasche]	GSH int [% GSx]	GSH ext. [% GSx]
KW	4,36	97,0	3,0
CV	7,2 %	3,9 %	4,6 %
1 mM	4,23	85,7	8,1
CV	1,3 %	5,0 %	1,3 %
2,5 mM	4,05	77,2	14,4
CV	2,1 %	6,4 %	25,2 %
5 mM	3,50	79,0	21,2
CV	4,5 %	7,7 %	3,2 %
7,5 mM	3,85	59,9	21,3
CV	0,1 %	17,7 %	9,8 %
10 mM	3,84	59,1	19,7
CV	6,6 %	12,2 %	6,6 %

**Tabelle A19: Einzelmesswerte zur Überprüfung der Lösungsmittel-Toxizität (LDH-Freisetzung und Proteinabnahme); <sup>a</sup>(CV [%] identisch, deshalb nicht doppelt aufgeführt) Es wurde für die Lösungsmittel keine GSSG-Bildung gemessen, weshalb auf die Angabe der Messwerte zum GSx der EPC-Zellen verzichtet wurde**

Probe	Protein [mg/Flasche] <sup>a</sup>	Proteinabnahme [%] <sup>a</sup>	LDH-Freisetzung [%]
KW	3,86	0,0	1,0
CV	1,3 %		8,0 %
MD	3,91	-1,1	5,7
CV	0,3 %		18,7 %
Aceton 0,1 %	3,96	-2,4	3,0
CV	2,1 %		58,8 %
Aceton 0,01 %	3,77	2,6	7,1
CV	4,1 %		39,6 %
Aceton 0,001 %	3,69	4,5	9,4
CV	1,7 %		0,1 %
Dichlormethan 0,1 %	2,16	44,1	46,2
CV	41,9 %		36,6 %
Dichlormethan 0,01 %	3,77	2,5	4,8
CV	0,4 %		41,3 %
Dichlormethan 0,001 %	3,59	7,0	3,3
CV	4,9 %		48,2 %
Ethylacetat 0,1 %	3,68	4,9	3,8
CV	7,9 %		25,3 %
Ethylacetat 0,01 %	3,65	5,6	2,2
CV	0,3 %		5,2 %
Ethylacetat 0,001 %	3,51	9,2	4,3
CV	1,4 %		33,8 %
n-Hexan 0,1 %	2,10	45,7	43,4
CV	3,5 %		14,3 %
n-Hexan 0,01 %	3,06	20,9	23,1
CV	11,0 %		4,2 %
n-Hexan 0,001 %	3,54	8,3	8,8
CV	2,8 %		22,1 %
Methanol 0,1 %	3,63	6,1	1,9
CV	0,4 %		16,5 %
Methanol 0,01 %	3,76	2,8	1,7
CV	0,4 %		79,9 %
Methanol 0,001 %	3,60	6,9	1,9
CV	2,1 %		48,3 %
Cyclo-Hexan 0,1 %	1,77	54,1	40,4
CV	11,7 %		3,0 %
cyclo-Hexan 0,01 %	2,31	40,1	31,3
CV	20,9 %		15,9 %
cyclo-Hexan 0,001 %	3,52	9,0	5,0
CV	0,4 %		29,1 %

**Tabelle A20: Messergebnisse der direkten Inkubationsreihe 0,01-3,0 mM Wasserstoffperoxid (24h)**

Probe	Protein [mg /Flasche]	KAT [U/mg Protein]
KW	6,17	2,92
CV	10,9 %	7,7 %
0,01 mM	5,97	3,05
CV	7,2 %	20,3 %
0,05 mM	6,21	4,32
CV	9,3 %	7,1 %
0,1 mM	5,51	5,45
CV	4,6 %	6,1 %
0,3 mM	7,19	5,06
CV	9,2 %	3,5 %
1,0 mM	6,39	4,91
CV	11,8 %	2,2 %
3,0 mM	5,83	3,36
CV	26,1 %	8,0 %

**Tabelle A21: Messwerte zur KAT-Aktivität und LDH-Freisetzung der Zeitreaktion 0,1 mM Wasserstoffperoxid (0-24h).** Die LDH-Freisetzung wurde aus methodischen Gründen erst nach 1h Inkubationszeit bestimmt

KW	KAT [U/mg Protein]	LDH-Freisetzung [%]	Probe 0,1 mM H2O2	KAT [U/mg Protein]	LDH-Freisetzung [%]
0 h	10,7	-	0 h	11,9	-
CV	12,9 %	-	CV	0,5 %	-
0,5 h	12,6	-	0,5 h	10,2	-
CV	2,1 %	-	CV	19,6 %	-
1 h	11,2	1,69	1 h	11,9	2,10
CV	3,2 %	33,5 %	CV	5,0 %	10,2 %
2 h	11,2	2,29	2 h	10,7	2,81
CV	4,9 %	2,2 %	CV	5,4 %	9,9 %
4 h	14,9	2,92	4 h	18,9	5,19
CV	6,7 %	7,2 %	CV	33,0 %	1,0 %
7 h	15,3	1,98	7 h	21,3	2,93
CV	14,8 %	8,0 %	CV	9,2 %	32,2 %
17 h	15,1	10,37	17 h	21,9	8,67
CV	1,1 %	1,7 %	CV	15,2 %	12,5 %
24 h	18,2	28,27	24 h	19,8	17,35
CV	13,0 %	11,7 %	CV	7,6 %	4,3 %

**Tabelle A22: Messergebnisse zur KAT-Aktivität der DW-Kurve Menadion (1-500 µM).**

Probe	Protein [mg/Flasche]	KAT [U/mg Protein]
KW 1	1,15	14,2
CV	10,6 %	21,6 %
DMSO 0,5 %	1,02	15,8
CV	0,3 %	11,1 %
1 µM	1,11	13,6
CV	11,6 %	9,8 %
KW 2	1,58	8,4
CV	2,8 %	15,3 %
5 µM	1,51	11,6
CV	1,1 %	25,0 %
25 µM	1,48	16,1
CV	5,1 %	3,9 %
KW 3	1,39	6,7
CV	6,4 %	18,8 %
100 µM	1,11	11,3
CV	15,5 %	6,3 %
500 µM	0,73	0,2
CV	6,3 %	5,3 %

**Tabelle A23a: Einzelmesswerte der Inkubationsreihe MD (40 Minuten)**

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSH int [nmol/mg Protein]	GSSG int [nmol/mg Protein]	GSH ext [nmol/mg Protein]	GSSG ext [nmol/mg Protein]	LDH Freisetzung [%]
KW	2,32	92,26	0,00	8,31	0,00	8,2
CV	7,5 %	1,8 %	-	6,7 %	-	10,1 %
0,25 µM	2,35	90,17	0,00	5,67	0,00	10,1
CV	3,8 %	2,3 %	-	4,3 %	-	8,7 %
1 µM	2,27	91,83	0,00	7,12	0,00	10,8
CV	2,9 %	0,7 %	-	11,5 %	-	23,5 %
5 µM	2,18	86,02	0,00	8,27	0,31	7,6
CV	8,3 %	8,3 %	-	9,9 %	17,2 %	18,4 %
10 µM	2,38	80,31	0,00	10,08	1,92	12,3
CV	0,7 %	6,0 %	-	3,7 %	8,3 %	31,3 %
25 µM	2,40	63,53	0,37	8,87	4,38	14,5
CV	11,23 %	4,2 %	22,3 %	12,6 %	2,7 %	29,2 %
100 µM	2,22	57,80	2,18	9,21	5,27	13,3
CV	3,5 %	5,5 %	17,5 %	8,3 %	8,9 %	15,9 %

Tabelle A23b: Einzelmesswerte der Inkubationsreihe MD (120 Minuten)

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSH int [nmol/mg Protein]	GSSG int [nmol/mg Protein]	GSH ext [nmol/mg Protein]	GSSG ext [nmol/mg Protein]	LDH Freisetzung [%]
KW	2,70	77,77	0,00	7,04	0,00	12,0
CV	1,3 %	0,2 %	-	3,9 %	-	5,7 %
0,25 µM	2,71	73,77	0,00	9,33	0,21	10,2
CV	7,0 %	6,0 %	-	21,8 %	19,1 %	17,3 %
1 µM	2,78	69,47	0,00	9,88	0,88	12,8
CV	1,3 %	5,0 %	-	8,4 %	6,1 %	37,9 %
5 µM	2,76	69,02	0,00	8,35	3,62	10,6
CV	5,0 %	2,5 %	-	20,8 %	6,9 %	36,8 %
10 µM	2,78	56,06	0,14	12,18	5,78	16,8
CV	4,0 %	5,8 %	54,4 %	0,8 %	1,6 %	15,4 %
25 µM	2,73	32,91	1,18	7,83	7,67	18,6
CV	1,4 %	6,9 %	0,8 %	13,2 %	13,4 %	25,8 %
100 µM	3,18	31,13	4,68	5,97	5,46	11,1
CV	24,1 %	11,3 %	19,7 %	8,1 %	7,0 %	21,3 %

Tabelle A23c: Einzelmesswerte der Inkubationsreihe MD (240 Minuten)

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSH int [nmol/mg Protein]	GSSG int [nmol/mg Protein]	GSH ext [nmol/mg Protein]	GSSG ext [nmol/mg Protein]	LDH Freisetzung [%]
KW	2,84	83,14	0	9,33	0	9,3
CV	3,7 %	7,2 %	-	5,3 %	-	36,5 %
0,25 µM	2,75	85,01	0	11,21	0,93	12,5
CV	2,1 %	2,7 %	-	3,1 %	13,7 %	18,4 %
1 µM	2,63	80,29	0	12,83	2,35	13,8
CV	6,9 %	5,3 %	-	6,5 %	17,5 %	22,2 %
5 µM	2,78	71,38	0,21	10,53	4,75	10,2
CV	8,4 %	10,2 %	18,0 %	7,3 %	9,3 %	1,8 %
10 µM	2,65	58,21	0,75	9,63	6,32	16,4
CV	5,0 %	7,9 %	9,3 %	1,5 %	1,8 %	27,3 %
25 µM	2,18	30,65	1,35	9,02	8,19	18,3
CV	4,2 %	8,0 %	11,2 %	27,3 %	7,2 %	43,8 %
100 µM	1,92	22,92	3,89	7,28	6,98	25,3
CV	12,3 %	2,3 %	3,7 %	12,3 %	5,0 %	17,9 %

Tabelle A24a: Einzelmessergebnisse der MD-Inkubation

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSH int [nmol/mg Protein]	GSSG int [nmol/mg Protein]	GSH ext [nmol/mg Protein]	GSSG ext [nmol/mg Protein]	LDH Freisetzung [%]
KW 1	1,97	72,58	0	8,43	0	2,65
CV	10,2 %	12,9 %	-	16,0 %	-	19,2 %
1 µM	2,12	66,57	0,09	13,34	0,39	2,51
CV	6,5 %	7,8 %	65,7 %	21,5 %	13,9 %	31,4 %
5 µM	1,95	63,87	0,40	15,35	2,26	2,12
CV	8,1 %	11,7 %	6,4 %	12,2 %	24,6 %	39,8 %
10 µM	1,83	60,86	0,57	10,64	4,61	2,38
CV	5,2 %	2,4 %	5,2 %	4,8 %	3,0 %	19,6 %
KW 2	1,94	90,4	0	8,48	0	2,16
CV	14,9 %	12,1 %	-	16,4 %	-	16,1 %
25 µM	2,36	52,83	1,69	7,14	7,11	1,85
CV	0,6 %	6,8 %	0,6 %	0,2 %	2,7 %	21,3 %
50 µM	2,23	40,83	2,81	7,36	7,32	2,17
CV	0,3 %	0,8 %	0,8 %	15,8 %	2,0 %	29,3 %
100 µM	1,93	24,88	3,95	9,06	6,31	2,03
CV	8,4 %	14,5 %	14,5 %	17,4 %	3,0 %	6,1 %



