

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. sc. techn. W. Lutz**

**Toxizität und Gentoxizität
von Phytohormonen und
deren Metaboliten**

**Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**René Jonas
aus
Dittelbrunn**

Würzburg, Juni 2004

Referentin: Prof. Dr. H. Stopper

Koreferent: Prof. Dr. M. Arand

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Oktober 2004

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung.....	1
1.1. Hormone und menschlicher Körper.....	1
1.2. Hormone und hormonell aktive Substanzen in der Umwelt.....	3
1.3. Tumor und Krebs.....	6
1.3.1. Karzinogene.....	6
1.3.2. Tumorentstehung.....	6
1.3.3. Hormone und Krebs.....	8
1.4. Hormontherapie im Klimakterium.....	10
II. Phytohormongruppen und Kenntnisstand.....	12
2.1. Isoflavone.....	12
2.2. Flavone.....	14
2.3. Stilbene.....	14
2.4. Lignane.....	15
2.5. Anthocyane.....	16
III. Aufgabenstellung und Hintergrund dieser Arbeit.....	18
IV. Material und Methoden.....	20
4.1. Laborchemikalien und Arbeitsgeräte.....	20
4.1.1. Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial.....	20
4.1.2. Arbeitsgeräte.....	20
4.2. Puffer und Lösungen.....	21
4.3. Zellkultur.....	22
4.3.1. Verwendete Zelllinie.....	22
4.3.2. Kulturmedium.....	22
4.3.3. Kultivierung der Zellen.....	22
4.3.3.1. Auftauen der Zellen.....	22
4.3.3.2. Passagieren der Stammreihe.....	23
4.3.3.3. Anlegen der Testkulturen.....	23
4.4. Testsubstanzen.....	24
4.5. Testverfahren und methodisches Vorgehen.....	24
4.5.1. Allgemeines.....	24
4.5.2. Toxizitätstests.....	25
4.5.2.1. Proliferationsexperimente.....	25

4.5.2.2. Zellvitalitätstest.....	26
4.5.2.3. Anteil mehrkerniger Zellen.....	27
4.5.3. Gentoxizitätstests.....	28
4.5.3.1. In-vitro-Mikrokerntest.....	29
4.5.3.1.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	30
4.5.3.1.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	31
4.5.3.2. Indirekter Immunfluoreszenznachweis von Kinetochorproteinen.....	32
V. Ergebnisse.....	34
5.1. Equol.....	35
5.1.1. Toxisches Potential von Equol.....	35
5.1.1.1. Proliferationsexperiment.....	35
5.1.1.2. Vitalitätsfärbung.....	36
5.1.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	37
5.1.2. Gentoxisches Potential von Equol.....	38
5.1.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	38
5.1.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	39
5.1.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	39
5.2. O-DMA.....	40
5.2.1. Toxisches Potential von O-DMA.....	40
5.2.1.1. Proliferationsexperiment.....	40
5.2.1.2. Vitalitätsfärbung.....	41
5.2.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	42
5.2.2. Gentoxisches Potential von O-DMA.....	43
5.2.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	43
5.2.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	44
5.2.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	44
5.3. 3,4,7-Trihydroxyisoflavon.....	46
5.3.1. Toxisches Potential von 3,4,7-Trihydroxyisoflavon.....	46
5.3.1.1. Proliferationsexperiment.....	46
5.3.1.2. Vitalitätsfärbung.....	47
5.3.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	48
5.3.2. Gentoxisches Potential 3,4,7-Trihydroxyisoflavon.....	49
5.3.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	49

5.3.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	50
5.3.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	50
5.4. 4,6,7-Trihydroxyisoflavon.....	52
5.4.1. Toxisches Potential von 4,6,7-Trihydroxyisoflavon.....	52
5.4.1.1. Proliferationsexperiment.....	52
5.4.1.2. Vitalitätsfärbung.....	53
5.4.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	54
5.4.2. Gentoxisches Potential von 4,6,7-Trihydroxyisoflavon.....	56
5.4.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	56
5.4.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	57
5.4.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	57
5.5. Fisetin.....	59
5.5.1. Toxisches Potential von Fisetin.....	59
5.5.1.1. Proliferationsexperiment.....	59
5.5.1.2. Vitalitätsfärbung.....	60
5.5.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	61
5.5.2. Gentoxisches Potential von Fisetin.....	63
5.5.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	63
5.5.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	64
5.5.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	64
5.6. Resveratrol.....	66
5.6.1. Toxisches Potential von Resveratrol.....	66
5.6.1.1. Proliferationsexperiment.....	66
5.6.1.2. Vitalitätsfärbung.....	67
5.6.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	68
5.6.2. Gentoxisches Potential von Resveratrol.....	69
5.6.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	69
5.6.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	70
5.6.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	70
5.7. Delphinidin	71
5.7.1. Toxisches Potential von Delphinidin	71
5.7.1.1. Proliferationsexperiment.....	71
5.7.1.2. Vitalitätsfärbung.....	72
5.7.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	73
5.7.2. Gentoxisches Potential von Delphinidin	74

5.7.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	74
5.7.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	75
5.7.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	75
5.8. Pelargonidin.....	76
5.8.1. Toxisches Potential von Pelargonidin.....	76
5.8.1.1. Proliferationsexperiment.....	76
5.8.1.2. Vitalitätsfärbung.....	77
5.8.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	78
5.8.2. Gentoxisches Potential von Pelargonidin.....	79
5.8.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	79
5.8.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	80
5.8.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	80
5.9. Cyanidin.....	81
5.9.1. Toxisches Potential von Cyanidin.....	81
5.9.1.1. Proliferationsexperiment.....	81
5.9.1.2. Vitalitätsfärbung.....	82
5.9.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	83
5.9.2. Gentoxisches Potential von Cyanidin.....	84
5.9.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	84
5.9.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	85
5.9.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	85
5.10. Antocyane im direkten Vergleich.....	86
5.10.1. Toxisches Potential von Antocyanen.....	86
5.10.1.1. Proliferationsexperiment.....	86
5.10.1.2. Vitalitätsfärbung.....	87
5.10.1.3 Anteil mehrkerniger Zellen.....	88
5.10.2. Gentoxisches Potential von Antocyanen.....	89
5.10.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen.....	89
5.10.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen.....	90
5.10.3. Erläuterungen und Testergebnisse.....	90
5.11. Immunfluoreszenzdetektion von Kinetochoren	92
5.11.1. Graphischer Überblick.....	92
5.11.2. Wertetabelle.....	92

