

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. W. K. Lutz

Kombinationswirkungen nicht linearer Dosis-Wirkungsbeziehungen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius – Maximilians – Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Oliver Tiedge
aus Naumburg

Würzburg, Februar 2008

Referentin: Frau Professor Dr. Dr. H. Stopper

Koreferent: Professor Dr. M. Luster

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.08.2008

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern und Onkel Rolf.

GLIEDERUNG:

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	2
1.3 Additive Wirkung, Additive Dosis und Interaktion	2
1.4 Sublineare Dosis-Wirkungsbeziehung	3
1.5 Synergismus und Antagonismus	5
1.6 Definition von Mikrokernen	5
1.7 Mikrokerntest	6
2. MATERIAL UND METHODEN	8
2.1.1 Auswahl der Prüfsubstanzen	8
2.1.2 Chemikalien	9
2.2 Zellkultur	9
2.2.1 Zelllinie	9
2.2.2 Kulturmedium	9
2.2.3 Einfrieren von Zellen	9
2.2.4. Auftauen von Zellen	10
2.2.5. Kultivierung von Zellen	10
2.3 Versuchsdurchführung	11
2.3.1 Inkubation mit den Testsubstanzen	11
2.3.2 Auswahl der entsprechenden Testdosis	11
2.3.3 Weiterbehandlung mit Cytochalasin B	12
2.3.4 Anfertigung der Präparate mittels Cytospin	12
2.3.5 Färbung der Präparate mit Acridin-Orange	13

2.3.6	Kriterien für die Auswertung der Fluoreszenzfärbung	13
2.3.7	Statistische Analyse	13
3.	ERGEBNISSE	15
4.	DISKUSSION	27
5.	ZUSAMMENFASSUNG	30
6.	LITERATUR	32
7.	ANHANG	36

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Der steigende Bevölkerungszuwachs und die immer schneller fortschreitende technische Entwicklung führen dazu, dass Mensch und Umwelt vielfältigen Expositionen unterliegen, über deren langfristigen Auswirkungen vor allem in ihrer Gesamtheit nur wenig bekannt ist. Erkenntnisse über die schädigenden Wirkungen diverser Einzelexpositionen auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit haben zum Beispiel zur Festsetzung von Umweltstandards für *einzelne* chemische und physikalische Agentien geführt (Streffler et al. 2000). Erkenntnisse über Wirkzusammenhänge von *kombinierten* Expositionen, welche die Realität auch besser widerspiegeln, sind jedoch noch wenig erforscht. Um realistische Risikoabschätzungen von karzinogenen und genotoxischen Expositionen besser bewerten zu können, bedarf es Untersuchungen von Kombinationen welche sich von der Einzellstoffbetrachtung loslösen. Zusätzlich sollten Kombinationseffekte im Bereich der „niedrigsten beobachtbaren Effektstärken (LOEL – lowest observable effect levels)“ getestet werden, weil die Exposition von Menschen zu Ihrer Umwelt normalerweise in einem niedrig Dosis Bereich liegt und die Abweichung von der Linearität in diesem niedrig Dosis Bereich wenig wahrscheinlich ist. Dieses Prinzip ist für viele Kombinationen von Gen – toxischen Substanzen in zahlreichen Zellmodellen angewendet worden (Lutz et al. 2002).

1.2 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Hauptfrage dieser Testung von Kombinationen bestand darin, herauszufinden, ob die Toxizität einer Kombination in ihrer Stärke vom erwarteten Effekt der normalen Additivität abweicht.

Bliss (1939) unterscheidet zwischen unabhängigen, ähnlichen und synergistischen Effekten und erklärt dies auf der Grundlage der unterschiedlichen Angriffspunkte bezüglich deren Wirkung. Für die genaue Analyse der Resultate von Kombinationsexperimenten werden die speziellen Termini additive Wirkung, additive Dosis, und Interaktion verwendet (Review Cassee et al., 1998).

1.3 Additive Wirkung, Additive Dosis und Interaktion

Von additiver Wirkung spricht man, wenn der Netto – Effekt der Kombination genauso groß ist wie die Summe der Netto – Effekte der einzelnen Komponenten. Bei additiver Dosis (additiver Konzentrationseffekt) werden alle chemischen Komponenten einer Kombination als über den gleichen Wirkmechanismus agierend betrachtet. Der Kombinationseffekt wird dann durch die Summe der Einzeldosen nach Berücksichtigung und Anpassung der Wirkstärkeunterschiede der Einzelkomponenten festgelegt.

Die U.S. EPA (Environmental Protection Agency) hat den Begriff additive Dosis als Definition für „Nicht-Interaktion“ für die Risikoeinschätzung von Kombinationen gewählt. Deshalb wird Synergismus nur für Effekte verwendet, welche in ihrer Effektstärke die vorhergesagte Effektstärke übertreffen (also stärker als nur additiv wirken)

(Hertzberg, Mac Donell, 2002; Hertzberg , Teuschler, 2002).

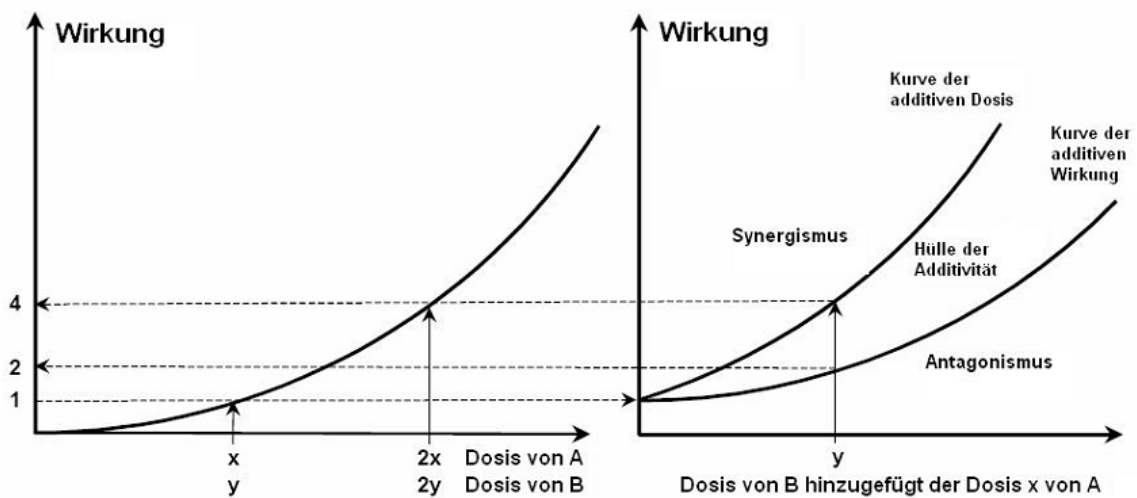
Benutzt man ihre Definition, bedeutet additive Dosis, dass die Dosis-Wirkungs-Kurven der einzelnen Komponenten als identisch betrachtet werden. Dies gilt jedoch nicht für die Dosis-Skala (x-Achse), da hier in Abhängigkeit der unterschiedlichen Wirkpotenz auch eine andere Skalierung vorliegen kann.

Wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, geht man meist davon aus, dass die einzelnen Komponenten einen ähnlichen Wirkmechanismus haben.

1.4 Sublineare Dosis - Wirkungsbeziehung

Ein wichtiger Aspekt bezüglich der additiven Dosis und der Abweichung von der normalen Additivität bezieht sich auf den Fall der sublinearen, das heißt nach oben konvexen Dosis – Wirkungsbeziehung. Dies wurde für verschiedene Komponenten und Substanzen von Burkart und Jung (1998) gezeigt.

Angenommen, die Dosis X einer Chemikalie A erzeugt einen Effekt von 1 Effekt – Einheit und die Dosis Y einer Chemikalie B hat die gleiche Effektstärke von 1 Effekt – Einheit. Wird unter diesen Bedingungen eine Kombination der Dosis X von Chemikalie A mit der Dosis Y von Chemikalie B hergestellt und diese Kombination generiert eine Effektstärke von vier Effekteinheiten, würde man zunächst auf den ersten Blick postulieren, dass A und B synergistisch wirken. Diese Interpretation wäre jedoch nicht korrekt, wenn beide Komponenten A und B alleine eine quadratische Dosis – Wirkungsbeziehung zeigen würden, die ja tatsächlich (bei reiner Addition) in einer Effektstärke von 4 Effekt-Einheiten resultieren würde.



(Quelle: in Anlehnung Lutz et al 2005)

Abb.1 ist eine graphische Darstellung, welche die Notwendigkeit der Unterscheidung zwischen additiver Dosis und additiver Wirkung unter der Bedingung der sublinearen Dosis – Wirkungsbeziehung für die Einzelkomponenten der Kombination zeigt.

Die linke Übersicht zeigt eine quadratische Dosis - Wirkungskurve für beide Substanzen A und B. Die Wirkstärke könnte differieren, in diesem Beispiel ist Dosis X von Substanz A äquivalent zu Dosis Y von Substanz B.