Tabelle A24b: Einzelmessergebnisse der Kupfer(II)-Inkubation

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSH int [nmol/mg Protein]	GSSG int [nmol/mg Protein]	GSH ext [nmol/mg Protein]	GSSG ext [nmol/mg Protein]	LDH Freisetzung [%]
KW 1	2,32	59,07	0	3,63	0	2,00
CV	11,1 %	10,5 %	-	31,9 %	-	16,1 &
MD 1	2,28	29,02	0,90	11,94	6,54	2,06
CV	6,7 %	13,6 %	15,7 %	50,2 %	18,8 %	12,3 %
1 $\mu$ M	2,29	51,39	0,08	1,53	0,89	1,90
CV	1,3 %	6,6 %	17,7 %	1,5 %	24,7 %	18,6 %
10 $\mu$ M	2,30	41,41	0,08	4,95	3,64	1,21
CV	1,0 %	15,6 %	13,2 %	5,0 %	1,8 %	3,5 %
KW 2	1,96	54,01	0	3,51	0	2,20
CV	1,1 %	22,2 %	-	13,9 %	-	36,1 %
MD 2	2,13	27,37	1,19	6,75	5,32	1,68
CV	15,4 %	1,3 %	1,6 %	1,7 %	7,4 %	7,7 %
50 $\mu$ M	0,99	28,87	0,25	17,14	8,80	2,12
CV	4,7 %	4,5 %	26,6 %	18,4 %	1,8 %	37,8 %
100 $\mu$ M	0,66	27,19	2,18	25,36	8,84	2,72
CV	2,8 %	16,9 %	10,4 %	3,4 %	5,2 %	0,3 %
KW 3	1,76	59,02	0	5,35	0	3,05
CV	13,4 %	12,2 %	-	26,3 %	-	26,3 %
MD 3	2,26	25,13	0,70	6,56	5,14	1,71
CV	0,4 %	6,0 %	0,4 %	4,5 %	2,0 %	30,3 %
200 $\mu$ M	1,14	12,50	1,51	17,72	10,47	1,61
CV	1,5 %	5,0 %	19,5 %	1,4 %	7,2 %	25,9 %

Tabelle A24c: Einzelmessergebnisse der Diamid-Inkubation

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSH int [nmol/mg Protein]	GSSG int [nmol/mg Protein]	GSH ext [nmol/mg Protein]	GSSG ext [nmol/mg Protein]	LDH Freisetzung [%]
KW 1	2,94	38,78	0	1,87	0	1,35
CV	7,4 %	2,1 %	-	30,9 %	-	27,8 &
MD 1	3,30	17,86	0,50	5,09	3,58	1,41
CV	16,0 %	3,8 %	1,5 %	11,7 %	11,8 %	12,6 %
1 $\mu$ M	3,06	33,72	0,07	2,63	0,32	1,79
CV	4,9 %	3,5 %	33,9 %	13,8 %	7,4 %	13,9 %
10 $\mu$ M	3,43	33,11	0,07	2,55	1,54	1,18
CV	0,4 %	3,6 %	10,5 %	9,4 %	4,5 %	18,2 %
KW 2	1,60	56,87	0	3,36	0	2,32
CV	6,9 %	2,6 %	-	14,7 %	-	20,6 %
MD 2	1,97	24,78	0,86	7,27	4,52	1,90
CV	1,6 %	14,5 %	4,5 %	8,6 %	9,9 %	3,3 %
50 $\mu$ M	2,72	47,45	0,06	4,69	3,91	1,65
CV	9,1 %	8,0 %	10,7 %	4,5 %	8,7 %	8,5 %
100 $\mu$ M	1,55	45,09	0,24	10,23	8,84	4,24
CV	10,4 %	3,1 %	2,8 %	12,7 %	4,2 %	9,3 %
KW 3	1,76	59,02	0	5,35	0	5,25
CV	13,4 %	12,2 %	-	26,3 %	-	26,3 %
MD 3	2,26	25,13	0,70	6,56	5,14	2,94
CV	0,4 %	6,0 %	0,4 %	4,5 %	2,0 %	30,3 %
200 $\mu$ M	2,12	6,88	0,74	9,54	8,69	1,50
CV	2,6 %	6,0 %	8,7 %	0,3 %	5,7 %	26,9 %

Tabelle A25: Einzelmesswerte der GSSG-Bildung der Positivkontrolle 25 $\mu$ M MD für vier aufeinander folgende Zellgenerationen (A-D)

Probe	GSSG [nmol/mg Protein]	Probe	GSSG [nmol/mg Protein]
A1	5,28	B7	9,62
A2	5,61	B8	12,17
A3	5,42	B9	10,3
A4	5,02	C1	7,44
A5	6,48	C2	6,51
A6	6,63	C3	5,84
A7	3,73	C4	4,08
A8	2,83	C5	5,38
A9	7,34	D1	4,55
A10	4,58	D2	5,02
B1	7,58	D3	4,70
B2	9,09	D4	2,99
B3	5,52	D5	2,83
B4	4,44	D6	3,32
B5	5,89	D7	3,75
B6	5,30	D8	3,34

**Tabelle A26: Einzelmesswerte zur Überprüfung der Eignung der MÄ-Transformation an den Proben GPC-NF ISIS-3 (A) und HPLC-F4 ISIS-2 (B).**

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSSG [nmol /mg Protein]	Probe	Protein [mg/Flasche]	GSSG [nmol /mg Protein]
KW	3,60	0	KW	4,84	0
CV	1,1 %	-	CV	0,4 %	-
MD	3,25	5,3	MD	4,40	3,7
CV	0,2 %	11,8 %	CV	7,6 %	4,6 %
GPC-NF	3,32	6,4	HPLC-F4	4,41	1,7
CV	1,0 %	3,0 %	CV	0,5 %	7,6 %
KW	2,92	0	KW	1,54	0
CV	3,1 %	-	CV	1,5 %	-
MD	2,59	7,3	MD	1,62	12,2
CV	10,7 %	10,1 %	CV	5,9 %	12,4 %
GPC-NF	2,88	9,1	HPLC-F4	1,24	8,0
CV	21,0 %	29,1 %	CV	6,3 %	6,9 %
KW	1,65	0	KW	1,65	0
CV	6,1 %	-	CV	6,1 %	-
MD	1,53	10,1	MD	1,53	10,1
CV	12,6 %	14,5 %	CV	12,6 %	14,5 %
GPC-NF	1,48	13,4	HPLC-F4	1,39	4,7
CV	11,2 %	7,8 %	CV	7,2 %	11,7 %

**Tabelle A27: Messergebnisse des „knock-out“ Versuches**

Probe	SOD [U/mg Protein]	KAT [U/mg Protein]	GR mU/mg Protein]	GSx [nmol/mg Protein]
KW	2,69	3,15	406,9	64,9
CV	7,8 %	16,5 %	11,5 %	11,5 %
DETCA	1,88	2,78	345,9	n.b.
CV	9,4 %	16,5 %	7,0 %	-
AMT	2,73	0,88	412,1	62,2
CV	12,2 %	16,5 %	24,2 %	25,6 %
BCNU	2,90	2,56	122,8	59,9
CV	0,1 %	16,5 %	15,5 %	5,1 %
DC	2,42	4,01	400,2	85,9
CV	5,8 %	16,5 %	10,5 %	7,8 %
BSO	2,43	1,75	440,2	49,0
CV	16,2 %	16,5 %	2,4 %	3,4 %

**Tabelle A28: Ergebnisse der GSSG-Bildung durch 25 µM MD nach Enzyminhibierung**

Probe	GSSG [nmol/mg Protein]	MÄ [dimesionslos]	Effekt-%, bezogen auf MD	CV
AMT	2,1	0,584	58,4	13,9 %
BCNU	5,0	1,415	141,5	9,9 %
DC	3,0	0,838	83,8	4,7 %
MD	3,6	1,000	100,0	17,7 %
DETCA	6,2	1,735	173,5	15,5 %
BSO	1,3	0,359	35,9	12,8 %

**Tabelle A29: Einzelmessergebnisse der Präzisionsprüfung für die Messparameter Protein, GSH, GSSG, KAT und LDH**

Probe	Protein [µg/Flasche]	GSH [nmol/mg Protein]	GSSG [nmol/mg Protein]	KAT [U/mg Protein]	LDH [mU/mg Protein]
1	2719,3	145,6	4,0	14,6	215,2
2	2691,0	134,8	4,2	16,7	193,9
3	2738,2	99,6	5,1	17,0	200,4
4	2602,7	92,0	3,5	15,6	222,6
5	2573,9	129,0	3,5	15,8	189,7
6	2658,4	115,4	3,4	13,2	158,2
7	2525,5	133,3	4,4	14,6	348,0
8	2272,4	128,7	4,8	14,2	237,9
9	2745,3	147,8	4,8	12,1	433,1
10	2702,8	122,5	3,9	13,4	160,6
11	3227,2	114,6	5,3	15,3	142,7
12	2626,5	138,1	5,3	14,1	205,2
13	2773,6	140,5	4,5	13,3	195,9
14	2904,2	133,9	5,1	12,2	172,2
15	2753,2	134,7	4,7	12,5	246,1
16	2014,4	177,4	3,5	15,3	412,6
Mittelwert	2658,0	130,5	4,4	14,4	233,4
S	260,7	19,9	0,7	1,5	87,7
CV	9,8 %	15,2 %	15,7 %	10,6 %	37,6 %

**Tabelle A30: Ergebnisse der Zellinkubationen der marinen Rohextrakte ISIS-1 bis ISIS-7**

Probe [µg TOC/mL]	MÄ	CV [%]	Probe [µg TOC/mL]	MÄ	CV [%]
<b>ISIS-1</b>			<b>ISIS-4</b>		
443	0,418	10,6	845	0,464	13,7
221	0,317	11,2	423	0,226	10,9
111	0,198	76,9	169	0,168	27,8
55	0,063	25,0	85	0,078	36,0
27,5	0	-	34	0,000	-
<b>ISIS-2</b>			<b>ISIS-5</b>		
1000	0,578	22,9	850	0,278	43,1
566	0,546	16,6	425	0,086	14,9
283	0,202	18,0	170	0,000	-
142	0,130	22,2	85	0,000	-
71	0,107	19,1	34	0,000	-
<b>ISIS-3</b>			<b>ISIS-6</b>		
1920	0,807	30,5	830	0,563	9,3
960	0,332	27,5	415	0,306	18,6
480	0,310	58,2	166	0,211	12,5
240	0,193	38,5	83	0,077	23,2
120	0,155	9,3	33	0,000	-
60	0,078	8,3	<b>ISIS-7</b>		
			450	0,551	12,7
			180	0,280	8,3
			90	0,102	42,5
			36	0,000	-