VI. Diskussion

6.1. Testsysteme.....93

6.2. Testsubstanzen und Ergebnisse.....95

VII. Zusammenfassung.....102**VIII. Literaturverzeichnis.....106**

Danksagung

Lebenslauf

I. Einleitung

1.1. Hormone und menschlicher Körper

Die Bezeichnung „Hormon“ stammt aus dem Altgriechischen und bedeutet soviel wie „anregen“ (griech.: horman-anregen). Hormone steuern Stoffwechsel, Fortpflanzung und Wachstum. Sie werden von vielen Organen, den sog. „endokrinen Drüsen“, oder in endokrin aktiven Zellgruppen von Organen mit primär anderer Funktion produziert und in den Blutstrom abgegeben. Zu diesen Organen gehören Hoden, Eierstöcke, Bauchspeicheldrüse, Thymus, Nebennieren, Schilddrüse und Nebenschilddrüse. Prinzipiell werden die Hormone in zwei große Gruppen unterteilt, die Peptid- und die Steroid-Hormone. Letztere werden in den Gonaden

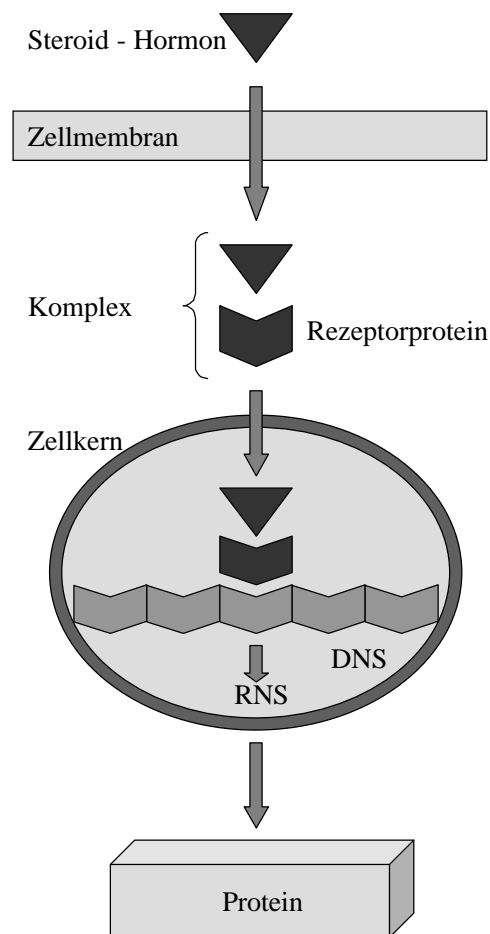


Abb.1.1: **Wirkmechanismus von Steroidhormonen**, Lüllmann, 1999

aus der Umwelt an ganz anderer Stelle im Körper dramatische Konsequenzen haben kann (Forth et al., 1992).

Da das Augenmerk dieser Arbeit auf der Untersuchung von Substanzen mit östrogenartiger Wirkung liegt soll im folgenden die natürliche Synthese von Sexualhormonen aus Cholesterin im Körper dargestellt werden (Abb.1.2):

und den Nebennieren aus Cholesterin synthetisiert und haben im Gegensatz zu den Peptidhormonen (Ausnahme: Tyrosin) eher lipophilen Charakter, was ihnen ein Durchdringen von Zell- und Kernmembranen ermöglicht und ihren intrazellulären Wirkmechanismus erklärt (siehe Abb.1.1).

Das Hormonsystem wird vom Hypothalamus gesteuert, welcher einen Sollwert für die Hormonspiegel aus verschiedensten afferenten Impulsen aus dem ganzen Körper errechnet (Crapo, 1985; Schlumpf und Lichtensteiger, 1996) und ist mit den beiden anderen großen Netzwerken des Körpers, dem Nervensystem und dem Immunsystem auf das engste gekoppelt und verknüpft, was bedeutet, daß Veränderungen in diesem komplexen Gebilde, wie zum Beispiel durch hormonell aktive Substanzen