Die rechte Übersicht zeigt zwei Dosis – Wirkungskurven und stellt die Dosis – Wirkung von B addiert zur Dosis X von Substanz A dar. Zwei Kurven sind dargestellt. Die untere Kurve beschreibt die Situation, in der B eine Wirkung hervorruft, die unabhängig von dem von A bewirkten Prozess ist. Die Kurve hat die selbe Form wie die in der Übersicht auf der linken Seite, allerdings mit dem Unterschied, dass sie auf der y-Achse nicht bei Effektstärke 0, sondern Effektstärke 1 (1 Effekt – Einheit) beginnt. Auf dieser Grundlage würde bei Addition von Dosis y von B und Dosis x von A eine Effektstärke von 2 Effekt-Einheiten resultieren, wie durch die betreffende gestrichelte Linie gezeigt. Die obere Kurve beschreibt die Situation, in der B auf die gleiche Art und Weise wie A wirkt. Die Addition von B bewirkt einen steileren Anstieg im Kurvenverlauf, wie in der linken Abbildung dargestellt wurde. Der Start ist dennoch bei Effektstärke 1, aber der Anstieg ist steiler im Sinne der dargestellten

quadratischen Funktion. Für die Dosis y von B addiert zur Dosis x von A resultiert daraus eine Effektstärke von 4 Effekt – Einheiten, aber dies ist dennoch kein Ergebnis synergistischer Interaktionen von A und B.

1.5 Synergismus und Antagonismus

Die zwei Kurven markieren die Grenzen der „Hülle der Additivität“, also den Bereich, innerhalb dessen man von Additivität sprechen kann. Jedoch nur außerhalb dieser Grenzen der beiden Kurven, kann eine Interaktion als synergistisch oder antagonistisch bezeichnet werden. Während diese Aspekte vom Konzept her plausibel erscheinen, sind Beobachtungen und Untersuchungen diesbezüglich selten (Doty et al. 1992, Mentzer et al. 1999) und sind bisher noch nicht durch spezifische Experimente bekräftigt worden.

Deshalb präsentiere und analysiere ich hier Daten von Experimenten, die zu diesem speziellen Zweck geplant und durchgeführt wurden. Sie basieren auf der Erzeugung von Mikrokernen bei L 5178Y Maus – Lymphom – Zellen zur Prüfung der Gentoxizität von aus zwei Komponenten bestehenden Kombinationen, die für sich allein jeweils eine sublineare Dosis – Wirkungsbeziehung zeigen.

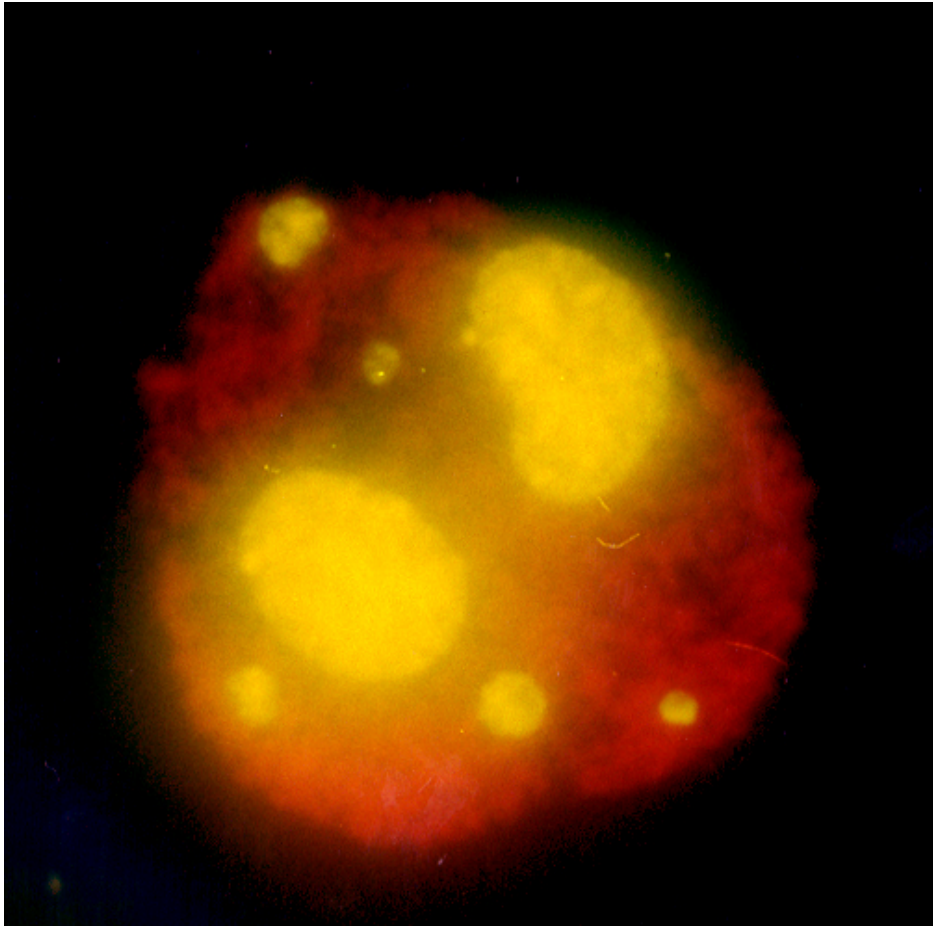
1.6 Definition von Mikrokernen

Mikrokerne sind im Zytoplasma von Zellen gelegene, chromatinhaltige Formationen, welche während der Mitose gebildet werden können. Sie liegen getrennt vom Kernmaterial vor und besitzen eine Größe von $1/20$ bis $1/4$ des dazugehörigen Zellkerns. Eine Verbindung zwischen Mikrokernen und Zellkern ist nicht zu erkennen. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (Schiffmann und De Boni, 1991) lassen Mikrokerne strukturell als Interphasekerne mit umgebener Doppelmembran (Lamina und Nukleoporen) und einer Differenzierung in Euchromatin und Heterochromatin erkennen. Der Bildungsweg der Mikrokerne ist noch nicht vollständig geklärt, wobei Annahmen davon ausgehen das es sich um Absonderungen chromosomaler Fragmente

nach der Bildung von Chromosomenaberrationen oder um Chromosomenfehlverteilungen während der Mitose handeln könnte (Schmuck et al., 1988; Tucker und Barrett, 1986). Für den weiteren Weg des entstandenen Mikrokernes besteht ebenso noch Klärungsbedarf. Vermutungen gehen davon aus, dass ein Teil der Mikrokerne während der nächsten Mitose wieder in den Zellkern reintegriert werden (Gustavino et al., 1994) oder enzymatisch abgebaut werden (Obe und Beck, 1982). Tatsache ist jedoch, dass Mikrokerne gehäuft in kanzerogenen Geweben auftreten (Brenner et al., 1993; Garewal et al., 1993; Rosin, 1993). Hierbei wird angenommen, dass die Mikrokernbildung eventuell ein Versuch der Zelle ist, genomische Schäden zu eliminieren (Eckert, 1996) oder zur weiteren Steigerung der chromosomalen Destabilität des Tumors beitragen (Stopper 1995).

1.7 Mikrokerntest

In der Genotoxizitätsprüfung spielt der Mikrokerntest neben dem Einsatz von Mutagenitätstests (Ames – Test) im Rahmen internationaler Empfehlungen zum Nachweis von Chromosomenschäden eine wichtige Rolle (Combes 1992). Chromosomale Mutationen sind durch Mutationstests nur schwer nachweisbar, durch Bildung von Chromosomenfragmenten oder Chromosomenfehlverteilungen jedoch dem Nachweis mittels Mikrokerntests zugänglich. So können bei vielen Karzinogenen hohe prädiktive Werte im Mikrokerntest erzielt werden (Fenech 1991, Fritzenschaf 1993).



Doppelkernige Zelle mit Mikrokernen.

2. Material und Methoden

2.1.1. Auswahl der Prüfsubstanzen

Zunächst mussten Substanzen gefunden werden, welche im in vitro Mikrokerntest eine nichtlineare Dosis-Wirkungsbeziehung aufweisen. In der publizierten Literatur findet sich jedoch nur selten eine Dosis-Wirkungsbeziehung, welche mit der Absicht erstellt wurde, eine entsprechende Beziehung aufzuzeigen, die auch zusätzlich mit unseren Versuchsbedingungen vergleichbar wäre. Es wurden folgende Substanzen ausgewählt, welche in publizierten Daten oder eigenen Beobachtungen zunächst ausreichende Hinweise für eine Nichtlinearität gaben:

1. Aphidicolin
2. Ethylmethansulfonat (EMS)
3. Genistein
4. ICRF 193
5. Methylmethansulfonat (MMS)
6. Methyl-Nitro-Nitroso-Guanidin (MNNG)
7. Methyl-Nitroso-Harnstoff (MNU)
8. Mitomycin C (MMC)
9. Nitroquinolin-N-Oxid (NQO)
10. Vinblastin

In ersten eigenen Experimenten mit Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung (Behandlung von L5178Y Maus Lymphomzellen mit der jeweiligen Testsubstanz) konnte nur für drei Modellmutagene eine zuverlässig reproduzierbare, klar von Linearität abweichende Dosis-Wirkungsbeziehung gezeigt werden:

die alkylierenden Verbindungen MNU und MMS, sowie Genistein als ein Phytoöstrogen der Gruppe der Isoflavonoide, das Aktivitäten als Topoisomerase II Inhibitor aufweist.

2.1.2. Chemikalien

Die zur Zellkultivierung, sowie zur Herstellung der Färbungen benötigten Laborchemikalien wurden von der Firma Sigma Chemical, Taufkirchen bezogen, ebenso die Testsubstanzen MMS, MNU und Genistein.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zelllinie

Die verwendeten Maus – Lymphom – Zellen L 5178Y, Klon 3.7.2c (Clive et al.,1972) wurden von W.J. Caspary, National Institute of Environmental Health Sciences, USA zur Verfügung gestellt.