**Tabelle A31: Ergebnisse der Zellinkubationen der Rohextrakte Elbe und Industriehafen HH**

Probe [µg TOC/mL]	MÄ	CV [%]	Probe [µg TOC/mL]	MÄ	CV [%]
<b>Veringkanal</b>			<b>Seemannshöft</b>		
176	1,454	15,4	322	0,884	14,7
50	1,096	10,1	161	0,684	2,4
11	0,934	8,2	80	0,465	3,0
2,75	0,419	8,7	40	0,196	40,4
0,69	0,039	12,5	20	0,081	20,9
0,17	0	-	10	0	-
<b>Seehafen 4</b>			<b>Blankenese</b>		
192	1,922	2,2	214	1,008	22,3
48	1,634	23,8	107	0,352	15,6
24	0,787	6,3	54	0,119	12,2
12	0,447	0,8	27	0,056	51,6
3	0,139	13,3	14	0	-
0,75	0,053	1,3	7	0	-
0,19	0	-			

**Tabelle A32: Effekte der ISIS-Proben, Elbe und Industriehafen Hamburg in µg Menadion/g TOC.**  
Auswertung aus der jeweiligen DW-Kurve (hier nicht extra aufgeführt) bei 0,2 MÄ. obere Tabelle: ISIS-Proben; untere Tabelle: Rohextrakte Industriehafen und Elbe

	ISIS-1	ISIS-2	ISIS-3	ISIS-4	ISIS-5	ISIS-6	ISIS-7
<b>Rohextrakt</b>	7820	3071	3440	2520	1265	5733	6615
<b>GPC-VF</b>		< 100	< 100			1850	
<b>GPC-NF</b>		< 100	< 100			1901	
<b>GPC-HF</b>		< 100	3263			1798	
<b>HPLC-F1</b>		< 100	< 100			< 100	
<b>HPLC-F2</b>		< 100	< 100			< 100	
<b>HPLC-F3</b>		< 100	< 100			< 100	
<b>HPLC-F4</b>		1025	< 100			1707	
<b>HPLC-F5</b>		< 100	< 100			< 100	
<b>HPLC-F6</b>		221	135			< 100	
	<b>Veringkanal</b>		<b>Seehafen-4</b>		<b>Seemannshöft</b>		<b>Blankenese</b>
<b>Rohextrakt</b>	614286		172000		20975		11466

Tabelle A33: Messergebnisse zur KAT-Aktivität der Proben ISIS-2 und ISIS-3 (Stufe I und II).

Probe ISIS-2	Protein [mg/Flasche]	KAT [U/mg Protein]	Probe ISIS-3	Protein [mg/Flasche]	KAT [U/mg/protein]
KW 1	1,55	9,33	KW 1	1,72	10,00
CV	0,1 %	11,8 %	CV	1,0 %	9,9 %
BW Rohextrakt	1,46	8,57	BW Rohextrakt	1,52	6,34
CV	8,8 %	18,4 %	CV	1,6 %	25,0 %
Rohextrakt	1,39	3,02	Rohextrakt	1,33	4,33
CV	4,4 %	18,1 %	CV	10,0 %	31,2 %
KW 2	3,16	11,50	KW 2	2,41	9,01
CV	2,8 %	5,6 %	CV	7,3 %	19,1 %
BW GPC	2,89	11,55	BW GPC	2,52	8,78
CV	3,5 %	4,6 %	CV	5,2 %	5,6 %
VF	2,81	8,05	VF	2,31	5,89
CV	1,4 %	7,3 %	CV	0,1 %	15,1 %
KW 3	2,73	8,37	KW 3	2,57	7,13
CV	4,4 %	12,3 %	CV	7,4 %	11,6 %
HF	2,55	6,11	HF	2,41	4,95
CV	2,3 %	5,3 %	CV	5,5 %	7,7 %
NF	2,67	7,78	NF	2,06	2,34
CV	9,9 %	3,1 %	CV	2,8 %	23,2 %

Tabelle A34: Messergebnisse zur KAT-Aktivität der DW-Kurve GPC-HF ISIS-2.

Probe	Protein [mg/Flasche]	KAT [U/mg Protein]	9.16.1 Probe	Protein [mg/Flasche]	KAT [U/mg Protein]
KW 1	2,42	11,5	KW 3	2,91	7,0
CV	5,5 %	5,5 %	CV	11,1 %	17,4 %
MD 1	2,37	10,1	MD 2	2,90	8,0
CV	2,1 %	3,9 %	CV	5,0 %	5,6 %
BW	2,26	11,4	70,8 µg TOC/mL	2,59	8,2
CV	5,7 %	4,1 %	CV	2,1 %	18,0 %
1132 µg TOC/mL	1,96	8,4	KW 4	2,45	8,3
CV	2,5 %	8,7 %	CV	4,9 %	0,1 %
KW 2	2,59	9,4	14,2 µg TOC/mL	2,56	8,9
CV	2,8 %	32,3 %	CV	0,7 %	2,6 %
566 µg TOC/mL	2,43	9,5	1,42 µg TOC/mL	2,38	9,1
CV	0,9 %	3,4 %	CV	1,0 %	5,9 %
283 µg TOC/mL	2,40	9,6	0,14 µg TOC/mL	2,24	8,4
CV	2,0 %	1,4 %	CV	4,0 %	8,5 %

Tabelle A35: Ergebnisse der DW-Kurven ISIS-2 und ISIS-6 (Rohextrakt, GPC-HF, HPLC-F4)

Probe [µg TOC/mL]	MÄ	CV [%]	Probe [µg TOC/mL]	MÄ	CV [%]
ISIS-2 Rohextrakt			ISIS-6 Rohextrakt		
1000	0,579	22,9	830	0,563	9,3
566	0,546	16,6	415	0,306	18,6
283	0,202	18,0	208	0,112	17,5
142	0,130	22,2	83	0	-
71	0,107	19,1	33	0	-
			GPC-HF		
			1660	0,734	10,0
			830	0,321	21,1
			415	0,121	53,4
			208	0,039	93,7
			104	0	-
			52	0	-
HPLC-F4			HPLC-F4		
3740	0,466	7,6	3360	0,925	19,5
1870	0,257	6,1	1680	0,667	4,3
935	0,223	19,2	840	0,241	5,3
468	0,093	11,9	420	0,112	21,5
234	0	-	210	0	-

Tabelle A36: Ergebnisse der Zellinkubation MD, PHEQ, S8 und Wasserstoffperoxid

Probe	MÄ	CV [%]	Probe	MÄ	CV [%]
0,25 µM MD	0,022	19,1	8,6 µM S8	0,637	6,3
1 µM	0,101	6,1	5 µM	0,323	1,4
5 µM	0,404	6,9	2,5 µM	0,202	17,1
10 µM	0,663	2,5	1 µM	0,199	1,7
25 µM	1,000	11,7	0,5 µM	0,102	9,7
100 µM	1,146	12,9	0,25 µM	0,073	21,9
0,04 µM PHEQ	0,075	25,3	0,1 µM	0,011	72,0
0,2 µM	0,316	19,4	1 µM H2O2	0	-
1 µM	2,485	7,4	5 µM	0	-
5 µM	3,601	27,7	25 µM	0,62	17,9
25 µM	4,136	5,5	100 µM	0,973	37,2
48 µM	4,429	4,7	500 µM	1,775	2,1
200 µM	5,804	16,1	2500 µM	2,961	3,2

Tabelle A37: Messergebnisse der Modellinkubation PHEQ, MD, S8 und Wasserstoffperoxid

Probe	GSx [nmol]	CV [%]	GSSG [nmol]	CV [%]	MÄ
KW	23,3	7,3	1,2	8,2	0,000
MD 100 µM	14,5	3,2	4,2	5,2	2,058
25 µM	19,6	4,8	2,7	5,6	1,000
5 µM	23,7	6,6	1,7	3,4	0,321
1 µM	22,9	4,8	1,4	0,5	0,119
0,2 µM	21,6	0,7	1,3	3,2	0,082
PHEQ 100 µM	20,4	1,5	2,1	0,0	0,601
25 µM	22,6	6,2	1,9	12,1	0,495
5 µM	23,3	4,0	1,5	9,9	0,195
1 µM	21,5	1,1	1,3	0,6	0,044
0,2 µM	21,5	1,5	1,2	3,4	0,000
H2O2 100 µM	23,4	10,0	8,1	4,0	4,683
25 µM	24,0	8,1	3,8	4,1	1,761
5 µM	21,7	3,2	1,7	0,4	0,345
1 µM	22,6	1,0	1,2	2,3	0,000
S8 8,60 µM	25,2	7,4	8,7	3,3	5,116
4,30 µM	26,6	5,8	8,1	0,8	4,679
1,08 µM	24,0	1,6	5,6	7,8	3,003
0,54 µM	25,4	4,9	3,8	5,2	1,761
0,27 µM	26,4	7,1	2,9	0,5	1,181
0,14 µM	24,3	6,2	2,3	2,2	0,746

Tabelle A38: Messergebnisse zur GR-Aktivität als Einzelbestimmung nach Inkubation mit verschiedenen Chinonen (25 µM)

Probe	Protein [mg/Flasche]	GR [mU/mg Protein]	GR-Inhibierung [%; bezogen auf KW]
KW	1,86	465,7	0,0
1,2-NQ	2,16	387,3	16,8
1,4-NQ	2,77	280,5	39,8
BQ	2,08	341,5	26,7
PHEQ	0,30	44,0	90,6
ANTQ	2,13	317,0	31,9
MD	1,53	390,6	16,1

Tabelle A39: Messergebnisse zur GR-Inhibierung durch PHEQ

Probe	Protein [mg/Flasche]	GR [U/mg Protein]	Probe	Protein [mg/Flasche]	GR [U/mg Protein]
Direkt			indirekt		
KW	4,74	1,21	KW	1,77	1,84
CV	17,5 %	13,8 %	CV	1,3 %	5,2 %
1 µM	4,60	1,15	1 µM	1,73	1,68
CV	16,5 %	4,2 %	CV	10,4 %	11,6 %
5 µM	3,95	1,27	5 µM	1,68	1,52
CV	16,7 %	13,4 %	CV	13,0 %	19,7 %
25 µM	4,47	1,14	25 µM	1,99	1,32
CV	11,1 %	12,6 %	CV	2,6 %	7,0 %
125 µM	4,54	1,05	125 µM	1,66	1,05
CV	15,5 %	8,6 %	CV	17,7 %	20,2 %
500 µM	3,40	0,48			
CV	14,8 %	20,4 %			
1000 µM	3,23	0,34			
CV	6,9 %	9,0 %			

**Tabelle A40: Einzelergebnisse zur GSSG-Bildung und GSH-Konjugation von 14 unterschiedlichen Chinonen**

Probe	Protein [mg/Flasche]	GSx [nmol/mg Protein]	GSSG [nmol/mg Protein]	MÄ	GSH-Konjugat [%]
KW	1,18	190,21	0,00	-	-
MD	1,06	158,14	12,69	1,000	16,90
1,2-NQ	1,11	103,66	11,42	0,900	45,50
BQ	1,20	59,73	0,00	-	68,60
ANTQ	1,09	188,35	1,15	0,091	-
KW	2,08	133,49	0,00	-	-
MD	1,82	96,83	4,21	1,000	27,50
1,4-NQ	1,66	58,47	0,69	0,165	56,20
PHEQ	1,78	116,34	17,41	4,136	12,80
Naphtharazin	1,99	79,99	1,58	0,376	40,10
Dichlon	1,86	58,87	0,36	0,086	55,90
M-1,4-NQ	1,77	105,17	1,50	0,357	21,20
Lapachol	1,89	95,48	0,00	-	28,50
Durochinon	1,91	117,51	0,00	-	12,00
KW	4,23	84,93	0,00	-	-
MD	4,43	69,57	2,90	1,000	18,10
Plumbagin	3,96	65,29	4,03	1,387	23,10
Lawsonie	3,58	56,21	1,22	0,421	-
Juglone	3,59	93,18	0,23	0,078	33,80