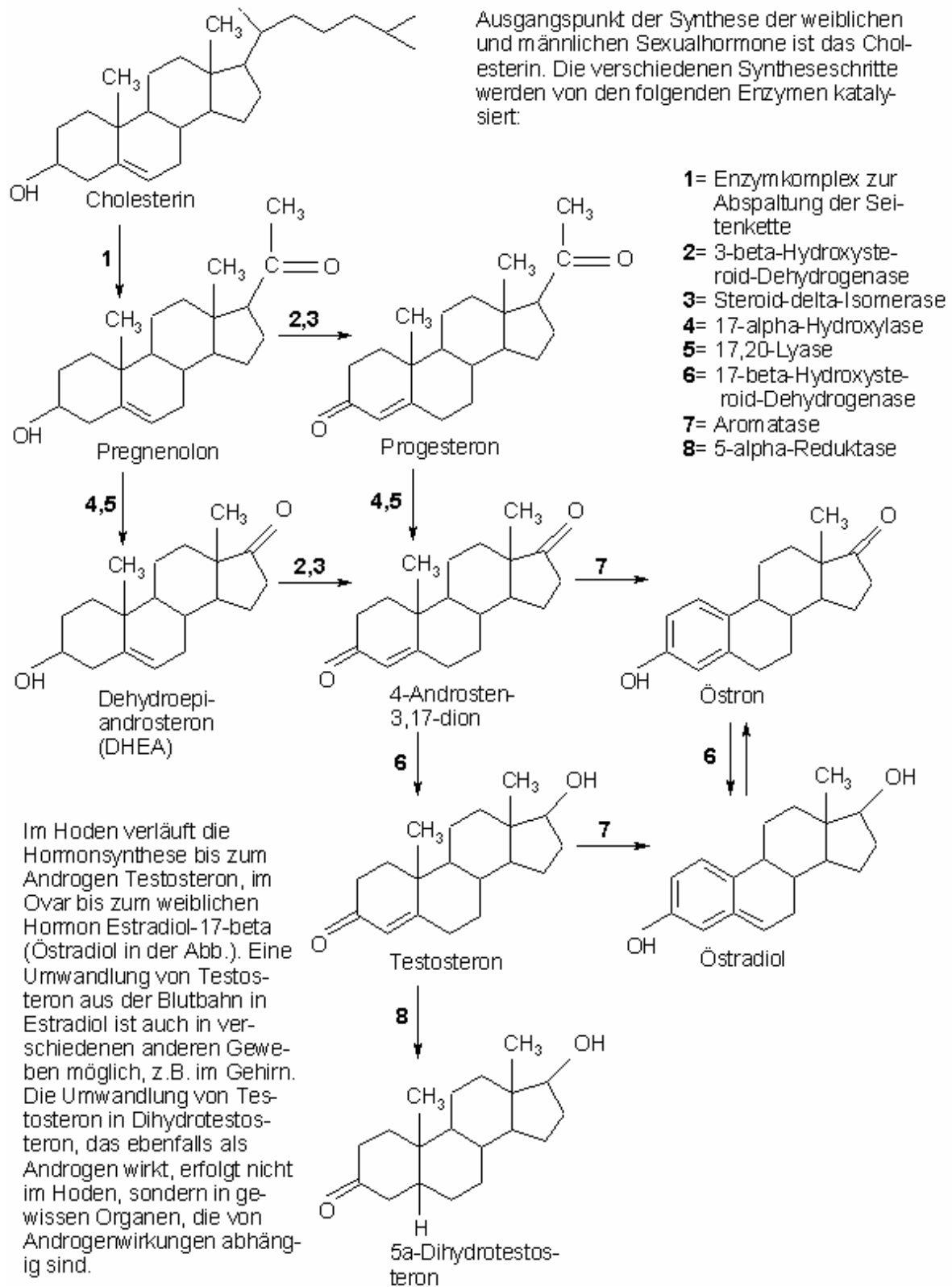


Abb.1.2: **Biosynthese von Sexualsteroiden**, Schlumpf, 1996

Dem natürlichen Östrogen ist im Körper ein großes Wirkspektrum zu eigen. Neben seiner primären Funktion als Regulator weiblicher Fortpflanzungsorgan-Entwicklungen und -Funktionen (z.B. Milchproduktion, Gebärmutterschleimhautproliferation) soll es vor Osteoporose durch Hemmung der Osteoklasten schützen, zur Stabilisierung der Körpertemperatur

beitragen und möglicherweise Gedächtnisfunktionen unterstützen. Die Beeinflussung der Cholesterinsynthese in der Leber führte zu der Annahme einer möglichen Reduktion des kardiovaskulären Risikos, was aber seit der 1998 veröffentlichten HERS II - Studie nicht mehr haltbar ist. Aufgrund dieser Studie wird eine Hormonersatztherapie zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen heute nicht mehr empfohlen (Shah und Alexander, 2003). Im Rahmen der postmenopausalen Hormonsubstitution lindert Östrogen vegetative Beschwerden wie Hitzewallungen und verhindert die urogenitale Atrophie. Neben diesen positiven Hormonwirkungen ist das natürliche Östrogen aber auch an der Entwicklung von Neoplasien der Brust, des Uterus und der Leber beteiligt, fördert die Entstehung von Gallensteinen und erhöht das Risiko für die Entstehung von Thromboembolien durch die Inhibierung des Protein C.

1.2.Hormone und hormonell aktive Substanzen in der Umwelt



Abb.1.3: **Sojapflanze:** Nahrungsmittel mit der bei weitem höchsten Konzentration an Phytoöstrogenen

Das weitverbreitete Vorkommen von Stoffen mit hormoneller Wirkung in der Umwelt und hier speziell in Lebensmitteln ist derzeit Gegenstand der wissenschaftlichen und öffentlichen Diskussion. Diese richtet sich hauptsächlich auf Stoffe mit östrogenem Potential. Mengenmäßig am bedeutendsten sind die in Pflanzen vorkommenden sogenannten Phytoöstrogene aus den Stoffgruppen der Isoflavone, Lignane, Cumestane und Indol-3-carbinole. Neben den Naturstoffen haben aber auch Stoffe anthropogenen Ursprungs, die durch Kontamination, z.B. aus der Umwelt oder durch Kontakt mit Kunststoffen, in Lebensmittel ge-

langen können, östrogenes Potential. Dazu gehören chlorierte Pestizide, polychlorierte Biphenyle, Alkylphenole, Bisphenole und bestimmte Phtalate. Die Hauptquelle für Isoflavone (Daidzein, Genistein) ist die Sojabohne (siehe Abb.1.3).

Die tägliche Aufnahme dieser Phytoöstrogene kann beim Erwachsenen bis zu etwa 1mg/kg Körpergewicht betragen, wobei Plasmaspiegel von über 1µM erreicht werden. Für Säuglinge, die Nahrung auf Sojabasis erhalten, wird die Aufnahme von Isoflavonen, bezogen auf das Körpergewicht, sogar auf ein Mehrfaches der Aufnahme von Erwachsenen geschätzt. Es produzieren aber neben der Sojapflanze noch über 100 weitere Pflanzen Phytoöstrogene. So ist in rohfaserreichen Lebensmitteln, wie zum Beispiel den Leinsamen, Flachsamen, Haferflocken

und Spargel die Phytoöstrogengruppe der Lignane vertreten. Eine weitere Aufnahmequelle von Phytoöstrogenen sind Früchte und deren Weiterverarbeitungsprodukte, wie Wein oder Saft. Auch viele nicht eßbare Pflanzen wie die Traubensilberkerze oder der rote Klee sind reich an Phytoöstrogenen. Eine Vielzahl von Arzneimitteln, meist zur pflanzlichen Regulierung von Wechseljahresbeschwerden, die diese Substanzen enthalten sind in deutschen Apotheken zu erwerben. Diese Präparate werden häufig als Alternative zur klimakterischen Hormonsubstitution mit Designer-Östrogenen angeboten, da ihnen angeblich oben genannte Nebenwirkungen fehlen. Es ist jedoch vor der Annahme zu warnen, daß natürliche Produkte per se der Gesundheit förderlich wären (Gilbert, 2000; Ginsburg und Prelevic, 2000). Trotz der zur Zeit vorherrschenden Euphorie für alternative, pflanzliche Behandlungsformen (Kleingunk, 2000; Pressemitteilung 21.10.98) ist aus toxikologischer Sicht Zurückhaltung geboten,



Abb.1.4: Pillen zur Hormonsubstitution

da Phytoöstrogene bisher nicht der gleichen Prüfung unterzogen wurden, wie sie für andere in Lebensmitteln vorkommende Substanzen, wie z.B. Konservierungs-, Farb- oder Aromastoffe inzwischen selbstverständlich ist (Matthews et al., 1999; Doerge et al., 2000).