2.2.2. Kulturmedium

Die Maus-Lymphom-Zellen wurden im Medium RPMI 1640 unter Zusatz folgender Substanzen in Kultur gehalten:

- 10 % hitzeinaktiviertes Pferdeserum
- 107 µg Natrium Pyruvat
- 0,25 mg/ml L-Glutamin
- 10.000 IU/ml Penicillin
- 10.000 µg/ml Streptomycin

2.2.3. Auftauen von Zellen

Ein Zentrifugenröhrchen (Greiner GmbH, Nürtingen) wird vor dem Auftauvorgang mit 5 ml Kulturmedium befüllt. Dem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Aufbewahrungsbehälter werden die eingefrorenen Zellen entnommen und im Wasserbad bei 37°C langsam aufgetaut. Unter der Sterilbank (Gelaire BH 26, Flow Laboratories) wird die mit 70%igem Alkohol desinfizierte Ampulle geöffnet und der Zellinhalt in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen gegeben.

Die Trennung der Zellen von dem dimethylsulfoxidhaltigem Einfriermedium erfolgt mittels Zentrifugation (Runne Zentrifuge 100-2 K-TJ) mit 1000rpm für die Dauer von 5 Minuten. Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet in frisches Nährmedium in einer Zellkulturflasche (25cm³, Greiner GmbH, Nürtingen) eingebracht.

2.2.4. Einfrieren von Zellen

Ein spezielles Einfriermedium (Kulturmedium dem 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt werden) wird zusammen mit den Einfrierampullen im Eisbad vorgekühlt. Der Zellkulturflasche werden nach mehrfachem resuspendieren 5 ml entnommen und im Zentrifugenröhrchen 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in 1,8 ml des vorbereiteten Einfriermediums in die Ampullen eingeführt. Ein stufenweiser Einfriervorgang ist zur Schonung der Zellen notwendig. Zunächst werden die Ampullen für 2 Stunden im Gefrierschrank auf -20°C gekühlt und in weiteren 8 Stunden bei -70°C gefroren. Zur dauerhaften Aufbewahrung können anschließend die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

2.2.5. Kultivierung der Zellen

Bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt werden die Zellen im Brutschrank (Heraeus) in Suspensionskultur gehalten. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt zehn Stunden, wodurch dreimal pro Woche eine entsprechende Verdünnung durchgeführt werden muss. Die Zelldichte wird in der Kulturflasche (25cm³) mittels Inversionsmikroskop (Diavert, Leitz, Wetzlar) beurteilt, nachdem die Zellen durch Resuspendieren vereinzelt wurden. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wird die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen eingebracht und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wird das Zellpellet in frisches Nährmedium (37 °C) überführt.

2.3. Versuchsdurchführung

2.3.1. Inkubation mit den Testsubstanzen

Die Substanzen Methylmethansulfonat (MMS), Methyl-Nitroso-Harnstoff (MNU) und Genistein (GEN) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) in Lösung gebracht (DMSO Endkonzentration $\leq 1\%$). Die Zellkultur wurde zu einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro ml (exponentielle Wachstumsphase) verdünnt und umgesetzt. Um pathologische Einflüsse (Kontamination mit Pilzen; Bakterien) auszuschließen, wurde mittels Mikroskop die Zellqualität beurteilt. In 5 ml Kulturansatz wurde jeweils anschließend 50 μ l Testlösung eingebracht. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Zellkultur zweimal gewaschen. Die Zellen wurden mit 1000 rpm 5 min abzentrifugiert und mit frischem Nährmedium versorgt, wobei das abzentrifugierte Medium dekantiert und verworfen wurde. Mit dieser Prozedur wurde ein weiteres Einwirken der Testsubstanzen und Lösungsmittel ausgeschlossen.

2.3.2. Auswahl der entsprechenden Testdosis

Aus der Literatur wurden zunächst ungefähre Dosisbereiche für die zu testenden Substanzen und der zu erwartenden Wirkung entnommen und in Einzelexperimenten Dosis-Wirkungskurven mit der Induktion von Mikrokernen der Einzelsubstanz erstellt. An die niedrigste Dosis mit einem auftretenden Effekt und an die höchste Dosis wurde in einigen weiteren Experimenten herangearbeitet. Der obere Dosisbereich stellte die Grenze dar, an der eine Zelltoxizität erreicht wurde, welche eine Zellkernteilung und Mikrokerninduktion kaum noch zu erkennen ließ. Für alle drei Substanzen konnten Dosen in einem niedrigen, mittleren und hohen Effektbereich definiert werden, welche ähnliche Effekte der Mikrokernbildung hervorrufen.

Die folgenden Konzentrationsschritte (Dosislevel) 0-1-2-3 konnten für die Hauptexperimente ermittelt werden:

MMS: 0, 100, 200, 300 μM ;

MNU: 0, 700, 1400, 2100 μM ;

GEN: 0, 15, 30, 45 μM .

Die Mischungen schlossen die vier möglichen Kombinationen des niedrigen und mittleren Dosislevel ein, jedoch nicht den Hochdosisbereich. Jeweils zwei voneinander unabhängige Experimente für jedes Kombinationspaar wurden durchgeführt. Parallel dazu wurden Kontrollen in doppelter Ausführung mitgeführt.

2.3.3. Weiterbehandlung mit Cytochalasin B

Nach der Reinigung der mit den Testsubstanzen beimpften Zellen wurde der Zytokinaseinhibitor Cytochalasin B mit einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugegeben. Cytochalasin B hemmt die Zellteilung nach erfolgter Mitose, so dass die Zellen im Zweikernstadium verbleiben. So wird gewährleistet, dass bei der Auswertung nur Mikrokerne in der mitotisch aktiven Zellpopulation berücksichtigt werden. Nach dieser Behandlung wurden die Maus- Lymphom-Zellen für weitere 20 Stunden im Brutschrank kultiviert (Recovery-Time).

2.3.4. Anfertigung der Präparate mittels Cytospin

Zur Auswertung der Zellen wurden diese durch das Cytospin-Gerät (Shandon Cytoclip, Pittsburg, USA) auf gereinigte Objektträger zentrifugiert (1000 rpm 5 min). Je nach Zelldichte, welche im Coulter-Counter bestimmt wurde, konnte eine definierte Menge (ca. 20.000 Zellen) Zellkultur in den Tropfentrichter des Cytospin-Gerätes pipettiert werden. Ein spezieller Lochfilter (Schleicher und Schuell, Göttingen) nahm dann das überschüssige Medium auf. Das Präparat mit den darauf zentrifugierten Zellen wurde anschließend für mindestens zwei

Stunden im Methanol-Bad bei -20°C fixiert. Eine Lagerung ist so auch über Wochen möglich.

2.3.5. Färbung der Präparate mit Acridin – Orange

Nach ausreichender Fixierung wurden die Präparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridin-Orange ($62,5 \mu\text{g/ml}$ in Sörensen-Puffer, pH 6,8) im Färbebad für 5 min behandelt und anschließend zweimal in Sörensen-Puffer für jeweils 5 min zum Waschen getaucht. Diese Präparate mussten daraufhin, wegen Gefahr der Austrocknung sofort ausgewertet werden.

2.3.6. Kriterien für die Auswertung der Fluoreszenzfärbung

In 1250facher Vergrößerung wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Nikon Laborphot-2A/2) ausgewertet. Nach Behandlung mit Cytochalasin B kann man die während der Mitose entstandenen Mikrokerne (in doppelkernigen Zellen) von denen unterscheiden, welche schon vor dem Versuch existent waren. So wird die Mikrokern-Auswertung auf die Zellpopulation beschränkt, die sich seit Substanzexposition genau einmal geteilt hat. Mikrokerne, ca. $1/20$ bis $1/4$ der Größe des Hauptkernes, sollen keine Verbindung zum Hauptkern haben und diesem in Struktur und Farbintensität annähernd entsprechen.

2.3.7 Statistische Analyse

Die Hypothese der Wirkaddition (Addition der Netto-Effekte der Einzelkomponenten) wurde mit dem "Sign Test" geprüft. Gemäß der Null-Hypothese der additiven Wirkung und der Annahme eines gleichmäßigen Fehlers sind die tatsächlich beobachteten Zellen mit Mikrokernen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit größer oder kleiner als die voraus berechnete Anzahl der Zellen mit Mikrokernen der Wirkaddition. Die Hypothese der Dosisaddition wurde mit einem linearen Modell mit der Verwendung des

Logarithmus des Scores MN zum Linearisieren der sublinearen Dosis –Wirkung der Komponenten in paralleler Anordnung getestet.

Für die Prüfung der Abweichung der Dosisaddition wurde für Wechselwirkung mit:

$$\text{Log}_{10}(MN) = a + b \cdot A + c \cdot B + d \cdot A \cdot B + \epsilon \text{ (Fehler-Term)}$$

getestet.

Die Zeichen A und B stehen für die Konzentration der beiden Chemikalien, A*B ist der Interaktionsterm. Die Koeffizienten a, b, c und d werden durch lineare Regression abgeschätzt. Der Fehler war proportional zum MN-Score.

Für die statistische Aufarbeitung der Wiederholungsexperimente wurden bei den Parametern Zufallseffekte berücksichtigt, wenn dies zu einer Optimierung der Modellvorstellung diene.