**Tabelle A41: Einzelergebnisse der drei Indizes der statistischen Auswertung aller Biotests der ISIS-Biotestbatterie**

Biotests	Index 1	Index 2	Index 3
AChE-Hemmtest	0,61	-0,40	0,31
AH-Rezeptoaktivität	-0,63	0,42	-0,20
Ara-Test	-0,09	0,96	0,03
Ara-Test (S9)	-0,45	0,71	0,31
Comet-Assay	0,89	0,09	0,16
Fischei-Missbildung	0,88	-0,06	0,04
Fischei-Mortalität	0,58	-0,01	0,44
GSSG-Bildung	0,49	-0,37	0,60
Hsp70-Induktion	0,17	-0,25	0,92
hormonelle Aktivität	0,07	0,91	-0,20
Leuchtbakterientests	0,12	0,32	0,81

## 9.17 Chemikalienliste

Substanz	Hersteller	Gef.-Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	Baker	T, F	11-23/24/25	16-27-45
Ameisensäure	Merck	C	35	23.2-26-45
Ammoniak	Merck	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61
Ammoniumsulfat	Merck	-	-	-
1-Aminopyren	Fluka	X <sub>n</sub>	22-40	36/37/39
9,10-Anthrachinon	Fluka	X <sub>i</sub>	43	36/37
1,4-Benzochinon	Merck	T / N	23/25-36/37/38-50	26-28.1-45-61
Benzo(e)pyren	Aldrich	X <sub>n</sub> / K2	61-20/21/22	53-45-36/37/39-22
5-Bromindol	Merck	-	-	24/25
1-Butanol	Merck	X <sub>n</sub>	10-20	16
Butylhydroxytoluol (BHT)	Merck	X <sub>n</sub>	22-26	24
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	Fluka	E, T	2-7-21/22/23-34-52/53	3/7-14.11-26-36/37/39-45
Chlordinitrobenzol (CDNB)	Aldrich	T, N	23/24/25-33-50/53	53-55-60-61
Coomassie Serva Blue G	Merck	-	-	-
Cumolhydroperoxid 80 % in Cumol	Merck	C, O	10-20/22/34	3/7-14-26-36-37/39-45
Deiquat	RdH	T, N	-	-
Dichlormethan	Baker	K <sub>3</sub> , X <sub>n</sub>	40	23.2-24/25-36/37
2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon	Aldrich	X <sub>n</sub> , N	22-36/38-50/53	26-60-61
1,3-Diethyl-2-Thiobarbitursäure (DETBA)	Sigma	-	-	-
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	-	-	-
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure (DTNB))	Sigma	X <sub>i</sub>	36/37/38	26-36
Diamid	Sigma	X <sub>n</sub>	42-44	22-24-37
Dieldrin	Ehrentorfer	T / K3	33	35
Dimethylsulfoxid (DMSO), > 99,9%-ig	Sigma	X <sub>i</sub>	36/37/38	23-26-36
Durochinon	Aldich	X <sub>i</sub>	36/37/38	26-36
EDTA	Sigma	X <sub>n</sub>	22-36/37/38	26-36
Essigsäure	Merck	C	10-35	2-23-26
Ethanol, 96%-ig	Merck	F	11	7-16
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma	-	-	-
Glutathion, oxidierte Form (GSSG)	Sigma	X <sub>i</sub>	36/37/38	26-36
Glutathion, reduzierte Form (GSH)	Sigma	-	-	-
GSSG-Reduktase	Sigma	-	-	-
Hexan	Merck	F, X <sub>n</sub>	11-21/22-40	9-16-23
9-Hydroxyfluoren	Aldrich	X <sub>n</sub>	36/37/38	26-37/39
1-Hydroxypyren	Aldrich	X <sub>i</sub>	36/37/38	26-37-39
Juglon	Aldrich	-	25-36/37/38	22-28-36/37/39-45
Kaliumcarbonat	Merck	X <sub>n</sub>	22-36/37/38	22-26
Kaliumchlorid	Merck	-	-	-

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	-	-	-
Kaliumhydroxid	Merck	C	35	26-37/38-45
Kaliummetaperiodat	Merck	O	8	26-36
Kupfer(II)-chlorid	Merck	X <sub>n</sub>	22-36/37/38	26
Lapachol	Aldrich	-	20/21/22- 36/37/38	26-36
Lawson	Aldrich	-	36/37/38	26-36
LDH-Kit	Sigma	X <sub>n</sub>	20/21/22- 36/37/38-41- 42/43	23-26-36
Lindan (γ-HCH)	Ehrens- torfer	T / K3	33	35
Malathion	Aldrich	X <sub>n</sub> / N	22	2-24
Malondialdehyd- bis(diethylacetal)	Merck	X <sub>n</sub>	22	-
Menadion	Sigma	X <sub>n</sub>	22-36/37/38-40	26-36
Methanol, getrocknet	Merck	T / F	11-23/25	7-16-24-45
2-Methoxy-1,4-naphthochinon	Aldrich	-	36/37/38	26-36
2-Methylanthrachinon	Aldrich	K <sub>2</sub>	45-46-60-61	53-45
β-NADPH	Sigma	-	23/24/25- 36/37/38	45
Naphtharazin	Aldrich	-	20/21/22- 36/37/38	26-36
1,2-; 1,4-Naphthochinon	Merck	T+ / N	25-26- 36/37/38-43-50	26-28.1-36/37- 45-61
Natriumcarbonat	Merck	X <sub>i</sub>	36	22-26
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	-	-	-
Natriumhydroxid	Merck	C	35	2-26-37/38
2-Nitrobenzoesäure	Aldrich	X <sub>n</sub>	36/37/38-40	26-37/37
Nitroblue-Tetrazolium	Sigma	X	20-36/37/38	24-45
Nitrofurantoin	Sigma	T	45-46- 23/24/25-42/43	45-36/37/39-22- 37/9
Paracetamol	Merck	X	22-52/53	22-61
Paraquat	Aldrich	T / X <sub>i</sub>	24/25-36/37/38	1/2-22-36/37/39- 45
Phenanthren	Serva	X <sub>i</sub>	38	-
9,10-Phenanthrenchinon	Merck	X <sub>i</sub>	36/38	-
Perchlorsäure 60 %i-g	Merck	C, O	5-8-35	23.2-26- 36/37/39-45
ortho-Phosphorsäure, 85 %i-g	Merck	C	34	26
Plumbagin	Sigma	T+	26/27/28-34	45-26-36/37/39
Pufferlösungen pH 4 bzw. pH 7	Merck	-	-	-
Purpald®	Sigma	X <sub>n</sub>	20/21/22- 36/37/38	26-36
Pyren	Sigma	-	36/37/38	26-37/39
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma	-	-	-
Salzsäure, 37%-ig	Merck	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefel	RdH	-	-	-
5-Sulfosalicylsäure Dihydrat	Merck	X <sub>i</sub>	36/38	26
Tetrabutylammoniumbromid (TBAB)	Merck	-	-	-
Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH)	Merck	C	34	26
Trifluoressigsäure	Merck	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45- 61



Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck	X <sub>i</sub>	36/38	-
Trypsin (0,05 %)-EDTA (0,02 %)-Lösung	Sigma	-	-	-
2-Vinylpyridin	Merck	T	10-20/21-25-34	26-36/37/39-45
Wasserstoffperoxid, 30%-ig	Merck	C	34	3-26-36/37/39-45
Xanthin	Sigma	-	-	-

### 9.18 Geräte, Hilfsmittel und chromatographische Trennmittel

	Spezifikation	Hersteller
Analysenwaage		Sartorius
Anionentauscher	700 mg Chromabond® SB	Macherey & Nagel
Einmalfilterhalter	0,45 µM	Schleicher & Schuell
Einmalküvetten	Kunststoff, Schichtdicke 1 cm	Rationlab
Einmalspritzen	Kunststoff, 5 mL	Schleicher & Schuell
Kationentauscher	500 mg Chromabond® SA	Macherey & Nagel
Kieselgel	40 µM (30-60 µM)	Baker
Küvetten	Quarz, Schichtdicke: 1cm	
Membranfiltrationseinheit	Glasaufsatz, Quarzfritte	Schleicher & Schuell
Microtiterplatte	96 wells	Nunc
Microtiterplattenreader	MRX	Dynex
Microtiterplattenreader-Software	Revelation 3.04	Dynex
Multipette® plus		Eppendorf
pH-Elektrode	N 6180	Schott
PH-Indikatorstäbchen	Neutralit	Merck
pH-Meter	cG 840	Schott
Pipette	2-20 µl Vario	Eppendorf
Pipette	10-100 µl Vario	Eppendorf
Pipette	100-1000 µl Vario	Eppendorf
Reaktionsgefäße	1,5 und 2 ml-PE	Eurolab
Schüttelmaschine	Swip	Edmund Bühler
Ultraschallhomogenisator	Sonoplus HD 2200	Bandelin Electronic
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge	3 K 15	Sigma

## 10 Literaturverzeichnis

Adamson G.M., Harman A.W.: Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen; *Biochem. Pharmacol.*, 45, 2289-2294 (1993)

Ahmed F.E.: The role of oxidative stress in environmental carcinogenesis; *Environ. Carcino. Ecotox. Revs.*, C17, 111-142 (1999).

Ait-Aissa S., Porcher J.-M., Arrigo A.-P., Lambre C.: Activation of hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationship with cytotoxicity and lipophilicity; *Toxicology*, 145, 147-157 (2000)

Allen J.O., Dookeran N.M., Taghizadeh K., Lafleur A.L., Smith K.A., Sarofim A.F.: Measurement of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with a size-segregated urban aerosol; *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2064-2070 (1997)

Anderson M.E.: Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples; *Methods Enzymol.*, 113, 548-555 (1985)

Anderson M.E.: Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation; *Chem. Biol. Interact.*, 111, 1-14 (1998)

Ankley G.T., Schubauer-Berigan M.K.: Background and overview of current sediment toxicity identification evaluation procedures; *J. Aquat. Ecosyst. Health*, 4, 133-149 (1995)

Ankley, G.T., Schubauer-Berigan, M.K., Hoke, R.A: Use of toxicity identification evaluation techniques to identify dredged material disposal options: a proposed approach; *Environ. Manag.*, 16, 1-6 (1992)

Arechabala B., Coiffard C., Rivalland P., Coiffard L.J.M., de Roeck-Holtzhauer Y.: Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release; *J. Appl. Toxicol.*, 19, 163-165 (1999)

ARGE-Elbe Bericht: Ausgewählte organische Spurenverunreinigungen in der Elbe und Elbenebenflüssen im Zeitraum 1994-1999 (2000)  
[www.arge-elbe.de](http://www.arge-elbe.de)

Asensi M., Sastre J., Pallardo F.V., Asucion J.G. de la, Estrela J.M., Vina J.: A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples; *Anal. Biochem.*, 217, 323-328 (1994)

Awang D.V.C., Kindack D., Dawson B.A.: Tandem high-performance liquid chromatography methods for resolution of lapachol and related naphthoquinones; *J. Chrom.*, 368, 439-443 (1986)