Im Vergleich zur Exposition mit Phytoöstrogenen ist die Aufnahme anthropogener Stoffe mit östrogenem

Potential aus Lebensmitteln verschwindend gering.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass östrogen wirkende Substanzen ganz verschiedene Strukturen besitzen und deshalb der östrogenen Wirkung keine bevorzugte Konformation und Konfiguration zugrunde liegt (siehe Abb.1.5).

<p>Chemikalien mit östrogenen Wirkung: Tamoxifen (1), 17β-Östradiol (2), Bisphenol A (3), Di-n-butylphtalat (4), o,p'-DDT (5)</p>	<p>Pflanzeninhaltsstoffe mit östrogenen Wirkung: Zearalenon (1), Coumestan (2), Genistein (3), Daidzein (4), Resveratrol (5)</p>

Abb.1.5: Strukturformeln von Substanzen mit östrogenen Wirkung

Phytohormone sind im Vergleich zu endogenen Hormonen nur schwach wirksam. Die Affinität zum Östrogenrezeptor ist um Größenordnungen (rund 1000 mal) geringer als die von 17β -Östradiol. Da sie jedoch in relativ großen Mengen aufgenommen werden können und sie eine geringere Plasmaeiweißbindung aufweisen kann sich ihre Wirkung beim Menschen durchaus bemerkbar machen. Eine wichtige Rolle spielt dabei auch die Darmfunktion und -flora, da viele Phytohormone ihre optimale Wirkung erst nach enzymatischer Spaltung erreichen.

Pflanzengestagene (z.B. aus der Yamswurzel) gibt es ebenfalls. Sie machen jedoch nur 2% der Pflanzenhormone aus und ihre Wirkung ist bisher nicht umfassend erforscht.

Zur Risikobewertung hormonell aktiver Substanzen aus der Umwelt und hier besonders aus Lebensmitteln, kann nach gegenwärtigen Stand aufgrund der geringen Konzentrationen dieser Stoffe von keinem gesundheitlichen Risiko für den Menschen, auch bei vegetarischer Ernährung (Wu et al., 1998; Setchell, 1998), ausgegangen werden. Aus den Ergebnissen epidemiologischer Studien wurde sogar gegensätzlich gefordert, daß eine erhöhte Aufnahme von Phytoöstrogenen chemoprotektive Eigenschaften hat (Adlercreutz et al., 1993; Messina et al., 1994; Piskula, 2000; Bouker und Hilakivi-Clarke, 2000). Hier wird insbesondere der Zusammenhang zwischen hohem Sojakonsum (Phytohormonaufnahme von 50-60mg/d) und erniedrigtem Brustkrebsrisiko in ostasiatischen Ländern diskutiert (Musey et al., 1995; Zheng et al., 1999; Messina, 1999). Im Gegensatz dazu wurden aber unter besonderen Umständen (Futter mit hohen Mengen an Phytoöstrogenen) Wirkungen auf die Fortpflanzungsfähigkeit in Nutz- und Versuchstieren beobachtet (Zimmerli und Schlatter, 1998; Berg et al., 1998). Unzureichende Kenntnis liegt derzeit auch über die Ätiologie vieler Erkrankungen des Menschen vor, die mit der Aufnahme hormonell aktiver Substanzen in Zusammenhang gebracht werden. So sind die Ursachen für verminderte Spermienzahl und -qualität, Kryptorchismus sowie vermehrtes Auftreten von Prostata- und Hodenkarzinomen noch weitgehend ungeklärt (Carlsen et al., 1992; Sharpe und Shakkebaek, 1994; Auger et al., 1995; Swan et al., 2000). Durch die Entdeckung weiterer östrogen-wirksamer Substanzen könnte ein Zusammenhang zwischen Ernährungsgewohnheiten und hormonabhängiger Erkrankungen hergestellt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Entdeckung des Phytoalexins Resveratrol (Inhaltsstoff in Weintrauben) und des epidemiologisch diskutierten Sachverhaltes, daß post- und prämenopausale Frauen bei moderatem Weinkonsum ein erniedrigtes Brustkrebsrisiko zeigen (Rosenberg et al., 1990; Purohit, 1998; Vachon et al., 2000). Rund 3% der Frauen, die sich phytoöstrogenreich ernähren, reagieren allergisch auf Sojaweiß (Pressemitteilung, Vital, Juni 2004) Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß noch viele Erkenntnislücken auf dem Gebiet der in-vitro als auch der in-vivo Untersuchungen bestehen und Forschungsbedarf auf dem Gebiet der Interak-

tion von Phytoöstrogenen und insbesondere auch deren Metaboliten mit dem Prozeß der Kanzerogenese besteht.

1.3. Tumor und Krebs

Als Tumor oder Neoplasie bezeichnet man eine abnorme Vergrößerung eines Gewebes, welche durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Der Anteil teilungsaktiver Zellen ist im Tumor größer als im Normalgewebe. Der Begriff „Krebs“ steht für maligne Tumoren. Maligne Tumoren unterscheiden sich von benignen Tumoren durch infiltratives und destruktives Wachstum, Verlust der Differenzierungsfähigkeit und verminderte „Drug“-Sensitivität sowie durch die Fähigkeit zur Metastasierung (Hartwell und Kastan, 1994; Wagener, 1999).

1.3.1. Karzinogene

Karzinogene sind Substanzen oder Faktoren, die beim Menschen, im Tierversuch oder unter bestimmten experimentellen Bedingungen die Inzidenz maligner Tumoren erhöhen oder die Latenz der Karzinogenese verkürzen können. Karzinogene können endogen entstehen oder exogen zugeführt werden. Es gibt initiiierende, und promovierende Karzinogene. Initiiierende oder auch mutagene Karzinogene führen direkt oder auch indirekt zu Veränderungen der DNA. Zu den initiiierenden, mutagenen Kanzerogenen gehören zum Beispiel Nitrosamine und polycyclische Kohlenwasserstoffe, die Inhaltsstoffe des Tabakrauchs und des Rußes sind, Aflatoxin, Inhaltsstoff des Schimmelpilzes, aromatische Amine oder auch ionisierende Strahlung. Promovierende Karzinogene sind Substanzen oder Vorgänge, die auf verschiedene Art und Weise die Zellteilung stimulieren und somit indirekt DNA-schädigend und somit krebsfördernd wirken können.