Bemerkung: Die Abwesenheit einer Interaktion (d=0) ist äquivalent zur Dosisaddition, was durch den Ersatz von B durch A durch die Normalisierung mit c/b (letzte Zeile) gezeigt wird.

$$\begin{aligned} MN &= 10^{(a + b \cdot A + c \cdot B + \epsilon)} \\ &= 10^a * 10^{(b \cdot A)} * 10^{(c \cdot B)} * 10^\epsilon \\ &= 10^a * 10^{(b \cdot A)} * 10^{(b \cdot c/b \cdot B)} * 10^\epsilon \\ &= 10^a * (10^b)^A * (10^b)^{(c/b \cdot B)} * 10^\epsilon \\ &= 10^a * (10^b)^{(A + c/b \cdot B)} * 10^\epsilon. \end{aligned}$$

3. Ergebnisse

In Pilotstudien mit einer Zahl von gentoxischen Substanzen wurde gefunden, dass die zwei methylierenden Substanzen MMS und MNU und der Topoisomerase II Hemmer Genistein (GEN) reproduzierbare sublineare (nach oben konvexe) Dosis – Wirkungsbeziehungen für Mikrokernbildung in L5178Y Maus – Lymphom – Zellen erzeugen. Diese gentoxischen Substanzen wurden für die Untersuchung von Kombinationseffekten von folgenden aus zwei Komponenten bestehenden Mixturen ausgewählt: MMS+MNU, MMS+GEN und MNU+GEN. Der Cytochalasin B Test wurde zusätzlich verwendet. Cytochalasin B hemmt die Zellteilung nach der Kernteilung, so dass die Zelle im binukleären Stadium verbleibt. Da Mikrokerne nur in lebenden, teilungsfähigen Zellen bestimmt werden sollen (Stopper, 1995), ist es damit möglich, durch das Verhältnis einkerniger zu doppelkernigen Zellen zu erkennen, ob neben gentoxischen Effekten auch zytotoxische Effekte auftreten. Treten also ab einer bestimmten Dosis vorrangig einkernige Zellen auf, ist anzunehmen, dass die Testsubstanz den gesamten Zellzyklus inhibiert und diese Dosisgröße für eine weitergehende Untersuchung und Bearbeitung der Fragestellung in dieser Arbeit nicht verwendet werden kann.

Die Übersicht von **Abbildung 2 a-c** zeigt die reproduzierbaren sublinearen Dosis – Wirkungskurven für die Erzeugung von Mikrokernen in vier unabhängigen Experimenten.

Der Grad der Nichtlinearität war bei MMS am höchsten, bei MNU am niedrigsten. Logarithmische Transformationen der Wirkungsachse linearisierten die Kurven (siehe unterer Teil **Abbildung 2 a-c**), welche die Voraussetzung für die Nutzung der linearen Regression beim Test auf Interaktion war.

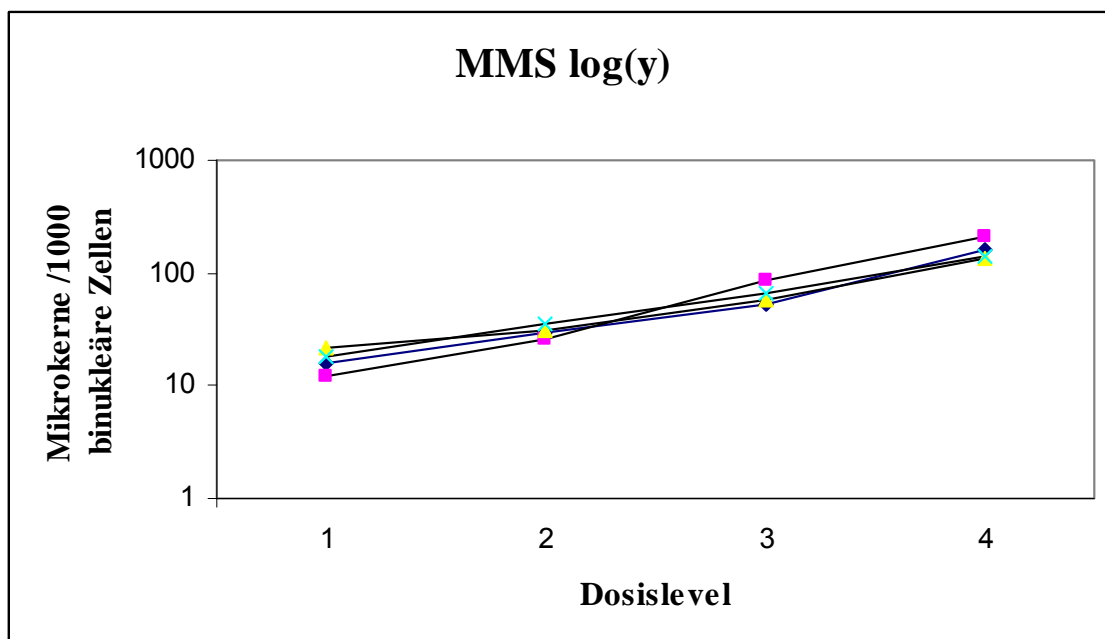
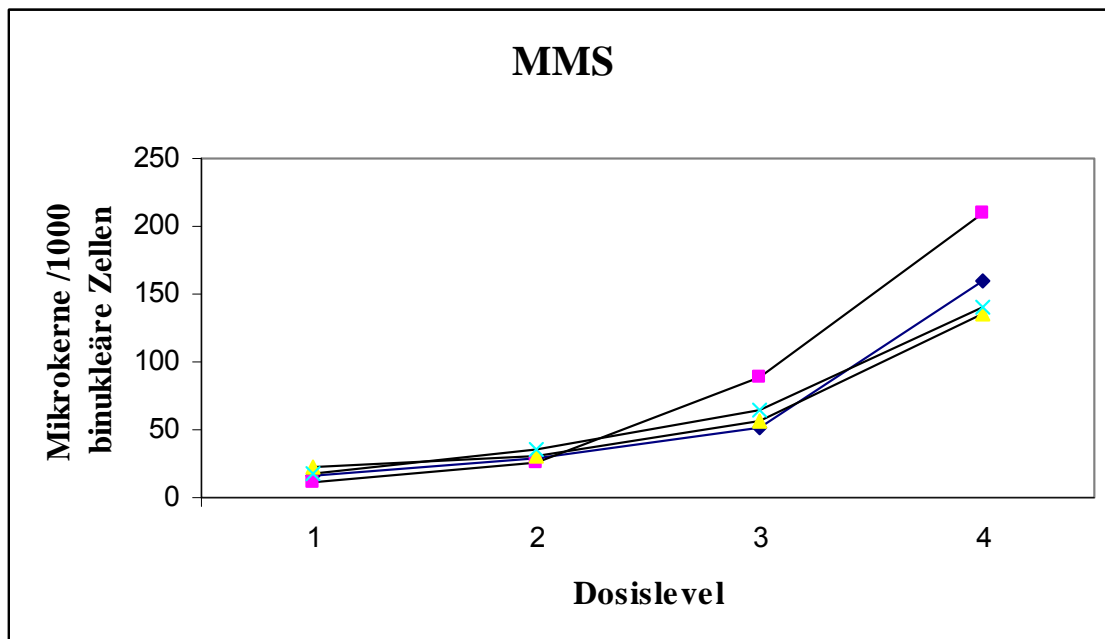


Abb. 2 a

Dosis-Wirkungskurven für Methylmethansulfonat (MMS) mit der Induktion von Mikrokernen in L5178Y Maus-Lymphomzellen. Die Dosislevel stehen für folgende Konzentrationsschritte: 0, 100, 200, 300 μM für MMS. Die Felder auf der rechten Seite stellen den Logarithmus der y-Achse dar und lösen nach Nichtlinearität auf.