Babich H., Borenfreund E.: Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cell: a review; *Toxic. In Vitro*, 5, 91-100 (1991)

Babich H., Borenfreund E.: In vitro cytotoxicity of organic pollutants to Bluegill sunfish (BF-2) cells; *Environ Res.*, 42, 229-237 (1987)

Babich H., Palace M.R., Stern A.: Oxidative stress in fish cells: In vitro studies; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, 173-178 (1993)

Babich H., Rosenberg D.W., Borenfreund E.: In vitro cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*); *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 21, 327-336 (1991)

Babich H., Shopsis C., Borenfreund E.: In vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, chopper, zinc, nickel) using established fish cell lines; *Ecotox. Environ. Safety*, 11, 91-99 (1986)

Babu T.S., Marder J.B., Tripuranthakam S., Dixon D.G., Grennberg B.M.: Synergistic effects of photooxidizes polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: Evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity; *Environ. Tox. Chem.*, 20, 1351-1358 (2001)

- Bachowski S., Xu Y., Stevenson D.E., Walborg E.F., Klaunig J.E.: Role of oxidative stress in the selective toxicity of dieldrin in the mouse liver; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 150, 301-309 (1998)
- Baker M.A., Cerniglia G.J., Zaman A.: Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples; *Anal. Biochem.*, 190, 360-365 (1990)
- Baksi S.M., Frazier J.M.: Review: Isolated fish hepatocytes – Model systems for toxicology research; *Aquat. Toxicol.*, 16, 229-256 (1990)
- Behrens W.A., Madere R.: Malondialdehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography, *Lipids*, 26, 232-236 (1991)
- Bergamo P., Fedele E., Balestrieri M., Abrescia P., Ferrara L.: Measurement of malondialdehyde levels in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2171-2176 (1998)
- Bergmeyer H.U., Bergmeyer J., Graßl M.: *Methods of enzymatic analysis*, 3, 3. Auflage, VCH Weinheim (1985)
- Bestwick C.S., Milne L.: Effects of  $\beta$ -carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within post confluent Caco-2 intestinal cells; *Biochim. Biophys. Acta*, 1474, 47-55 (2000)
- Bestwick C.S., Milne L.: Quercetin modifies reactive oxygen levels but exerts only partial protection against oxidative stress within HL-60 cells; *Biochim. Biophys. Acta*, 1528, 49-59 (2001)
- Biaglow J.E., Donahue J., Tuttle S., Held K., Christensen C., Mieyal J.: A method of measuring disulfide reduction by cultured mammalian cells: relative contributions of glutathione-dependent and glutathione-independent mechanisms; *Anal. Biochem.*, 281, 77-86 (2000)
- Bierkens J., Maes J., Vander Plaetse F.: Dose-dependent induction of heat shock protein70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants; *Environ. Poll.*, 101, 91-97 (1998)
- Binder R.G., Benson M.E., Flath R.A.: Eight 1,4-naphthoquinones from Juglans; *Photochemistry*, 28, 2799-2801 (1989)
- Biselli S.: Entwicklung einer analytischen Methode zum Nachweis von ökotoxikologisch relevanten Problemstoffen in Sedimenten und Biota; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg (2001)
- Björklund H.V., Johansson T.R., Rinne A.: Rhabdovirus-induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor; *J. Virol.*, 71, 5685-5662 (1997)
- Bodzek D., Tyrpien K., Warzecha L.: Identification of oxygen derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter of Upper Silesia (Poland); *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 52, 75-85 (1993)
- Brack W., Altenburger R., Ensenbach U., Möder M., Segner H., Schüürmann G.: Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) – A contribution to hazard assessment; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37, 164-167 (1999)
- Bradford M.M.: 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 (1976)
- Braunbeck T, Arnold H., Oulmi Y., Zahn T., Storch V.: Neue Ansätze zur Bewertung der Ökotoxizität von Xenobiotika; Teil 1: In vitro Tests an Fischzellkulturen, *BIOforum*, 1-2, 12-16 (1997b)

- Braunbeck T., Berbner T., Bieberstein U., Erdinger L., Geier V., Hollert H., Leist E., Rahman N., Zipperle J.: Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe eines mehrstufigen Prüfsystems mit Zellkulturen aus Fischen, Projekt "Angewandte Ökologie"; Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 12, 345-358 (1995)
- Braunbeck T., Hollert H., Dürr M., Erdinger L.F.: Biotests in der Ökotoxikologie am Beispiel des Fischzelltests, Projekt "Angewandte Ökologie"; Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 22, 241-256 (1997a)
- Brouwer H., Murphy T.: Volatile sulfides and their toxicity in freshwater sediments; Environ. Toxicol. Chem., 14, 230-280 (1995)
- Brunström, B., Broman, D., Dencker, L., Näf, C., Vejens, E., Zebühr, Y.: Extracts from settling particulate matter collected in the Stockholm archipelago waters: Embryo lethality, immunotoxicity, and EROD-inducing potency of fractions containing aliphatics/monoaromatics, diaromatics, or polyaromatics; Environ. Toxicol. Chem., 13, 1607-1611 (1992)
- BUA, Beratergremium für Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker: 1,4-Naphthochinon; BUA-Stoffbericht 211; S. Hirzel Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1999)
- Budde E.: Die oxidative Stressantwort der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades aus dem Fachbereich Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Technischen Universität Berlin (1996)
- Buffington G.D., Öllinger K., Brunmark A., Cadenas E.: DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates; Biochem. J., 257, 561-571 (1989)
- Bunke M.: Fischzellen als in-vitro Modell zur Erfassung von Genotoxizität; Diplomarbeit aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie (2000)
- Burgess R.M., Cantwell M.G., Pelletier M.C., Ho K.T., Serbst J.R., Cook H.F., Kuhn A.: Development of a toxicity identification evaluation procedure for characterizing metal toxicity in marine sediments; Environ. Toxicol. Chem., 19, 982-991 (2000)
- Burgess R.M., Ho K.T., Taliabue M.D., Kuhn A., Cornelio R., Cornelio P., Modica G., Morrison G.E.: Toxicity characterisation of an industrial municipal effluent discharging to the marine environment; Mar. Pollut. Bull., 30, 524-535 (1995)
- Burgess R.M., Sweitzer K.A., McKinney R.A., Phelps D.K.: Contaminated marine sediments: water column and intestinal toxic effects; Environ. Toxicol. Chem., 12, 127-138 (1993)
- Burgess R.M.: Characterizing and identifying toxicants in marine waters: a review of marine toxicity identification evaluations (TIEs); Int. J. Environ. Poll., 13, 1-6 (2000)
- Cargoni A., Ceconi C., Gaia G., Agnoletti L., Ferrari R.: Cellular thiols redox status: A switch for NF-kappaB activation during myocardial post-ischaemic reperfusion; J. Mol. Cell. Cardiol., 34, 997 (2002)
- Carr R.S., Nipper M., Biedenbach J.M., Hooten R.L., Miller K., Saepoff S.: Sediment toxicity identification evaluation (TIE) studies at marine site suspected of ordnance contamination; Arch. Environ. Contam. Toxicol., 41, 198-207 (2001)
- Castano A., Cantarino M.J., Castillo P., Tarazona J.V.: Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test EC50 and in vivo LC50 Rainbow trout bioassay; Chemosphere, 32, 2141-2157 (1996)
- Castano, A., Vega, M., Balquez, T., Tarazona J.V.: Biological alternatives to chemical identification for the ecotoxicological assessment of industrial effluents: The RTG-2 in vitro cytotoxicity test; Environ. Toxicol. Chem., 11, 1441-1449 (1994)
- Chiou T.J., Tzeng W.F.: The role of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress; Toxicology, 154, 75-84 (2000)

- Chiou T.J., Wang Y.T., Tzeng W.F.: DT-Diaphorase protects against mendione-induced oxidative stress; *Toxicology*, 139, 130-110 (1999)
- Chiu D.T.Y., Stults F.H., Tappel A.L.: Purification und properties of rat lung soluble glutathione peroxidase; *Biochim. Biophys. Acta*, 445, 558-566 (1976)
- Christie N.T., Costa M.: Review: In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV: Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothioneins and DNA, *Biol. Trace Elem. Res.*, 6, 139-158 (1984)
- Cohen G.M., D'arcy Doherty M.: Free radical mediated toxicity by redox cycling chemicals; *Br. J. Cancer*, 55, 46-52 (1987)
- Crouch S.P.M., Kozlowski R., Slater K.J., Fletcher J.: The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity; *J. Immun. Meth.*, 160, 81-88 (1993).
- Decker T., Lohmann-Matthes M.L.: A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity; *J. Immun. Meth.*, 15, 61-69, (1988)
- Descampiaux B., Cotelte N., Catteau J.P, Peucelle C., Leurox J.M., Erb F.: Cytotoxicity of lindane and paraquat to human hepatome cell lines; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 16-24 (1999)
- DiMonte D., Ross D., Bellomo G., Eklow L., Orrenius S.: Alterations in intracellular thiol homeostasis during metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes; *Arch. Biochem. Biophys.*, 235, 334-342 (1984)
- Durst H.D., Gokel G.W.: A classification test for aldehydes involving phase transfer catalysis; *J. Chem. Edu.*, 55, 206 (1978)
- Edson R.R., Selby T., Coleman J.P., Smith C.J.: Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: A role for catalase in protection against hydrogen peroxide; *J. Bacteriol.*, 178, 6895-6903 (1996)
- Engwall, M., Broman, D., Ishaq, R., Näf, C., Zebühr, Y., Brunström, B.; Toxic potencies of lipophilic extracts from sediments and settling particulate matter (SPM) collected in an PCB contaminated river system; *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 213-222 (1996)
- EPA: Marine toxicity identification evaluation (TIE) phase I guidance document. EPA/600/R-96/054. National Health and environmental effects research laboratory, Atlantic Ecology Division, U.S. Environmental Protection Agency, Narragansett, Rhode Island (1996)
- EPA: Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I toxicity characterization procedures. Second edition EPA/600/6-91/003. National effluent toxicity assasment center technical report 18-90. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN (1991)
- EPA: Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase II toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity. EPA/600/6-92/080. National effluent toxicity assasment center technical report 01-93. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN (1993a)
- EPA: Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase III toxicity conformation procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity. EPA/600/6-92/081. National effluent toxicity assasment center technical report 02-93. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN (1993b)
- Erden-Inal M., Kahraman A.: The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats; *Toxicology*, 154, 21-29 (2000)
- Eschenbach A., Kästner M., Bieri R., Schaefer G., Mahro B.: Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples; *Chemosphere*, 28, 683-692 (1994)