1.3.2. Tumorentstehung

Ursache für die Entwicklung eines Tumors aus einer normalen Körperzelle ist ein mehrstufiger Prozeß, bei dem mehrere Veränderungen der Erbsubstanz erforderlich und viele verschiedene Gene beteiligt sind. Tumoren sind in der Regel klonalen Ursprungs, d.h. sie entstehen aus einer einzelnen Normalzelle (Nowell, 1976). Als Ausgangspunkt dafür gilt eine Veränderung der Erbsubstanz, so daß die Eigenschaften der malignen Proliferation genetisch fixiert und dadurch bei einer Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben werden können. Solch

ein initiales Ereignis in einer Zelle verschafft dieser einen Wachstumsvorteil, wodurch ein Klon identischer Zellen entsteht. Ein weiteres Ereignis ergibt wiederum einen Wachstumsvorteil und diese Sequenz wiederholt sich, bis das Wachstum dieses Zellklons den Kontrollmechanismen der Zelle weitgehend entzogen ist. Der Überlebensvorteil der Zellklone beruht also auf mehreren mutagenen Ereignissen.

Der Prozeß der Tumorentstehung wird durch das „Mehrstufenmodell“ in drei Phasen unterteilt: Initiation, Promotion und Progression. Die Initiation bedeutet die erste genetische Veränderung und Auslösung einer irreversiblen molekularen Transformation. Initiatoren verursachen direkt oder indirekt DNA-Modifikationen. Solche Mutationen können zur Aktivierung oder Inaktivierung kritischer Gene führen. Vornehmlich sind zwei große Gruppen von Genen, die Onkogene, bzw. ihre Vorstufen, die Protoonkogene, und die Tumorsuppressorgene, in den Ablauf der malignen Transformation verwickelt. So kann beispielsweise aus der Aktivierung eines Protoonkogens zu einem Onkogen durch eine mutagene Veränderung ein stetiger Proliferationsreiz resultieren. Im Gegensatz dazu kann die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens durch die fehlende inhibierende Wirkung dieses Gens auf das Wachstum ebenso zu einer ungehemmten Proliferation führen (Royer et al.,1999; Elledge,1996; Zhou et al.,2000; Peltomäki,2001; Mittelmann, 1991). Die Initiation schafft also die Grundlage zur bevorzugten Vermehrung der initiierten bzw. mutierten Zelle im Rahmen der Promotion. Die Promotion ist definiert als der Prozeß, bei dem die initiierte Zelle klonal expandiert. Solch eine Zellvermehrung kann somit das Risiko weiterer Mutationen erhöhen, da eine sich in der Mitose befindliche Zelle wesentlich anfälliger gegenüber mutagenen Ereignissen ist, als eine ruhende Zelle. Tumorpromotoren, Substanzen oder Wirkstoffe, die eine chronische Zellteilung bewirken, sind also nicht primär mutagen, können aber krebsfördernd wirken. Sie werden im allgemeinen als kanzerogen eingestuft. Tumorpromotion kann auf exogenen oder endogenen Einflüssen beruhen. In diesem Sinne kann auch die hormonelle Situation eines Organismus einen Beitrag zur Tumorpromotion leisten. Die Progression bedeutet die Entwicklung zur Malignität, wobei die Zellen weitere zusätzliche genetische Veränderungen erfahren. Die Malignität ist gekennzeichnet durch destruktives, infiltratives Wachstum, Verlust der Differenzierung und der Fähigkeit zur Metastasierung. Dieser beschriebene mehrstufige Prozeß der Tumorentwicklung würde somit möglicherweise auch den Grund für die lange Latenz bis zur Ausbildung und dem phänotypischen Auftreten von Krebs erklären (Wagener, 1999; Barrett, 1993).

1.3.3. Hormone und Krebs

Hormone spielen bei vielen Tumoren von hormonabhängigen Geweben eine bedeutende Rolle (Key, 1995; Preston-Martin et al., 1990). Daten von experimentellen Tierversuchen und von epidemiologischen und endokrinologischen Studien beim Menschen unterstreichen die Hypothese, daß die endogenen Hormone, welche für das normale Wachstum der Zielorgane sowie für andere physiologische und biologische Aktivitäten des Körpers verantwortlich sind, ebenso die Inzidenz von Tumoren erhöhen oder selbst Neoplasien verursachen können (Henderson et al., 1982).

Dabei kommt den endogenen steroidal Sexualhormonen eine besondere Rolle zu, weil die vier hormonassoziierten Krebsarten von Brust, Prostata, Endometrium und Ovarien die größte Anzahl ausmachen und am häufigsten auftreten (Henderson et al., 1982). Vor allem über Brust-, Endometrium- und Ovarialkrebs existieren eine Fülle von epidemiologischen Daten und Untersuchungen, welche einen Zusammenhang zwischen den Steroidhormonen und der Entstehung und Entwicklung dieser Krebsarten annehmen (Lopez-Otin und Diamandis, 1998; Preston-Martin et al., 1990; Key, 1995). Überzeugenden Beitrag zu diesen Annahmen leisten Untersuchungen der Risikofaktoren für die Entwicklung dieser Tumoren. So weiß man, daß ein junges Alter bei der Menarche, sowie das späte Eintreten der Menopause und damit einhergehend die hohe Anzahl der Zyklen bzw. Ovulationen im Leben einer Frau, das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken deutlich erhöhen. Parallel dazu sinkt die Inzidenzrate von Brustkrebs bei Frauen nach der Menopause. Die beidseitige Ovariectomie bei Frauen unter 40 Jahren, welche das Risiko signifikant erniedrigt, gilt sogar als Schutzfaktor. Ebenso ist ein junges Alter bei der ersten Schwangerschaft und die Anzahl von Schwangerschaften für die Risikoabschätzung von Bedeutung (Adami et al., 1995). Schwangerschaften sollen das Risiko für Brust-, Endometrium- und Ovarialkrebs verringern. Im Falle des Brustkrebsrisikos lassen sich die beobachteten Phänomene möglicherweise damit erklären, daß die Proliferation des Brustgewebes während der Schwangerschaft in Richtung Differenzierung und postmenopausal in Richtung Apoptose und/oder Atrophie verschoben ist. Daraus läßt sich das erniedrigte Risiko ableiten. Desweiteren gelten die langjährige Einnahme oraler Kontrazeptiva und die postmenopausale Hormonersatztherapie als Risikofaktoren für das Auftreten von Brustkrebs. Ebenso wird bei Frauen, welche über längeren Zeitraum eine Hormonersatztherapie machen, vermehrtes Auftreten von Endometriumkrebs festgestellt. Untersuchungen an Tieren können zeigen daß bei diesen die Häufigkeit von Endometriumkarzinomen durch erhöhte Hormonspiegel bzw. die exzessive DES-Gabe (Diethylstilbestrol) steigt (Henderson et al., 1982). Beim Ovarialkrebs hingegen wird die Einnahme oraler Kontrazeptiva als Schutzfaktor angesehen.