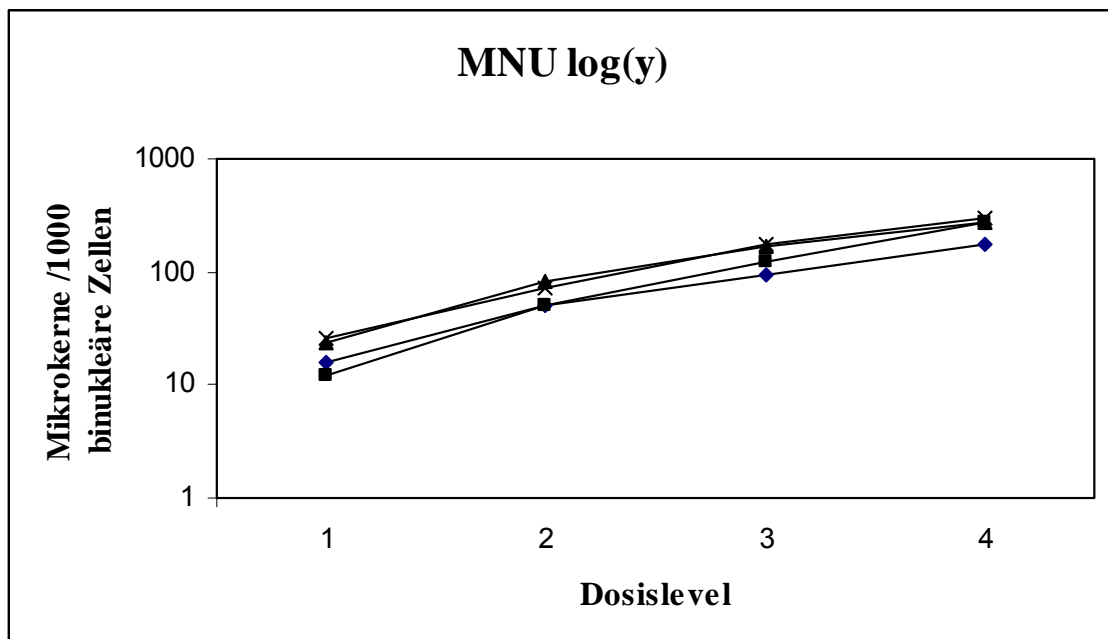
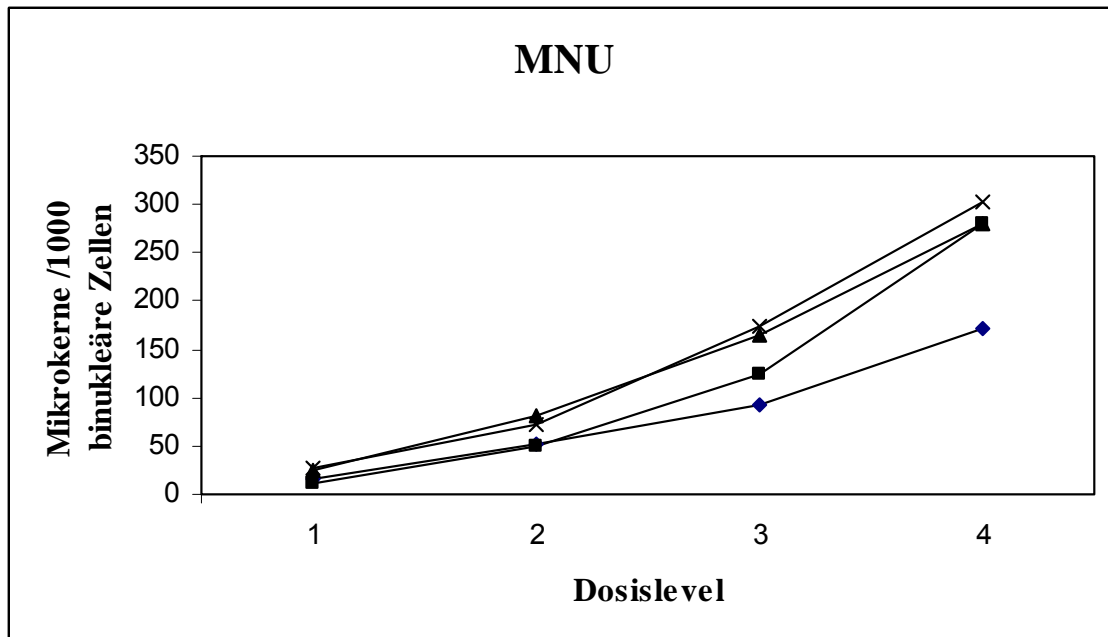


Abb. 2 b

Dosis-Wirkungskurven für Methyl-Nitro-Harnstoff (MNU) mit der Induktion von Mikrokernen in L5178Y Maus-Lymphomzellen. Die Dosislevel stehen für folgende Konzentrationsschritte: 0, 700, 1400, 2100 μM für MNU. Die Felder auf der rechten Seite stellen den Logarithmus der y-Achse dar und lösen nach Nichtlinearität auf.

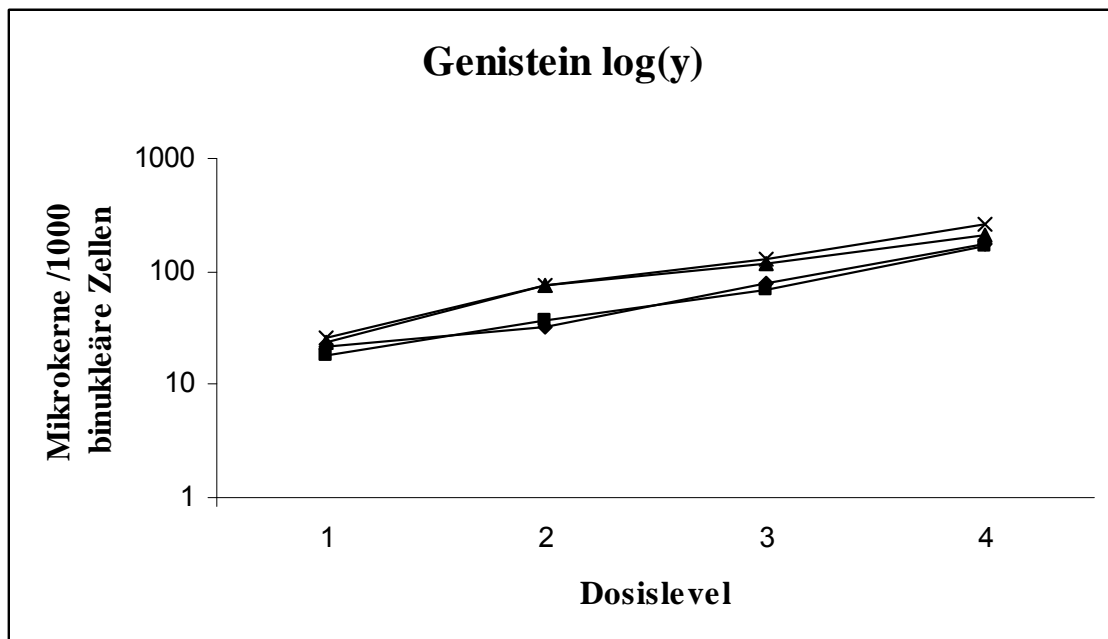
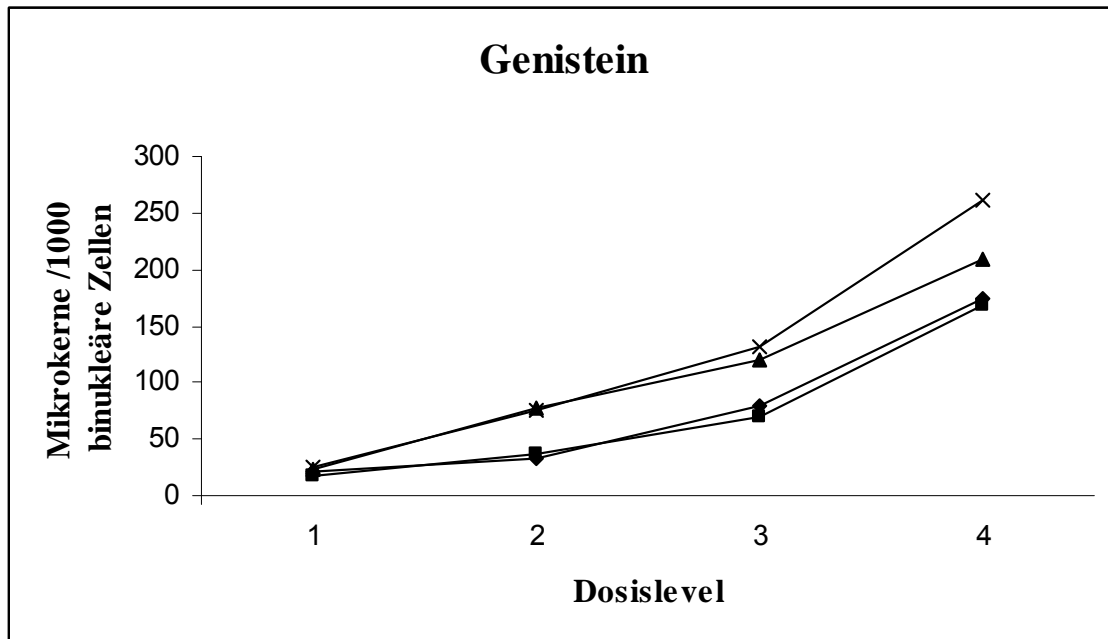


Abb. 2 c

Dosis-Wirkungskurven Genistein (GEN) mit der Induktion von Mikrokernen in L5178Y Maus-Lymphomzellen. Die Dosislevel stehen für folgende Konzentrationsschritte: 0, 15, 30, 45 μM für GEN. Die Felder auf der rechten Seite stellen den Logarithmus der y-Achse dar und lösen nach Nichtlinearität auf.

Nummerische Ergebnisse von allen Experimenten, inklusive der binären Kombinationsuntersuchungen mit MMS+GEN, MMS+MNU und MNU+GEN sind in Tabelle 1, 2 und 3 dargestellt. Die Spalten 3 und 5 zeigen die Anzahl von Zellen mit Mikrokernen pro 1000 binukleären Zellen. Die Spalten 5 und 6 zeigen die netto – behandlungsbezogene Steigerung durch die Komponenten (Zeilen 3-5 und 6-8) und das Resultat berechnet für die additive Wirkung (Zeilen 9-12; Mittelwert der Kontrollen plus die 2 korrespondierende Netto-Effekte).

Der Vergleich der Zahlen in den Zeilen 9-12, Spalte 3 vs. 4 und 5 vs. 6 liefert direkte Informationen darüber, ob das Ergebnis des Experimentes mit additiver Wirkung übereinstimmt, welche einer einfachen, unabhängigen Wirkung der beiden Komponenten folgt. Eine additive Wirkung wurde für alle Kombinationen aus zwei Komponenten auf der Grundlage des „Sign –Tests“ abgelehnt. Für die Kombination aus MMS+MNU (**Tabelle 1**) und MMS+GEN (**Tabelle 2**) war das beobachtete Ergebnis höher als die Summe der Nettoeffekte. Für die Kombination von MNU+GEN (**Tabelle 3**) liegt der Kombinationseffekt signifikant unter der additiven Wirkung ($p=0.008$). Die Nettoeffekte berechnen sich aus Anzahl des Gesamteffektes abzüglich der durchschnittlich in den Kontrollen auftretenden mikrokernhaltigen Zellen (Spontanrate).

Tabelle 1

Induktion von Mikrokernen in L5178Y Maus Lymphom Zellen als Reaktion der Einzelsubstanzen Methylmethansulfonat (MMS), Methyl-Nitroso-Harnstoff (MNU) und deren Kombination.