- Esterbauer H., Lang, J., Zadavec S., Slater T.F.: Detection of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography, *Methods Enzymol.*, 105, 319-328 (1984)
- Fabbri D., Locatelli C., Tarabusi S.: A new procedure, based on combustion to sulphate and ion chromatography for analysis of elemental sulfur in sediments; *Chromatographia*, 53, 119-121 (2001)
- Fernandez P., Grifoll M., Solanas A.M., Bayona J.M., Albages J.: Bioassay-directed chemical analyses of genotoxic components in coastal sediments; *Environ. Sci. Technol.*, 26, 817-829 (1992)
- Fernandez R.D., Yoshimizu M., Kimura T., Ezura Y.: Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish; *J. Aquat. Anim. Health*, 5, 137-147 (1993)
- Fijan N., Sulmimanovic D., Bearzotti M., Muzinic D., Zwillenberg L.O., Chilmonczyk S, Vautherot J.F., de Kinkelin P.: Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp *cyprinus carpio*; *Ann. Virol.*, 134E, 207-220 (1983)
- Flowers-Geary L., Harvey R.G., Penning T.M.: Cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones in rat and human hepatoma cells; *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 252-260 (1993)
- Franzblau S.G., Witzig R.S., McLaughlin J.C., Torres P., Madico G., Hernandez A., Degnan M.T., Cook M.B., Quenzer V.K., Ferguson R.M., Gilman R.H.: Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using microplate alamar blue assay; *J. Clin. Microbiol.*, 36, 362-366 (1998)
- Freedman J.H., Ciriolo M.R., Peisach J.: The role of glutathione in copper metabolism and toxicity; *J. Biol. Chem.*, 264, 5598-5605 (1989)
- Fridovich I.: Superoxide dismutase; *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 147-159 (1975)
- Fukanaga K., Yoshida M., Nakazono, N.: A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.*, 12, 300-303 (1998)
- Gabai V.L., Seilanov A.S., Makarov Y.M., Mosin A.F.: Oxidative stress, disturbance of energy balance, and death of ascites tumour cells under menadion (vitamin K3) action; *Biomed. Sci.*, 1, 407-413 (1990)
- Gagne F., Blaise C.: Evaluation of environmental estrogens with a fish cell line; *Bull. Environ Contam. Toxicol.*, 65, 494-500 (2000)
- Garman J.R., Freund T., Lawless E.W.: Testing of groundwater contamination at hazardous waste sites; *J. Chrom. Sci.*, 25, 328-337 (1987)
- Genell C.A., Zimmermann D.M., Goldstein R.S., Handler J.A.: Metabolic functions and two responses of freshly isolated intrahepatic biliary epithelial cells from rats; *In Vitro Toxicol.*, 10, 417-428 (1997)
- George S., Riley C., McEvoy J., Wright J.: Development of a fish in vitro cell culture model to investigate oxidative stress and its modulation by dietary vitamin E, *Mar. Environ. Res.*, 50, 541-544 (2000)
- Gillette J.R., Brodie B.B., LaDue B.N.: The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPHN and oxygen; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 119, 532-540 (1957)
- Goksoyr, A., Beyer J., Egaas E., Grosvik B.E., Hylland K., Sbandvik M., Skaare J.U.: Biomarker response in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring; *Mar. Pollut. Bull.*, 33, 36-45 (1996)
- Gottwald W.: Statistik für Anwender; VCH Weinheim, 1. Auflage (2000)
- Götz D.; persönliche Mitteilung (2001)

- Griffith O.W., Meister A.: Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine; *J. Biol. Chem.*, 254, 7558-7560 (1979)
- Griffith O.W.: Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine; *Anal. Biochem.*, 106, 207-212 (1980)
- Guillen-Sans R., Guzman-Chozas M.: The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38 (4), 315-330 (1998)
- Haarich M., Harms U.: Die Neustrukturierung der Übereinkommen zum Schutz der Meeresumwelt des Nordatlantiks und der Ostsee; *Inf. Fischw.*, 44, 17-22 (1997)
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.: Glutathione S-Transferase- the first enzymatic step in mercapturic acid formation; *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139 (1974)
- Haddad J.: Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox-sensitive transcription factors; *Cell Signals*, 14, 879 (2002)
- Hashimoto H., Takeuchi K., Matsuo Y., Yokoyama Y., Toyohara H., Sakaguchi M.: Suppression of apoptosis of fish cells by acclimation to hypertonicity; *Fish sci.*, 65, 145-149 (1999)
- Hasspieler B.M., Di Giulio R.T.: Dicoumarol-sensitive NADPH:phenanthrenequinone oxidoreductase in channel catfish (*Ictalurus punctatus*); *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 125, 184-191 (1994)
- Hasspieler B.M., DiGiulio R.T.: DT diaphorase [NAD(P)H: (quinone acceptor) oxidoreductase] facilitates redox cycling of menadione in channell catfish (*Ictalurus punctatus*) cytosol; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 156-161 (1992)
- Hayes J.D., McLellan L.I.: Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinatly regulated defence against oxidative stress; *Free Radic. Res.*, 31, 273-300 (1999)
- Heemken O.P., Theobald N., Wenclawiak B.W.: Comparison of ASE and SFE with soxhlet, sonification, and methanolic saponification extractions for the determiantion of organic micropollutants in marine particulate matter; *Anal. Chem.*, 69, 2171-2180 (1997)
- Heinzel N.: Screening und Identifizierung von organischen Substanzen in marinen und fluviatilen Sedimenten; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg (2003)
- Hightower L.E., Renfro J.L.: Recent applications of fish cell culture to biomedical research; *The Journal of Experimental Zoology*, 248, 290-302 (1988)
- Hildago E., Demple B.: An iron-sulphur centre essential for transcription activation by redox sensing SoxR protein; *EMBO J.*, 13, 138-146 (1994)
- Ho K.T., Burgess R.M., Pelletier M.C., Serbst J.R., Ryba S.A., Cantwell M.G., Kuhn A., Raczelowski P.: An overview of toxicant identification in sediments and dredged materials; *Mar. Polut. Bull.*, 44, 286-293 (2002)
- Hollert H., Braunbeck T.: Ökotoxikologie in vitro – Gefährdungspotential in Wasser, Sediment und Schwebstoffen, Projekt "Angewandte Ökologie"; Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 21, 5-183 (1997)
- Hollert H., Dürr M., Dörr I., Erdinger L.F., Zipperle J., Braunbek T.: Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchungen und Bewertung der Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe von Zellkulturen aus Fischen; 4. Statuskolloquium, Projekt "Angewandte Ökologie", Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 5, 469-488 (1996)
- Hollert H., Dürr M., Erdinger L., Braunbeck T.: Cytotoxicity of settling particulate matter and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood, *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 528-534 (2000)

- Hoving E.B., Laing C., Rutgers H.M., Tegglers M., van Doormaal J.J., Muskiet F.A.J.: Optimized determination of malondialdehyde in plasma lipid extracts using 1,3-Diethyl-2-thiobarbituric acid; influence of detection method and relation with lipids and fatty acids in plasma from healthy adults; *Cli. Chim. Acta*, 208, 63-76 (1992)
- Huang X.-D., Dixon D.G., Greenberg B.M.: Increased polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity following their photomodification in natural sunlight: Impacts on the duckweed *Lemna gibba* L. G-3; *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 32, 194-200 (1995)
- Ishikawa T., Esterbauer H., Sies H.: Role of cardiac glutathione transferase and of glutathione-S-conjugate export system in biotransformation of 4-hydroxynonenal; *J. Biol. Chem.*, 261, 1576-1581 (1986)
- Ishiyama M., Sasamoto K., Shiga M., Ohkura Y., Ueno K.: Novel disulfonated tetrazolium salt that can be reduced to a water-soluble formazan and its application in the assay of lactate dehydrogenase; *Analyst*, 120, 113-116 (1995)
- ISIS - Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe: Toxizitäts-geleitete Analytik; Zwischenbericht 2000, Hamburg (2001)
- ISIS - Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe: Toxizitäts-geleitete Analytik; Zwischenbericht 2001, Hamburg (2002)
- Iyanagi T., Yamazaki I.: One-electron-transfer reactions in biochemical systems. V: Differences in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NADPH dehydrogenase (DT-Diaphorase); *Biochim. Biophys. Acta*, 216, 282-294 (1970)
- Jacobs M.W., Delfino J.J., Bitton G.: The toxicity of sulfur to microtox from acetonitrile extracts of contaminated sediments; *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, 1137-1143 (1992)
- Jakoby W.B., Ziegler D.M.: The enzymes of detoxication; *J. Biol. Chem.*, 265, 20715-20718 (1990)
- Jakoby W.B.: The glutathione-S-transferases: a group of detoxification proteins. In: Meister A. (ed.): *Advances in enzymology*, John Wiley Sons Inc., New York, 46, 383-414 (1978)
- Jarabak J., Harvey R.G.: Studies of three reductases which have polycyclic aromatic hydrocarbon quinones as substrate; *Arch. Biochem. Biophys.*, 303, 394-401 (1993)
- Johannson L.H., Borg L.A.H.: A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples; *Anal. Biochem.*, 174, 331-336 (1988)
- Johnson B.T., Long E.R.: Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: a new tandem in vitro testing approach; *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 1099-1106 (1998)
- Kammann U., Bunke M., Steinhart H., Theobald N.: A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay; *Mut. Res.*, 498, 67-77 (2001)
- Kammann U., Bunke M., Steinhart, H.: Anwendung von Fischzellkulturen in der Meeresforschung; *Inf. Fischwirtsch. Fischereiforsch.*, 47, 48-51 (2000)
- Kammann U.: Metallothioneine und polychlorierte Biphenyle in Fischen aus Elbe und Nordsee; *Schriften der Bundesforschungsanstalt für Fischerei*, 22 (1995)
- Kappus H.: Overview of enzymes involved in bioreduction of drugs and redox cycling; *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1-6 (1986)
- Kappus H.: Oxidative stress in chemical toxicity; *Arch. Toxicol.*, 60, 144-149 (1987)
- Kawamoto Y., Shinozuka K., Kunitomo M., Haginaka J.: Determination of ATP and its metabolites released from rat caudal artery by isocratic ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 262, 33-38 (1998)



- Kelly S.A., Havrilla C.M., Brady T.C., Abramo K.H., Levin E.D.: Oxidative Stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems; *Environ. Health Persp.*, 106, 375-384 (1998)
- Kim K.B., Lee B.M.: Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo[a]pyrene; *Cancer Letters*, 113, 205-212 (1997)
- Knüppel, F.: Bestimmung der Oxidation von Glutathion und Lipiden in Leberzellen durch Anthrachinone; Diplomarbeit aus dem Fachbereich Toxikologie, Institut für Pharmakologie, Abteilung für allgemeine Toxikologie der Universität Hamburg (1995)
- Kossenjans W., Rymaszewski Z., Barankiewicz J., Bobst A., Ashraf M.: Menadione-induced oxidative stress in bovine heart microvascular endothelial cells; *Microcirculation*, 3, 39-47 (1996)
- Krengel-Rothensee K.: PAH-Analytik von Bodenproben; *Bio Engineering*, 9, 13-18 (1993)
- Kumagai Y., Koide S., Taguchi K., Endo A., Nakai Y., Yoshikawa T., Shimojo N.: Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles; *Chem. Res. Toxicol.*, 15, 483-489 (2002)
- Lange C.R., Lambert K.E.: Biomonitoring, *Water Environ. Res.*, 67, 738-349 (1995)
- Lange M., Gebauer W., Markl J., Nagel R.: Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*) and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test, *Chemosphere*, 30(11), 2087-2102 (1995)
- Lazzarino G. Di Pierro D., Tavazzi B., Cerroni L., Giardina B.: Simultaneous separation of malondialdehyde, ascorbic acid, and adenine nucleotide derivatives from biological samples by ion-pairing high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 197, 191-196 (1991)
- Lee J.L., Bae O.N., Chung S.M., Lee M.Y., Chung J.H.: Menadione induces endothelial dysfunction mediated by oxidative stress and arylation; *Chem. Biol. Interact.*, 137, 169-83 (2001)
- Legrand C., Bour J.M., Jacob C., Capiamont J., Martial A., Marc A., Wudtke M., Kretzmer G., Demangel C., Duval D., Hache J.: Lactate Dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker; *J. Biotechnol.*, 25, 231-243 (1992)
- Lemaire P., Livingstone D.R.: Aromatic hydrocarbon quinone-mediated reactive oxygen species production in hepatic microsomes of the flounder (*Platichthys flesus* L.); *Comp. Biochem. Physiol.*, 117C, 131-139 (1997)
- Lenton K.J., Therriault H., Wagner J.R.: Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high performance liquid chromatography with orthophthalaldehyde; *Anal. Biochem.*, 174, 125-130 (1999)
- Le Van K.M., Goldberg E.: Properties of human testis-specific lactate dehydrogenase expressed from *Escherichia coli*; *Biochem. J.*, 273, 587-592 (1991)
- Lewis A.C., Robinson R.E., Bartle K.D., Pilling M.J.: On-line coupled LC-GC-ITD/MS for the identification of alkylated, oxygenated, and nitrated polycyclic aromatic compounds in urban particulate extracts; *Environ. Sci., Technol.*, 29, 1977-1981 (1995)
- Liß W., Ahlf W.: Evidence from whole-sediment, porewater, and elutriate testing in toxicity assessment of contaminated sediments, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 36, 140-147 (1997)
- Liu R.-M., Nebert D.W., Shertzer H.G.: Menadione toxicity in two mouse liver established cell lines having striking genetic differences in quinone reductase activity and glutathione concentrations; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 122, 101-107 (1993)
- Livingston D.R., Martinez P.G., Winston G.W.: Menadione-stimulated oxyradical production in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L.; *Aquat. Toxicol.*, 15, 231-236 (1989)