Diese Beobachtung wird mit der Hypothese erklärt, daß Kontrazeptiva den Eisprung verhindern und dadurch der Proliferationsstimulus zur Reparatur und Regeneration der epithelialen Ovarialzellen, welche bei einem Eisprung zugrunde gehen, wegfällt.

Alle diese Faktoren, welche das Risiko erhöhen, haben eine verlängerte oder erhöhte Östrogenexposition und damit erhöhte Östrogenspiegel im Blut gemeinsam, wohingegen verminderte Östrogenexposition das Risiko verringert (Key, 1999). Gestützt wird dieser Zusammenhang durch epidemiologische Untersuchungen, bei denen der Östrogenspiegel im Blut von Frauen aus verschiedenen Regionen der Welt mit der Häufigkeit von Brustkrebs verglichen wird. Es konnte festgestellt werden, daß die Brustkrebshäufigkeit sowie das Risiko beispielsweise in Japan, wo die Frauen niedrigere Östrogenspiegel haben als in Amerika, geringer ausfällt (Shimizu et al., 1990).

Die Bedeutsamkeit der Steroidhormone bzw. der Androgene für die Ätiologie des Prostatakarzinoms wurde ebenfalls schon früh erkannt. Ähnliche Beobachtungen wie für Brust-, Endometrium- und Ovarialkrebs konnten bei vielen epidemiologischen Befunderhebungen über das Risiko und die Häufigkeit von Prostatakrebs gemacht werden (Lopez-Otin und Diamandis, 1998). Besonders deutlich wird die Beteiligung der Androgene an der Pathogenese des Prostatakrebses durch die erhebliche Risikoreduktion durch eine frühe Kastration/Orchektomie. Japaner und Chinesen weisen wesentlich niedrigere Testosteronspiegel auf als Amerikaner und Afrikaner, was möglicherweise für die geringere Inzidenz von Prostatakrebs in den asiatischen Bevölkerungsgruppen verantwortlich ist.

Alle diese Daten zusammengenommen, verhärtet sich die Annahme über einen Zusammenhang zwischen den (Steroid-) Hormonen und der Entstehung und der Entwicklung von Tumoren hormonabhängiger Gewebe. Jedoch ist man sich trotz dieser zahlreichen, umfangreichen Studien, welche die Verwicklung der Hormone in den Prozeß der Krebsentstehung nahelegen, über die Mechanismen, über welche die Hormone einen Beitrag zur Karzinogenese leisten, noch weitgehend im Unklaren.

Es werden verschiedene Mechanismen zu diesem Zusammenhang beschrieben. Dabei wird die karzinogene Wirkung der Sexualhormone als Kombination aus epigenetischen und genotoxischen Mechanismen betrachtet (Roy und Liehr, 1999). Aus den oben erläuterten Befunden über die Risikoabschätzungen läßt sich für die verschiedenen hormonabhängigen Gewebeararten die Erklärungshypothese formulieren, daß hohe Hormonspiegel vor allem während der Pubertät und eine erhöhte Exposition im weiteren Leben einen stetigen Proliferati-

onsdruck auf die Zellen ausüben und die Hormone damit indirekt DNA-schädigend und krebsfördernd wirken (Barret, 1993). Auf welche Weise diese Hormone im Rahmen des Mehrstufenkonzeptes der Krebsentstehung jedoch auch an der Initiation beteiligt sind, ist bis heute weitgehend ungeklärt.

Es gibt Beobachtungen, daß beispielsweise Östrogene selbst genetische Veränderungen verursachen können, diese Veränderungen aber nicht auf hormonrezeptorabhängigen Mechanismen beruhen. Solche östrogeninduzierten Genschäden beinhalten direkte DNA Schäden durch kovalente DNA-Bindung von Östrogenmetaboliten und indirekte Schäden durch Bildung DNA-reaktiver Metaboliten (Roy und Liehr, 1999; Bolton et al., 1998). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Östrogene chromosomale Veränderungen durch Induktion von Aneuploidie sowie Hyper- und Polyploidie aufgrund von Mikrotubuliveränderungen und Störung der Mitose verursachen und damit eventuell zur malignen Zelltransformation beitragen (Tsutsui et al., 1983; Wheeler et al., 1985; Eckert und Stopper, 1996; Schuler et al., 1998).

1.4. Hormontherapie im Klimakterium

Seit vielen Jahren wird weltweit über Nutzen und Risiken der Hormontherapie im Klimakterium – wie in dieser Arbeit bereits ausführlich dargestellt - gestritten. Nach derzeitiger Datenlage sollte eine Hormontherapie nur noch bei ausgeprägten klimakterischen Symptomen verordnet werden – und zwar so kurz und niedrig dosiert wie möglich. Dies ist die derzeitige Therapieempfehlung der Arzneimittelkommission und steht im Einklang mit der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe sowie zahlreichen internationalen Gremien (DÄ, Heft 40/2003). Als Grundlage dieser veränderten Bewertung sind nicht Erkenntnisse über neue Risiken der Hormontherapie herangezogen worden, sondern dass der bisher vermutete entscheidende Vorteil der Hormontherapie, nämlich der Schutz vor Herzinfarkten, Schlaganfällen und Osteoporose sich nach den beiden großen Studien **Women`s Health Initiative WHI** (JAMA 2002) und **Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study HERS** (Circulation 2002) nicht bestätigt hat. Dieser präventive Nutzen war es aber, der alle Risiken der Hormontherapie aufwiegen sollte (DÄ, Heft 46/2003).