Konzentration (μM)		Experiment 1		Experiment 2	
MMS	MNU	Anzahl der MK-Zellen ^a	Nettoeffekte	Anzahl der MK-Zellen ^a	Nettoeffekte
0	0	16	—	11	—
0	0	16	—	13	—
100	0	29	13	26	14
200	0	52	36	88	76
300	0	160	144	210	198
0	700	51	35	50	38
0	1400	93	77	125	113
0	2100	172	156	279	267
			Addition der Nettoeffekte		Addition der Nettoeffekte
100	700	79	64	141	64
100	1400	131	106	256	139
200	700	200	87	230	126
200	1400	235 ^b	129	253	201

^a Anzahl binukleärer Zellen, welche ein oder mehrere Mikrokerne pro 1000 binukleärer Zellen zeigen.

^b Die Kombination 200 + 1400 wurde nicht für die Analyse der Dosisaddition berücksichtigt, weil der Wert höher als der Maximalbereich der Einzelkomponente liegt.

Tabelle 2

Induktion von Mikrokernen in L5178Y Maus Lymphom Zellen als Reaktion der Einzelsubstanzen Methylmethansulfonat (MMS), Genistein (GEN) und deren Kombination.

Konzentration μM		Experiment 3		Experiment 4	
MMS	GEN	Anzahl der MK-Zellen	Nettoeffekte	Anzahl der MK-Zellen	Nettoeffekte
0	0	21	—	16	—
0	0	23	—	20	—
100	0	31	9	36	18
200	0	57	35	65	47
300	0	135	113	140	122
0	15	32	10	37	19
0	30	79	57	69	51
0	45	175	153	168	150
			Addition der Nettoeffekte		Addition der Nettoeffekte
100	15	47	41	61	55
100	30	89	88	91	87
200	15	85	67	106	84
200	30	152	114	145	116

* Anzahl binukleärer Zellen, welche ein oder mehrere Mikrokerne pro 1000 binukleärer Zellen zeigen.

Tabelle 3

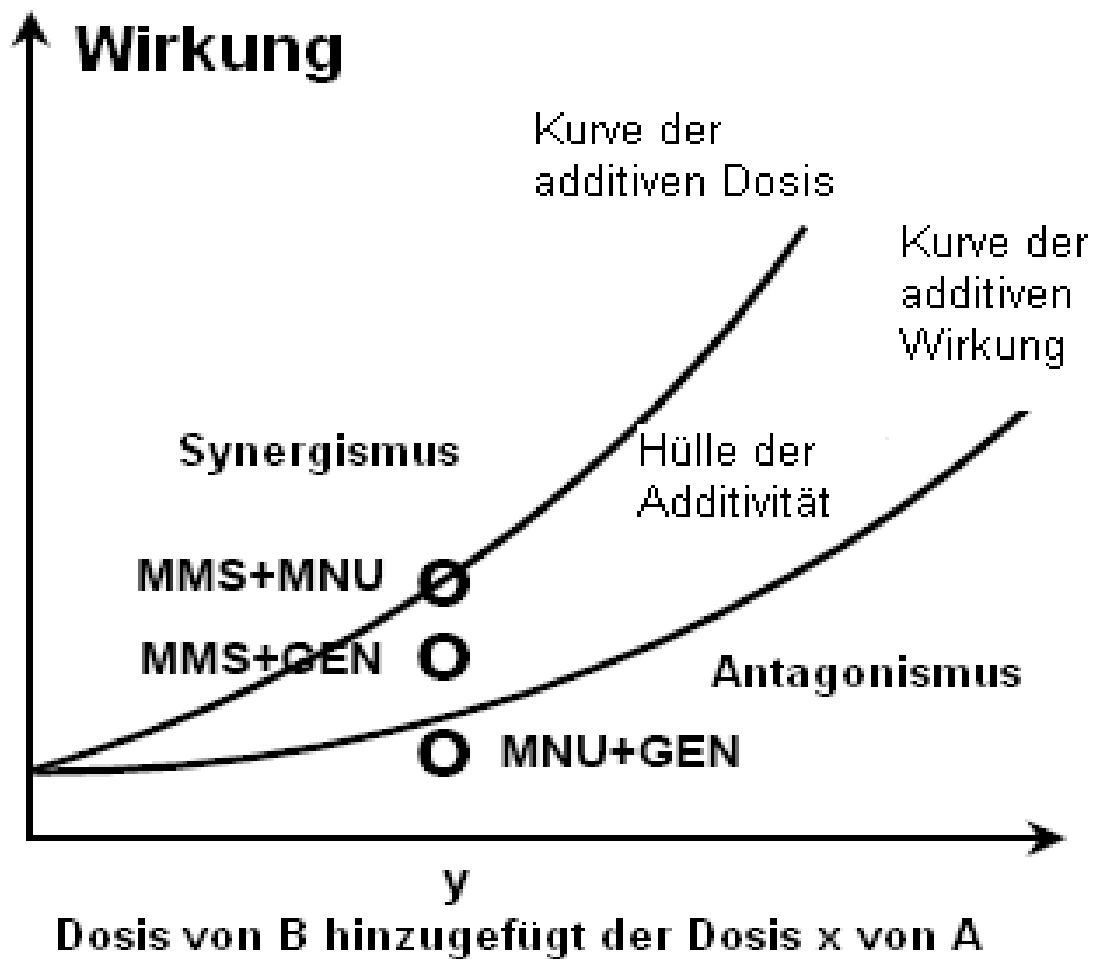
Induktion von Mikrokernen in L5178Y Maus Lymphom Zellen als Reaktion der Einzelsubstanzen Methyl-Nitroso-Harnstoff (MNU), Genistein (GEN) und deren Kombination.

Konzentration μM		Experiment 5		Experiment 6	
MNU	GEN	Anzahl der MK-Zellen*	Nettoeffekte	Anzahl der MK-Zellen*	Nettoeffekte
0	0	24	—	25	—
0	0	24	—	27	—
700	0	82	58	73	47
1400	0	165	141	175	149
2100	0	279	255	302	276
0	15	77	53	76	50
0	30	120	96	131	105
0	45	209	185	261	235
			Addition der Nettoeffekte		Addition der Nettoeffekte
700	15	74	135	114	123
700	30	138	178	112	178
1400	15	206	218	187	225
1400	30	224	261	258	280

* Anzahl binukleärer Zellen, welche ein oder mehrere Mikrokerne pro 1000 binukleärer Zellen zeigen.

Ohne die Information über die Dosis - Wirkungsbeziehungen der Komponenten würde man einen synergistischen Effekt von MMS+MNU und MMS+GEN und einen antagonistischen Effekt von MNU+GEN postulieren. Für die Analyse der Hypothese einer additiven Dosis unter der Annahme von parallelen nichtlinearen Dosis – Wirkungskurven wurde ein exponentielles Modell basierend auf den Logarithmen der Wirkstärken gewählt. Auf das Vorliegen eines Interaktionsterms ist mittels linearer Regression getestet worden.

Für die Kombination MMS+MNU war der daraus ermittelte Koeffizient des Interaktionsterms $A*B$ nicht signifikant ($p=0.96$), so dass das additive Dosis – Modell nicht verworfen werden konnte. Dies bedeutet auch, dass der Effekt einer Kombination aus MMS und MNU auf der Kurve der additiven Dosis liegen könnte und nicht synergistisch sein könnte, wie es durch den Test auf additive Wirkung gezeigt wurde. Dies ist an der untenstehenden Abbildung dargestellt, welche graphisch die Kombinationseffekte der drei binären Kombinationen abbildet.



(Quelle: in Anlehnung Lutz et al 2005)

Abb.3

Darstellung der Kombinationseffekte für die Induktion von Mikrokernen in L5178Y Maus Lymphom Zellen als Reaktion von Methylmethansulfonat (MMS), Methyl-Nitroso-Harnstoff (MNU) und Genistein (GEN) in deren jeweiliger Kombination.

Für die Kombination von MMS und MNU ergab das exponentielle Modell einen hoch signifikanten negativen Koeffizienten d des Interaktionsterms ($p=4.6 \cdot 10^{-6}$). Zusammen mit der Ablehnung der additiven Wirkung (siehe oben) kann somit postuliert werden, dass der Kombinationseffekt in der Mitte der „Hülle der Additivität“ liegt und somit signifikant abseits beider Kurven ist. Für die Kombination von MNU + GEN wurde der Antagonismus bereits für die additive Wirkung gezeigt. Daher ist es nicht überraschend, dass die Testung auf additive Dosis auch einen signifikant negativen Koeffizienten d für den Interaktionsterm ($p=5.4 \cdot 10^{-6}$) hervorbrachte (Kombination im Feld Antagonismus).

Der Prozentsatz von binukleären Zellen für das Maß des zytostatischen Effektes der Testsubstanz (je mehr, desto geringer!) zeigte eine ähnliche Dosis abhängige Verminderung mit MMS und MNU von 82% in den Kontrollen auf 34% und 28% bei der höchsten Dosis von MMS bzw. MNU. Genistein allein bewirkte nur eine geringe Reduktion von 84% auf 73% (**Tabelle 4**). Die Verminderung, die durch die Kombination von MMS bzw. MNU mit GEN auftrat, wurde durch den Effekt der methylierenden Substanz dominiert. Daher kann der Unterschied von MMS und MNU jeweils in Kombination mit GEN nicht durch den unterschiedlichen Anteil an binukleären Zellen erklärt werden.

