

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 S₈, 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 (-CH₃, -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 (-CH₃, -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.