- Long E.R., Hong C.B., Severn C.G.: Relationship between acute sediment toxicity in laboratory tests and abundance and diversity of benthic infauna in marine sediments: a review; *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 46-60 (2001)
- Loprasert S., Vattanaviboon P., Praituan W., Chamnongplo S., Mongkolsuk S.: Regulation of the oxidative stress protective enzymes, catalase and superoxide dismutase in *Xanthomonas* – A review; *Gene*, 179, 33-37 (1996)
- Lorenzen E., Carstensen B., Olesen N.J.: Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV; *Dis. Aquat. Organ.*, 37, 81-88 (1999)
- Lushchak V.I., Lushchak L.P., Mota A.A., Hermes-Lima M.: Oxidative stress and antioxidant defences in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation; *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280, R100-107 (2001)
- Mann P.J.G.: The reduction of glutathione by a liver system; *Biochem. J.*, 26, 785-790 (1932)
- Margoliash E., Novogrodsky A., Schejter A.: Irreversible reaction of 3-Amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase; *Biochem. J.*, 74, 339-348 (1960)
- Marklund S.L., Holme E., Hellner L.: Superoxide dismutase in extracellular fluids; *Clin. Chim. Acta*, 126, 41-51 (1982)
- Marklund S.L.: Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines; *J. Clin. Invest.*, 74, 1398-1403 (1984)
- Mather-Mihaich E., Di Giulio R.T.: Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentration in channel catfish exposed to DEF and n-butyl mercaptan; *Comp. Biochem. Physiol.*, 85C, 427-432 (1986)
- McCord J.M., Fridovich I.: Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein); *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055 (1969)
- Meister A., Anderson M.E.: Glutathione; *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 711-760 (1983)
- Meyer F.: Untersuchungen zur Induktion der 8-oxo-dGTPase – ein Enzym der oxidativen Stressabwehr; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg (2000)
- Meyer S.: Mikrobieller Abbau typischer Teeröl-PAK und Hetero-PAK (N, S, O) in einem Modellbodenhorizont; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg (1999)
- Meyer V.R.: Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern; Hüthig Verlag Heidelberg, 1. Auflage (1996)
- Mills G.C.: Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown; *J. Biol. Chem.*, 229, 189-197 (1957)
- Mok J.S.L., Paisley K., Martin W.: Inhibition of nitric neurotransmission in the bovine refractor penis muscle by an oxidative stress: effects of superoxide dismutase mimetics; *Br. J., Pharmacol.*, 124, 111-118 (1998)
- Molina A., DiMartino E., Martial J.A., Muller M.: Heat shock stimulation of a tilapia heat shock protein 70 promoter is mediated by a distal element; *Biochem. J.*, 356, 353-359 (2001)
- Moriarty F.: *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*; Academic Press, London (1993)
- Morse J.W., Millero F.J., Cornwell J.C., Rickard D.: The chemistry of hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters; *Earth Sci. Rev.*, 24, 1-42 (1987)

- Mourad T., Min K.-L., Steghens J.-P.: Measurement of oxidized glutathione by enzymatic recycling coupled to bioluminescent detection; *Anal. Biochem.*, 283, 146-152 (2000)
- Mourel Y., Barouki R.: Repression of gene expression by oxidative stress; *Biochem. J.*, 342, 481-496 (1999)
- Mueller J.G., Lantz S.E., Blattmann B.O., Chapman P.J.: Bench-scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol- and cresote-contaminated materials: solid-phase bio-remediation; *Environ. Sci. Technol.*, 25, 1045-1055 (1991)
- Munoz M.J., Tarazona J.V.: Synergistic effect of two- and four-component combinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons: Phenanthrene, anthracene, naphthalene, acenaphthene on *Daphnia magna*; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50, 363-368 (1993)
- Murdock A.: Handbook of technics for aquatic sediment sampling; CRC Press, Boca Raton (1991)
- Nielsen C.V., Buchmann K.: Prolonged in vitro cultivation of *Ichthyophthirius multifiliis* using an EPC cell line as substrate; *Dis. Aquat. Organ.*, 42, 215-219 (2000)
- Öllinger K., Brunmark A.: Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat; *J. Biol. Chem.*, 266, 21496-21503 (1991)
- Öllinger K., Kagedal K.: Induction of apoptosis by redox.cycling quinones; Division of Pathology II, Faculty of Health Science, Linköping University, Sweden (2001); [www.kcl.ac.uk/kis/schools/life\\_sciences/life\\_sci/quinn/apaotosis/OllingerChapter.pdf](http://www.kcl.ac.uk/kis/schools/life_sciences/life_sci/quinn/apaotosis/OllingerChapter.pdf)
- Oral H.B., Arancibia-Carcamo C.V., Haskard D.O., George A.J.T.: A method of determining the cytoprotective effect of catalase in transiently transfected cell lines and in corneal tissue; *Anal. Biochem.*, 267, 196-202 (1999)
- Owens C.W., Belcher R.V.: A colorimetric micro-method for the determination of glutathione; *Biochem. J.*, 94, 705-711 (1965)
- Pardos M., Benninghoff C., Thomas R.L., Khim-Heang S.: Confirmation of elemental sulfur toxicity in the microtox assay during organic extracts assessment of freshwater sediments; *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 188-193 (1999)
- Paschke A., Herbel W., Steinhart H., Franke S., Francke W.: Determination of mono- to tetracyclic aromatic hydrocarbons in lubricating oil; *J. High. Resol. Chromatogr.*, 15, 827-833 (1993)
- Pedrajas J.R., Gavilanes F., Lopez-Barea J., Peinado J.: Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish; *Chem. Biol. Interact.*, 116, 1-17 (1998)
- Pedrajas J.R., Peinado J., Lopez-Barea J.: Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers; *Chem. Biol. Interact.*, 98, 267-282 (1995)
- Percy M.E.: Catalase: an old enzyme with a new role? A review; *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 62, 1006-1014 (1984)
- Räbiger N.: Abwassernachrichten Januar 2002; [www.wasser-wissen.de/abwassernews/2002/januar2002.html](http://www.wasser-wissen.de/abwassernews/2002/januar2002.html)
- Rahman I., Gilmour P.S., Jimenez L.A., McNee W.: Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation; *Mol. Cell. Biochem.*, 234-235, 239-248 (2002)
- Ray L.E., Prescott J.M.: Isolation and some characteristics of glutathione reductase from rabbit erythrocytes; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148, 402-409 (1975)

- Regoli F., Nigro M., Orlando E.: Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*; *Aquatic Toxicol.*, 40, 375-392 (1998)
- Reineke N.: Biotestgeleitete Analytik von ökotoxikologisch relevanten organischen Substanzen in marinen und fluviatilen Sedimenten; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg (2003)
- Rodriguez-Ariza A., Peinado J., Pueyo C., Lopez-Barea J.: Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas; *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 50, 2568-2573 (1993)
- Rossi L., Moore G.A., Orrenius S., O'Brien P.J.: Quinone toxicity in hepatocytes without oxidative stress; *Arch. Biochem. Biophys.*, 251, 25-35 (1986)
- Rushmore T.H., Morton M.R., Pickett C.B.: The antioxidative responsive element; *J. Biol. Chem.*, 226, 11632-11639 (1991)
- Sachs L.: *Angewandte Statistik*; Springer Verlag, 1. Auflage (1984)
- Saito H., Koyasu J., Yoshida K., Shigeoka T., Koike S.: Cytotoxicity of 109 chemicals to Goldfish GFS cells and relationship with 1-octanol / water partition coefficients; *Chemosphere*, 26, 1015-1028 (1993)
- Salizzato M., Bertato V., Pavoni B., Ghirardini A.V., Ghetti P.F.: Sensitivity limits and EC50 values of the vibrio fischeri test for organic micropollutants in natural and spiked extracts from sediments; *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 655-661 (1998)
- Salnikow K., Gao M., Voitkun V., Huang X., Costa M.: Altered oxidative stress responses in nickel-resistant mammalian cells; *Cancer Res.*, 54, 6407-6412 (1994)
- Sato R., Nishibayashi H., Omura T.: Naphthoquinone-dependent oxidation of reduced triphosphopyridine nucleotide by liver microsomes; *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 550-552 (1962)
- Schulz M., Lewand B., Kohlpoth M., Rusche B., Lorenz K.H.J., Unruh E., Hansen P.-D., Miltenburger H.G.: Fischzelllinien in der toxikologischen Bewertung von Abwasserproben, *ALTEX*, 12, 188-195 (1995)
- Segner H., Lenz D.: Cytotoxicity assays with the rainbow trout R1 cell line; *Toxic. In Vitro*, 7, 537-540 (1993)
- Seo S.J., Kim H.T., Cho G., Rho H.M., Jung G.: SP1 and C/EBP-related factor regulate the transcription of human Cu/Zn SOD gene; *Gene*, 178, 177-185 (1996)
- Seung S.A., Lee J.Y., Lee M.Y., Park J.S., Chung J.H.: The relative importance of oxidative stress versus arylation in the mechanism of quinone-induced cytotoxicity to platelets; *Chem. Biol. Interact.*, 113, 133-144 (1998)
- Sies H.: *Oxidative Stress*; Academic Press London (1985)
- Sjölin A.M., Livingstone D.R.: Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalysed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.); *Aquat. Toxicol.*, 38, 83-99 (1997)
- Smith M.T., Evans C.G.: Inhibitory effect of superoxide-generating quinones on superoxide dismutase; *Biochem. Pharmacol.*, 33, 3109-3110 (1984)
- Smith, G.T., Ohl V.S., Litwack G.: Ligandin, the glutathione-S-transferases, and chemical induced hepatocarcinogenesis: a review; *Cancer Res.*, 37, 8-14 (1977)
- Squires E.J.: High performance liquid chromatography analyses of the malondialdehyde content of chicken liver, *Poult. Sci.*, 69, 1371-1376 (1990)
- Storz G., Imlay J.A.: Oxidative stress; *Current Opinion in Microbiology*, 2, 188-194 (1999)