Tabelle 4

Anzahl binukleärer L5178Y Maus Lymphom Zellen als Reaktion mit den Einzelsubstanzen Methyl-Nitroso-Harnstoff (MNU), Genistein (GEN), Methylmethansulfonat (MMS) und Behandlung mit Cytochalasin B.

Konzentration (μM)		Experiment 1	Experiment 2
MMS	MNU	Doppelkernhaltige Zellen pro 1000 Zellen	Doppelkernhaltige Zellen pro 1000 Zellen
0	0	755	875
0	0	781	862
100	0	746	829
200	0	601	791
300	0	266	540
0	700	739	784
0	1400	579	551
0	2100	341	251

Konzentration (μM)		Experiment 3	Experiment 4
MMS	GEN	Doppelkernhaltige Zellen pro 1000 Zellen	Doppelkernhaltige Zellen pro 1000 Zellen
0	0	876	806
0	0	891	821
100	0	849	792
200	0	749	552
300	0	335	213
0	15	824	744
0	30	809	740
0	45	767	733

Konzentration (μM)		Experiment 5	Experiment 6
MNU	GEN	Doppelkernhaltige Zellen pro 1000 Zellen	Doppelkernhaltige Zellen pro 1000 Zellen
0	0	823	835
0	0	819	821
700	0	708	813
1400	0	531	581
2100	0	248	288
0	15	817	769
0	30	740	775
0	45	694	713

4. Diskussion

Drei signifikant unterschiedliche Arten von Kombinationseffekten konnten für die Induktion von Mikrokernen mittels binären Kombinationen von den drei gentoxischen Substanzen MMS, MNU und GEN dargestellt werden. MMS + MNU war vereinbar mit additiver Dosis; MMS + GEN lag zwischen additiver Dosis und additiver Wirkung; MNU und GEN zeigten Antagonismus. Ohne das Wissen über die sublinearen Dosis – Wirkungsbeziehungen für die einzelnen gentoxischen Substanzen wären die Kombinationen von MMS+MNU und MMS+GEN als synergistisch wirkend fehlinterpretiert worden. Es hat sich somit gezeigt, dass eine Interpretation von Kombinationseffekten bezüglich einer vermeintlichen Abweichung von der normalen Additivität (also Synergismus oder Antagonismus) eine Bewertung der Dosis – Wirkungsbeziehungen der einzelnen Komponenten beinhalten sollte. Dies könnte besonders wichtig für die Endpunkte bezüglich Mutagenität und Karzinogenität sein, wo eine linear – sublineare Form der Dosis – Wirkungskurve auf Grundlage der Mechanismen erklärt werden kann (Lutz 1998). Diese Analyse basierte auf einem exponentiellen Modell für die Beschreibung der sublinearen Kurven. Es erfordert eine sehr geringe Zahl an Parametern, die geschätzt werden müssen, es nimmt einen Fehler an, der proportional zur Wirkung ist, und es erlaubt eine Berechnung als lineares Modell nach logarithmischer Transformation der Effektstärke. Trotz Nutzung von $\log(MN)$ wird hier dieselbe Stärke der Nichtlinearität für alle drei gentoxisch wirkenden Substanzen (obwohl Abb. 2 einige Unterschiede zwischen den Stärken der Nichtlinearität aufzeigt) erzeugt. Die Schätzung des Grades der Nichtlinearität erfolgte durch ein nichtlineares „mixed effect power“ Modell erreicht durch maximale Annäherung über $MN \sim a + b \cdot A^c$ für MMS ($c=2,21$) für MNU ($c=1,54$) und für GEN ($c=1,72$). Die Analyse der Daten mit dem „power Modell“ ergab die selben Ergebnisse wie mit dem exponentiellen Modell bezüglich der postulierten Unterschiede zwischen den drei binären Kombinationen (wie schematisch in Fig. 3 gezeigt).

Bei der Nutzung des exponentiellen Modells wurden parallele Dosis – Wirkungskurven angenommen und die in der Einleitung angegebene Definition

genutzt. In der Literatur wird der Begriff additive Dosis auch in einer etwas allgemeiner gehaltenen Art und Weise genutzt (Berenbaum 1989) als die auf Isobolen basierende Methode. Isobolen haben ihren besonderen Wert für die Suche nach und die Analyse von Dosiskombinationen, die dieselben Wirkeffekte erzeugen. Bei einer angegebenen Wirkung können Isobolen genutzt werden, um Kombinationen von Substanzen ohne Berücksichtigung der Form ihrer Dosis – Wirkungskurven zu analysieren. (Kortenkamp und Altenburger 1998). Die hier gezeigten Experimente beinhalten Kombinationen von unterschiedlichen Dosen, d.h. 1+1, 1+2, 2+1, 2+2, welche unterschiedliche Wirkstärken zur Folge hatten. Für diese Gegebenheiten wurde dieses Modell als geeignet angesehen. Die Unterscheidung zwischen additiver Dosis und additiver Wirkung ist oft auf der Grundlage der Mechanismen erklärt worden. In ihrem Übersichtsartikel (Cassee et al. 1998) definieren die Autoren: „ Bei additiver Dosis trägt jede der einzelnen Substanzen in der Mixtur zur Toxizität der Kombination in dem Anteil seiner jeweiligen Dosis bei, ausgedrückt als Prozentteil der Dosis, die von dieser Substanz allein benötigt würde, um den durch die Kombination vorgegebenen Effekt zu erzielen. Alle in der Kombination betrachteten Substanzen wirken auf dieselbe Art und Weise, durch dieselben Mechanismen und unterscheiden sich nur in ihren Wirkstärken.“ Die Frage ist, ob dies auch für MMS und MNU gilt, also für die Kombination, für die die additive Dosis nicht abgelehnt werden konnte. Beide genotoxischen Substanzen methylieren DNA, also kann man DNA-Methylierung als ihren gemeinsamen Mechanismus definieren. Während die bevorzugte Stelle der DNA – Methylierung für beide genotoxischen Substanzen das N – Atom an Position 7 des Guanins ist, gibt es einen Unterschied bezüglich der Methylierung an weniger nukleophilen Stellen, wie zum Beispiel das O-Atom Pos. 6 des Guanin (Lawley 1984). Mit echter additiver Dosis müsste man postulieren, dass die gemeinsame Reaktion, d.h. die Guanin – 7- Methylierung hauptsächlich für die beobachtete Mikrokern – Induktion verantwortlich ist. Das ist eine vernünftige Hypothese, da diese Art von Methylierung die N – glykosidische Bindung destabilisiert und die Depurination fördert, die Reparatur dessen ist mit Strangbruch assoziiert.

Folgt man dieser Interpretation, müsste man vorhersagen, dass die Kombination von MMS beziehungsweise MNU mit jeweils GEN die gleichen Arten von Kombinationseffekten hervorrufen. Dies wurde jedoch nicht bestätigt. Während MMS + GEN zwischen additiver Dosis und additiver Wirkung lagen, zeigten MNU+GEN Antagonismus. Unterschiede zwischen MMS und MNU, zum Beispiel wie oben genannt bezüglich der DNA – Methylierung oder für die DNA – Synthese Hemmung (Slamenova et. al. 1990) führten nicht zu Abweichungen von additiver Dosis, aber sie führten zu unterschiedlichen Kombinationseffekten mit GEN. Zu beachten gilt dennoch, dass die Nichtablehnung der Nullhypothese der additiven Dosis nicht mit dem Beweis dieser Hypothese gleichzusetzen ist und dass Ähnlichkeit in der Art und Weise der Wirkung mit einer vollen Gleichheit der Wirkmechanismen gleichzusetzen ist. Die Art des Kombinationseffektes könnte auch spezifisch für ein vorgegebenes experimentelles System sein.

Die Maus-Lymphom-Zellen haben ein mutiertes p53 Gen. Normale Zellen könnten auf DNA Schädigung auf eine andere Art und Weise reagieren und eine andere Antwort zeigen. Kombinationseffekte könnten auch zwischen Endpunkten differieren. Während in den vorliegenden Experimenten ein antagonistischer Kombinationseffekt von MNU+GEN gefunden wurde, berichtete man vor kurzem, dass GEN das Wachstum von mit MNU initial behandelten Mamma-Tumoren stimuliert (Allred et al. 2004). Die Betrachtung all dieser Dinge ist übereinstimmend mit einer vor unlängst publizierten Aussage, basierend auf mehreren Beispielen aus der pharmakologischen und toxikologischen Literatur, dass die Eigenschaften einer Kombination nur sehr schwer aus dem Wissen über die einzelnen Komponenten vorhergesagt werden können (Borgert et. al 2004). Auf der anderen Seite zeigen die Ergebnisse der Experimente, dass die Untersuchung von Dosis – Wirkungsbeziehungen für die einzelnen Komponenten einer Substanz helfen können, Fehlinterpretationen von Kombinationseffekten im Sinne von Synergismus und Antagonismus (ohne die Kenntnis der genauen Wirkmechanismen) zu vermeiden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Um realistische Risikoabschätzungen von karzinogenen und genotoxischen Expositionen besser bewerten zu können, bedarf es Untersuchungen von Kombinationen welche sich von der Einzellstoffbetrachtung löst. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, herauszufinden, ob die Genotoxizität einer Kombination in ihrer Stärke vom erwarteten Effekt der normalen Additivität abweicht, wenn die Kurven der Dosis – Wirkungsbeziehung der Einzelkomponenten nicht lineare Verläufe zeigen. Dabei muss zwischen Dosisaddition und Wirkaddition der Kombinationen unterschieden werden, das heißt ob die Einzelkomponenten einen untereinander ähnlichen oder unabhängigen Wirkmechanismus verfolgen. Für nicht lineare Dosis – Wirkungsbeziehungen differieren also die Kurvenverläufe zwischen Dosisaddition und Wirkaddition und bilden einen möglichen Bereich der Additivität zwischen ihnen (auch: „Hülle der Additivität“). Nur Reaktionen welche außerhalb dieses Bereiches ablaufen, dürfen als synergistische oder antagonistische Effekte bezeichnet werden. Diese Überlegungen wurden überprüft mit der Analysierung von Mikrokernen, induziert in L5178Y Maus – Lymphom – Zellen durch die methylierenden Substanzen Methylmethansulfonat (MMS) und Methyl-Nitroso-Urea (MNU), sowie dem Topoisomerase II Inhibitor Genistein (GEN). Alle drei Chemikalien erzeugen reproduzierbare sublineare Dosis – Wirkungsbeziehungen. Für die Analyse der Kombinationseffekte wurden diese Substanzen in drei binären Mixturen miteinander gemischt. Für MMS + MNU war der Effekt vereinbar mit Dosisaddition und lag signifikant höher als der vorkalkulierte Effekt der Netto – Wirkung. Für MMS + GEN lag der gemessene Effekt über der Wirkaddition, jedoch unter der Dosisaddition. Für MNU + GEN lag der gemessene Effekt unterhalb der Wirkaddition und deutete damit auf einen echten Antagonismus hin. In Unkenntnis des sublinearen Dosis – Wirkungsverhaltens der Einzelsubstanzen wäre ein synergistischer Effekt von MMS mit beiden Substanzen MNU und GEN fälschlicherweise vorausgesagt worden. Der beobachtete Unterschied zwischen MMS und MNU und deren jeweiligen Kombination mit GEN wäre mit einer stark vereinfachten