Weiterhin erfolgte schon lange wissenschaftliche Auseinandersetzung darüber, ob sich die verschiedenen Hormonpräparate bezüglich der Induktion/Promotion von Neoplasien und der Heilungschancen der unter der jeweiligen Hormontherapie entdeckten Tumoren von einander unterscheiden. Die **Million Women Study MWS** (Lancet 2003) kommt zu dem Ergebnis, daß eine Vielzahl der in Europa verordneten Präparate ein hohes Risikopotential trägt und sie

weist auf eine eher erhöhte Sterblichkeit unter Hormontherapie hin. Eine verordnete Hormontherapie hat ein vertretbares Risiko, wenn sie nicht länger als 5 Jahre durchgeführt wird (Pressemitteilung, Vital, Juni 2004).

Die oben dargelegten Sachverhalte erklären den dramatischen Wandel der Akzeptanz der Hormonpräparate in der Bevölkerung. Weltweit nahmen bisher etwa 100 Millionen Frauen Hormonpräparate ein. In Deutschland waren es etwa 15 Prozent der 45- bis 50-Jährigen, 40 Prozent der 51- bis 55-Jährigen und 55 Prozent der 56- bis 60-Jährigen, eine Spitzenposition im europäischen Vergleich. Den dramatischen Wandel der Akzeptanz, den die Neubewertung der Hormone ausgelöst hat, belegen Zahlen der American Heart Association, die für das Jahr 2003 einen globalen Rückgang der Estrogensubstitution von 13 auf 7,2 Prozent der Frauen und für Europa einen Rückgang von 8,9 auf 5,6 Prozent beschreiben (DÄ, Heft 46/2003).

Gerade in diesem Zusammenhang muß für die Zukunft verstärkt damit gerechnet werden, daß ein erhöhter Zugriff auf alternative Präparate wie die neuen Selektiven Östrogenrezeptor Modulatoren (SERM) der Pharmaindustrie oder auf Phytohormone mit östrogenen Aktivität erfolgen wird, die mit einer Vielzahl von Verbesserungen gegenüber den herkömmlichen synthetischen Östrogenen bei angeblich immer geringeren Nebenwirkungsspektrum beworben werden. Phytohormone können ihre therapeutische Wirkung gegen Wechseljahresbeschwerden und ihre prophylaktische Wirkung gegen Brustkrebs und Osteoporose nur bei drei- bis fünfjähriger Anwendung und ausreichend hoher Dosierung entfalten; stimmungsaufhellend oder kreislaufschützend wirken sie nicht (Pressemitteilung, Vital, Juni 2004). Deshalb sei vor allzu rascher Euphorie gewarnt, da hier noch viel Forschungsbedarf besteht bis ein möglicherweise bedenkenloser Einsatz (gerade bei Einsatz hoher Dosen) einiger dieser Präparate in der Hormonersatztherapie empfohlen werden kann. Diese Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten.

II. Phytohormongruppen und aktueller Kenntnisstand

Im folgenden soll ein Überblick über die Einteilung und Gruppenzugehörigkeit der Phytohormone und deren Metaboliten gegeben werden und jeweils eine knappe Darstellung des Kenntnisstandes erfolgen.

2.1. Isoflavone

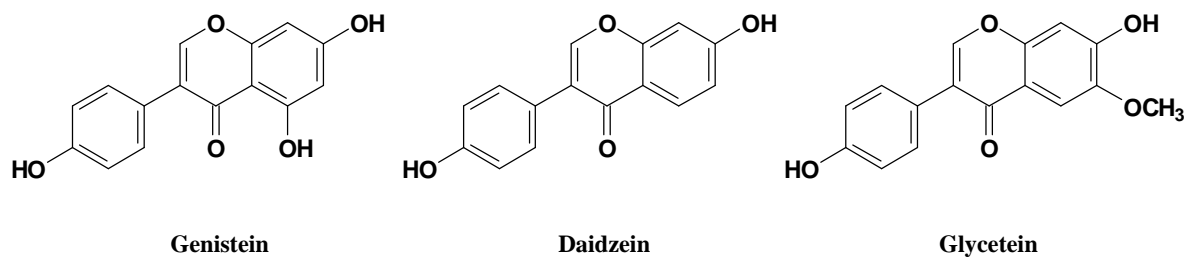


Abb.2.1: Strukturformeln der drei Hauptvertreter der Isoflavone

Der Hauptaufnahmeweg für Isoflavone ist die Nahrung. Dort enthalten vor allem Produkte auf Sojabasis einen großen Anteil an Isoflavonen (5-10% Trockengewichtanteil). Dabei ist die Verarbeitung für den Gehalt der drei Hauptvertreter Daidzein, Genistein und Glycetein (Abb.2.1) der entscheidende Faktor. Der prozentuale Anteil bewegt sich für Sojakeime bei 42% Daidzein, 8% Genistein und 50% Glycetein, hingegen für Sojamilch bei 43% Daidzein, 49% Genistein und 8% Glycetein (Setchell et al., 1998; Franke et al., 1998; Zhang et al., 1999). Die drei Isoflavonvertreter liegen in der Sojapflanze überwiegend als Konjugate vor. Die Aufnahme der Konjugate in den Organismus ist gegenüber den Aglyconen etwas verlangsamt, jedoch wird ein Teil der Konjugate auf dem Weg zur Aufnahme in die Aglycone aufgespalten (Lampe et al., 1998; King und Bursill, 1998; King, 1998; Piskula, 2000; Izumi et al., 2000; De Boever et al., 2000). Ein Teil der Isoflavone wird im Gastrointestinaltrakt durch die dortige Mikroflora in verschiedene Metabolite umgewandelt (De Boever et al., 2000). Hauptvertreter der reduktiven Metabolisierung (Abb. 2.2) durch die Darmbakterien sind für Daidzein Equol (70%) und O-Desmethylangolensin (ODMA; 5-25%) (Bannwart et al., 1984; Watanabe et al., 1998). Kürzlich wurde berichtet, dass Isoflavone neben dieser reduktiven Metabolisierung mit anschließender Konjugation auch einer oxidativen Biotransformation unterliegen. Diese Form des Abbaus wurde für Daidzein durch Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen bestätigt, indem als oxidative Metaboliten 4,6,7- und 3,4,7- Trihydroxyisoflavon nachgewiesen wurden (Kulling et al., 2000, 2001 und 2002).