- Storz G., Tartaglia I.A., Ames B.N.: Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation, *Science*, 248, 189-194 (1990)
- Sun Y., Oberley L., Li Y.: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase; *Clin. Chem.*, 34, 497-450 (1988)
- Sun Y.: Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis; *Free Radic. Biol. Med.*, 8, 583-599 (1989)
- Suzuki I., Werkman C.H.: Glutathione and sulfur oxidation by *Thiobacillus Thiooxidans*; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45, 239-244 (1959)
- Suzuki I.: Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus Thiooxidans*; *Biochim. Biophys. Acta*, 104, 359-371 (1965)
- Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A.: Oxidants as stimulators of signal transduction; *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 269-285 (1997)
- Svenson A., Edsholt E., Ricking M., Remberger M., Röttorp J.: Sediment contaminants and microtox toxicity tested in a direct contact exposure test; *Environ Toxicol Water Qual.*, 11, 293-300 (1996)
- Svenson A., Viktor T., Remberger M.: Toxicity of elemental sulfur in sediments; *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 13, 217-224 (1998)
- Tee L.B.G., Davis D.S., Seddon C.E., Boobis A.R.: Species differences in the hepatotoxicity of paracetamol are due to differences in the rate of conversion to its cytotoxic metabolite; *Biochem. Pharmacol.*, 36, 1041-1052 (1987)
- Teerijoki H., Krasnov A., Pitkanen T.I., Molsa H.: Monosaccharide uptake in common carp (*Cyprinus carpio*) EPC cells is mediated by a facilitative glucose carrier; *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 128(3), 483-491 (2001)
- Theobald N., Lange W., Gählert W., Renner F.: Mass spectrometric investigations of water extracts of the river Elbe for the determination of potential inputs into the North sea; *Fresenius J. Anal. Chem.*, 353, 50-56 (1995)
- Thom S.R., Kang M., Fisher D., Ischiropoulos, H.: Release of glutathione from erythrocytes and other markers of oxidative stress in carbon monoxide poisoning; *J. Appl. Physiol.*, 82, 1424-1432 (1997)
- Tietze F.: Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total oxidized glutathione; *Anal. Biochem.*, 27, 502-522 (1969)
- Tillmann M., Schulte-Oehlmann U., Duft M., Markert B., Oehlmann J.: Entwicklung eines Sedimentbiotests mit *Hinia reticula* zur Erfassung von Umweltchemikalien mit geschlechtshormonähnlicher Wirkung; Tagungsband der 5. Deutschsprachigen Tagung der Soc. of Environ. Toxicol. Chem., 5, 10 (2000)
- Timbrell J.A.: Principles of biochemical toxicology; Taylor & Francis, London (1991)
- Tomita M., Okuyama T.: Determination of malondialdehyde in oxidized biological materials by high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr.*, 515, 391-397 (1990)
- Uchiyama M., Mihara M.: Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test; *Anal. Biochem.*, 86, 271-278 (1978)
- Vahl H.H., Karbe L., Westendorf J.: Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: comparison of Salmonella microsome test, arabinose resistance test, and umu-test; *Mutat. Res.*, 394, 81-93 (1997)
- Van der Oost R., Goksoyr A., Celander M., Heida H., Vermeulen N.P.E.: Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical response; *Aquatic Toxicol.*, 36, 189-222 (1996)

- Vandeputte C., Guizon, I., Genestie-Denis I., Vannier B., Lorenzon G.: A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured / isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol; *Cell Biol. Toxicol.*, 10, 415-421 (1994)
- Wallace K.B.: Glutathione-dependent metabolism in fish and rodents; *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 1049-1055 (1989)
- Webb J.L.: Enzyme and metabolic inhibitors. Volume III: Iodoacetate, Maleate, N-Ethylmaleimide, Alloxan, Quinones, Arsencals; Academic Press, London (1966)
- Wheatley J.B., Kelley M.K., Montali J.A., Berry C.O.A., Schmidt D.E.Jr.: Examination of glutathione S-transferase isoenzyme profiles in human liver using high-performance affinity chromatography; *J. Chrom. A*, 663, 53-63 (1994)
- Wilhelm B., Walther U.I., Fichtl B.: Effects of zinc chloride on glutathione und glutathione synthesis rates in various lung cell lines; *Arch. Toxicol.*, 75, 388-394 (2001)
- Wilson R.A., Hart J., Hall T.: The concentration and temporal relationship of acetaminophen-induced changes in intracellular and extracellular total glutathione in freshly isolated hepatocytes from untreated and 3-methylcholanthrene pretreated Sprague-Dawley and Fischer rats; *Pharmacol. Toxicol.*, 69, 205-212 (1991)
- Winston G.W., Di Giulio R.T.: Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms; *Aquat. Toxicol.*, 19, 137-161 (1991)
- Winston G.W.: Oxidants and antioxidants in aquatic animals; *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 173-176 (1991)
- Winters R.A., Zukowski J., Ercal N., Matthews R.H., Spitz D.R.: Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine and other biological thiols by high performance liquid chromatography following derivatization by N-(1-Pyrenyl)maleimide; *Anal. Biochem.*, 227, 14-21 (1995)
- Wischmann H., Steinhart H., Hupe K., Montresori G., Stegmann R.: Degradation of selected PAHs in soil/compost and identification of intermediates; *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 64, 247-255 (1996)
- Wright J., George S., Martinez-Lara E., Carpena E., Kindt M.: Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line; *Mar. Environ. Res.*, 50, 503-508 (2000)
- Yeo H.C., Helock H.J., Chyu D.W., Ames B.N.: Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry; *Anal. Biochem.*, 220, 391-396 (1994)
- Yu K.O., Fisher J.W., Burton G.A.jr, Tillit D.E.: Carrier effects of dosing the H4IIE cells with 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 77) in dimethyl sulfoxide or isooctane, *Chemosphere*, 35, 895-904 (1997)
- Zahn T., Hauck C., Holzschuh J., Braunbeck T.: Acute and sublethal toxicity of seepage waters from garbage dumps to permanent cell lines and primary cultures of hepatocytes from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A novel approach to environmental risk for chemicals and chemical mixtures; *Zb. Hyg.*, 196, 455-479 (1995)
- Zer H., Freedman J., Peisach J., Chevion M.: Inverse Correlation Between Resistance Towards Copper and Towards the Redox-Cycling Compound Paraquat: A Study in Copper-Tolerant Hepatocytes in Tissue Culture; *Free Rad. Biol. Med.*, 11, 9-11 (1991)
- Zhou L.Z., Johnson A.P., Rando T.A.: NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional response to oxidative stress in skeletal muscle cells; *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 1405-1416 (2001)
- Zielinski S., Portner H.O.: Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age; *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 125, 147-160 (2000)



## Poster

**Sierts A., Müller B., Simat T.J., Steinhart H.:** Von der Chemie zur Biotechnologie: Risiken bei der technologischen Herstellung von L-Tryptophan  
Deutscher Lebensmittelchemikertag 1999, Hamburg

**Sierts-Herrmann, A., Lahrssen, A., Biselli, S., Danischewski D., Francke W., Franke S., Gutendorf B., Heinzel N., Hühnerfuss H., Kammann U., Reineke N., Theobald N., Vahl H.H., Westendorf J., Steinhart H.:** Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe: Toxizitätstest-geleitete Analytik – ISIS 6 – Untersuchungen zum oxidativem Stress anhand des Redoxsystems Glutathions  
SETAC German Language Branch 2001, Berlin

**Sierts-Herrmann A., Akkaya F., Kinder A., Steinhart A.:** ISIS – Oxidative stress induced in EPC-cells by sediment extracts from the North Sea and the Baltic Sea  
Society of Environmental Toxicity and Chemistry SETAC Europe 12<sup>th</sup> Annual Meeting, 12.-16. May 2002, Vienna

## Vorträge

**Sierts-Herrmann A., Steinhart H.:** Eignung verschiedener Biomarker zur Beurteilung von oxidativem Stress in einem *in vitro*-Testsystem  
GdCH-Lebensmittelchemische Gesellschaft, Regionalverbandstagung Nord, 19.-20. März 2002, Kiel

**Sierts-Herrmann A., Kinder A., Vahl H.H., Westendorf J., Steinhart H.:** Eignung der ISIS-Biotestbatterie für die toxikologische Untersuchung mariner Sedimentextrakte: Ergebnisse und Perspektiven  
ISIS-Symposium – Biotestgeleitete Identifizierung toxikologisch relevanter Substanzen in marinen Sedimenten: Möglichkeiten und Grenzen, 20.-21. November 2002, Hamburg

## Publikationen

**Simat T.J., Kleeberg K.K., Müller B., Sierts A.:** Synthesis, formation, and occurrence of contaminants in biotechnologically manufactured L-tryptophan, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 467, 469-480 (1999)

**Kammann U., Danischewski D., Vahl H.H., Gutendorf B., Westendorf J., Kinder A., Sierts-Herrmann A., Steinhart H.:** Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe: Toxizitätstest-geleitete Analytik (ISIS), Teil 2: Biologischer Teilbereich, Vortragsband zum Symposium „Aktuelle Probleme der Meeresumwelt“, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie Hamburg 2002

**Sierts-Herrmann A., Kinder A., Akkaya F., Kersten U., Steinhart H.:** Determination of oxidative stress caused by marine sediment extracts, as evaluated by measurement of the cellular glutathione levels in a permanent carp cell line, in prep.

**Sierts-Herrmann A., Steinhart H.:** 9,10-Phenanthrenequinone – an inhibitor of the enzyme glutathione reductase of the permanent fish cell line EPC, in prep.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Arne Sierts-Herrmann, geb. Sierts  
Anschrift: Langenfelderstr. 58  
D-22769 Hamburg  
Geburtsdatum: 29. April 1973 in Husum  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

## Schulbildung

1979-1983 Grundschule Börm/Dörpstedt  
1983-1992 Gymnasium Domschule Schleswig  
Abschluss: Abitur

## Zivildienst

09/1992-11/1993 Werkstatt für Behinderte, Eckernförde

## Studium und Praktika

01/1994-06/1994 Praktikum Flensburger Brauerei  
10/1994-09/1996 Studium der Lebensmittelchemie TU Berlin  
Abschluss: Vordiplom  
10/1996-04/1999 Studium der Lebensmittelchemie Universität Hamburg  
Abschluss: 1. Staatsexamen in Lebensmittelchemie  
02/1998-11/1998 Diplomarbeit im Fachbereich Chemie, Institut für  
Biochemie und Lebensmittelchemie Universität Hamburg  
Abschluss: Diplom in Lebensmittelchemie  
06/1999-12/1999 Werkstudent am Institut für Biochemie und  
Lebensmittelchemie Universität Hamburg  
01/2000-11/2002 Promotionsarbeit „Nachweis von oxidativem Stress in der  
permanenten Zelllinie *Epithelioma papulosum cyprini*  
(EPC) im Zuge der Biotest-dirigierten Fraktionierung  
mariner Sedimentextrakte“ im Rahmen des vom BMBF  
geförderten Verbundvorhabens ISIS (52/F0271A-C).  
06/2003 Promotion

## Berufliche Tätigkeiten

01/2000-11/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Lebensmittelchemie der Universität Hamburg  
seit 12/2002 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Hygiene  
und Umwelt, Hamburger Landesinstitut für  
Lebensmittelsicherheit, Gesundheitsschutz und Umwelt-  
untersuchungen