Interpretation der DNA - Methylierung nicht vorausgesagt worden. Ursachen könnten eine doch zu unterschiedliche Form der DNA – Methylierung und / oder epigenetische Faktoren sein. Zusammenfassend kann man sagen, dass Kenntnisse der Nichtlinearität von Dosis – Wirkungskurven der einzelnen Substanzen ausschlaggebend für die Analyse von Synergismus oder Antagonismus in deren Kombinationen ist. Weiterhin ist ein Vorwissen über tiefere mechanistische Vorgänge hilfreich für eine Vorhersage von ähnlichen oder unabhängigen Wirkprozessen.

6. Literaturverzeichnis

Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Clausen, L. M., Doerge, D. R., Schantz, S. L., Korol, D. L., Wallig, M. A., and Helferich, W. G. (2004) Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 25, 211-218.

Benner, S. E., Wargovich, M. J., Lippman, S. M., Hong, W. K. (1993) Micronuclei: a potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer. *J Cell Biochem Suppl.* 1993;17F:250-4. Review.

Berenbaum, M. C. (1989) What is synergy? *Pharmacol. Rev.* 41, 93-141.

Bliss, C. I. (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615.

Borgert, C. J., Quill, T. F., McCarthy, L. S., and Mason, A. M. (2004) Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201, 85-96.

Burkart, W., and Jung, T. (1998) Health risks from combined exposures: mechanistic considerations on deviations from additivity. *Mutat. Res.* 411, 119-128.

Cassee, F. R., Groten, J. P., van Bladeren, P. J., and Feron, V. J. (1998) Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 73-101.

Clive, D., Flamm, W. G., Machesko, M. R., and Bernheim, N. J. (1972) A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* 16, 77-87.

Combes, R. D. (1992) Trends in genotoxicity testing, *Chemistry in Industrie* 24.

Doty, P., Dysktra, L. A., and Picker, M. J. (1992) Delta 9-tetrahydrocannabinol interactions with phencyclidine and ethanol: effects on accuracy and rate of responding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 61-70.

Eckert, I. (1993) Mikrokerne: Entstehungsmechanismen und Bedeutung als Endpunkt für Genotoxizität. *Dissertationsschrift zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Universität Würzburg.*

Fenech, M. (1991) Optimisation of micronucleus assays for biological dosimetry. *Prog Clin Biol Res.* 1991;372:373-86. Review.

Fritzenschaf, H., Kohlpoth, M., Rusche, B., Schiffmann, D. Testing of known carcinogens and noncarcinogens in the Syrian hamster embryo (SHE) micronucleus test in vitro; correlations with in vivo micronucleus formation and cell transformation. *Mutat Res.* 1993 Sep;319(1):47-53.

Garewal, H. S., Ramsey, L., Kaugars, G., Boyle, J. (1993) Clinical experience with the micronucleus assay. *J Cell Biochem Suppl.* 1993;17F:206-12. Review.

Hertzberg, R. C., and MacDonell, M. M. (2002) Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Sci. Total Environ.* 288, 31-42.

Hertzberg, R. C., and Teuschler, L. K. (2002) Evaluating quantitative formulas for doseresponse assessment of chemical mixtures. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl. 6, 965-970.

Kortenkamp, A., and Altenburger, R. (1998) Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. *Sci. Total Environ.* 221, 59-73.

Lawley, P. D. (1984) Carcinogenesis by alkylating agents. *ACS Monographs* 182, 355-484.

Lutz, W. K., Vamvakas, S., Kopp-Schneider, A., Schlatter, J., Stopper, H. (2002) Deviation from Additivity in Mixture Toxicity: Relevance of Nonlinear Dose – Response Relationship and Cell Line Differences in Genotoxicity Assays with Combinations of Chemical Mutagens and Gamma – Radiation. *Environ. Health Perspect.* 110, 915-918.

Lutz, W. K. (1998) Dose-response relationships in chemical carcinogenesis: superposition of different mechanisms of action, resulting in linear-sublinear curves, practical thresholds, Jshapes. *Mutat. Res.* 405, 117-124.

Mentzer, R. K., Smith, N. D., Poch, G., and Dawson, D. A. (1999) Combined osteolathyrin effects of beta-aminopropionitrile and penicillamine on *Xenopus* embryos: statistical comparison with dose-addition and independence. *Drug Chem. Toxicol.* 22, 359-374.

Obe, G., Beck, B. (1982) Premature chromosome condensation in micronuclei. in: Rao, P., Johnson, R., Sperling, K. (Eds.) *Application in Basic, clinical and Mutation Research*, Academic Press, New York.

Rosin, M. P. (1993) Genetic alterations in carcinogenesis and chemoprevention. *Environ Health Perspect.* 1993 Oct;101 Suppl 3:253-6. Review.

Schiffmann, D., De Boni, U. (1991) Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise. *Mutat Res.* 1991 Jan;246(1):113-22.

Schmuck, G., Lieb, G., Wild, D., Schiffmann, D., Henschler, D. Characterization of an in vitro micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts. *Mutat Res.* 1988 Dec;203(6):397-404.

Slamenova, D., Dusinska, M., Bastlova, T., and Gabelova, A. (1990) Differences between survival, mutagenicity and DNA replication in MMS- and MNU-treated V79 hamster cells. *Mutat. Res.* 228, 97-103.

Stopper, H., (1995) Mikrokerne, Zellbiologischer Endpunkt für Genotoxizität. Habilitationsschrift, Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Fakultät für Medizin, Universität Würzburg.

Streffler, C., Bückler, J., Cansier, A., Cansier, C., Gethmann, C.F., Guderian, R., Hanekamp, G., Henschler, D., Pösch, G., Rehbinder, E., Renn, O., Slesina, M., Wuttke, K. (2000) Kombinierte Expositionen und ihre Auswirkungen auf den Menschen und seine Umwelt. *Umweltstandards. Springer Verlag.*

Tucker, R. W., Barrett J. C. (1986) Decreased numbers of spindle and cytoplasmic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen, diethylstilbestrol. *Cancer Res.* 1986 Apr;46(4 Pt 2):2088-95.

Gustavino, B., Degrassi, F., Filipponi, R., Modesti, D., Tanzarella, C., Rizzoni, M. (1994) Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. *Mutagenesis.* 1994 Jan;9(1):17-21.

Danksagung

Besonders danken möchte ich Frau Professor Dr. Stopper für die umfassende und unkomplizierte Betreuung der gesamten Arbeit.

Herrn Professor Dr. Lutz danke ich für die Bereitstellung des Themas und die stete Weiterentwicklung der Statistik bis zur Veröffentlichung der Arbeit.

Im weiteren Danke ich allen Labormitarbeitern für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung, insbesondere Herrn M. Kessler für die geduldige Anleitung zur Erlernung der Arbeitstechniken.

Ohne die Hilfe und Unterstützung meiner Eltern wäre der Weg zu dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen gilt mein ganz besonders herzlicher Dank.

Lebenslauf

Oliver Tiedge

Geburtstag/Ort 18. Juni 1978 in Naumburg/Saale

Ausbildung

seit Juli 2007	Assistenzarzt der Neurologie, Juliusspital, Würzburg
Juni 2005 – Juni 2007	Assistenzarzt der Uniklinik für Nuklearmedizin, Würzburg
Mai 2005	Ärztliche Approbation
April 2004 - Klinik März 2005	PJ an der Nuklearmedizinischen Klinik, Chirurgischen (Traumatologie, Gefäßchirurgie) und Medizinischen Klinik (Nephrologie, Intensivmedizin) der Universität Würzburg
April 2004	Zweites Staatsexamen
Mai 1999	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Würzburg
1997 – 1999	Zivildienst im Rettungsdienst (Deutsches Rotes Kreuz) Ausbildung zum Rettungssanitäter in Naumburg
1997	Abitur
1985 – 1997	Lepsius-Gymnasium, Naumburg
1984 – 1996	Musikschule Naumburg, Fach Klavier