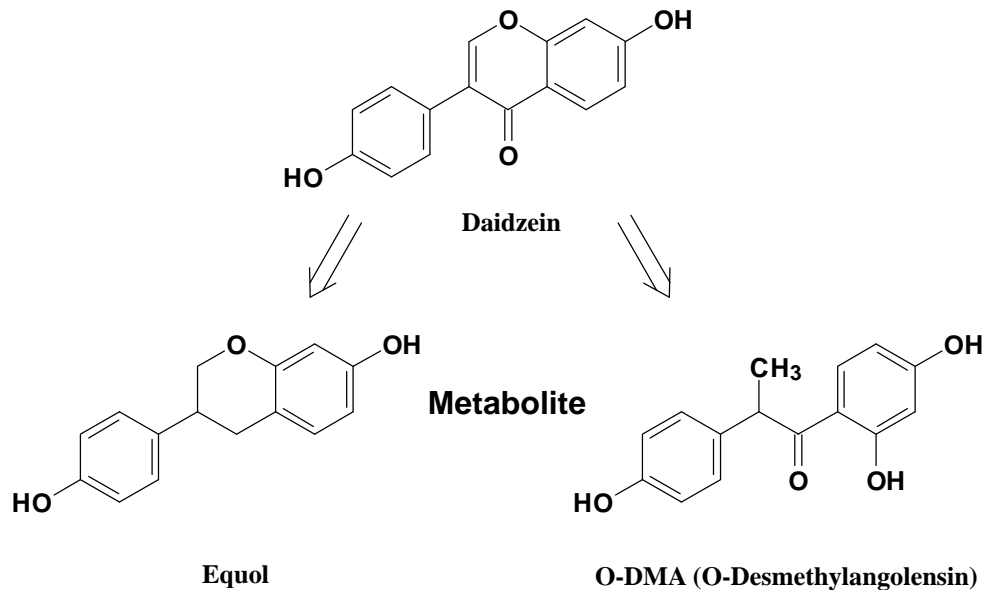


Abb.2.2: **Reduktive Metabolisierung des Isoflavons Daidzein**

Mutagenitätstests und Gentoxizitätstests der Substanzen Genistein, Daidzein und Glycetein stellen heraus, daß Genistein, welches nur eine Hydroxy – Gruppe mehr als Daidzein trägt, sowohl mutagen ist als auch zur dosisabhängigen Induktion von Mikrokernen führt (Metzler et al., 1998; Kulling et al., 1999 und 2002; Pool-Zobel et al., 2000; Boos und Stopper, 2000), wohingegen sich Daidzein als auch Glycetein (Schmitt et al., 2001) bezüglich beider Tests inert verhalten (Metzler et al., 1998; Boos und Stopper, 2000). Die durch Genistein induzierten Mikrokerne enthalten ausschließlich Chromosomenfragmente, weshalb Genistein als klastogene Substanz eingeordnet wird (Metzler et al., 1998). Equol wurde bezüglich gentoxischer Wirkungen noch nicht untersucht. Deshalb wird zur Ergänzung der Datenlage in dieser Arbeit die Gentoxizität der reduktiven Metaboliten des Daidzeins, Equol und O-DMA der oxidativen Metaboliten, 3,4,7-Trihydroxyisoflavon und 4,6,7-Trihydroxyisoflavon, welche in vivo von intestinalen Bakterien gebildet werden, überprüft. Diese Untersuchung ist insbesondere deshalb wichtig, weil diese Metaboliten im Urin von Freiwilligen nach der Aufnahme der Ursprungssubstanz nachgewiesen werden konnten (Kulling et al., 2001).

2.2. Flavone

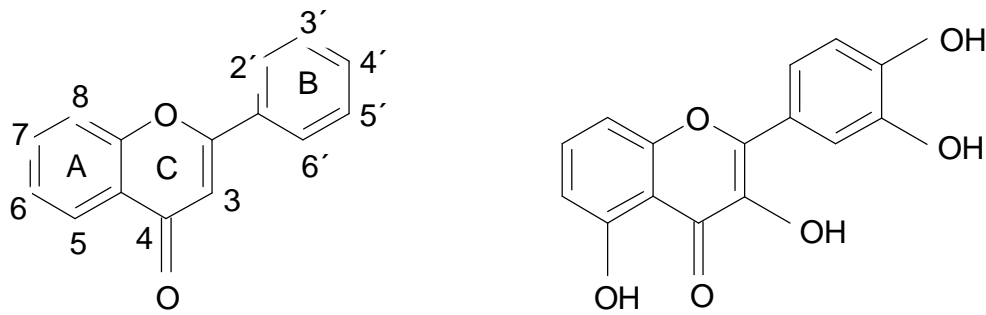


Abb.2.3. Grundstruktur der Flavone (links) und die Struktur von Fisetin (rechts)

Flavone sind in vielen Pflanzen natürlich vorkommende Substanzen mit geringem molekularem Gewicht. Die tägliche Aufnahme mit der Nahrung wird auf Werte von 23 bis 1000 mg pro Tag geschätzt (Peterson und Dwyer, 1998). Die Gruppe der Bioflavonoide besteht aus über 100 verschiedenen Substanzen. In einigen Studien wurde eine leichte östrogene Aktivität der Flavone gefunden (Breinholt und Larsen, 1998; Kuiper et al., 1998). Großes Interesse verursachen diese Substanzen derzeit durch mögliche chemoprotektive Wirkung gegen Krebs und Herzerkrankungen (Formica und Regelson, 1995; Harborne und Williams, 2000; Ferguson, 2001). Einige Studien zeigen mutagene und gentoxische Effekte der Flavone (Bjeldans und Chong, 1977; Carver et al., 1983; Rueff et al., 1992; Stavric, 1984; Van der Hoeven et al., 1984) wohingegen andere Studien antikarzinogene Aktivitäten postulieren (Suolinna et al., 1975; Wiltout und Hornung, 1988). Der Schutz vor oxidativer Schädigung der DNA durch freie Radikale ist einer der wichtigsten chemoprotetiven Effekte der Bioflavonoide (Burda und Oleszek, 2001). Das Flavon Fisetin, das auch in Pflanzen vorkommt, zeigte mutagene Aktivität im Ames-Test (Hardigree und Epler, 1978). Bezüglich gentoxischer Effekte liegen noch keine Daten vor. Deshalb wurden gentoxische Effekte an Mauslymphomzellen in dieser Arbeit untersucht.

2.3. Stilbene

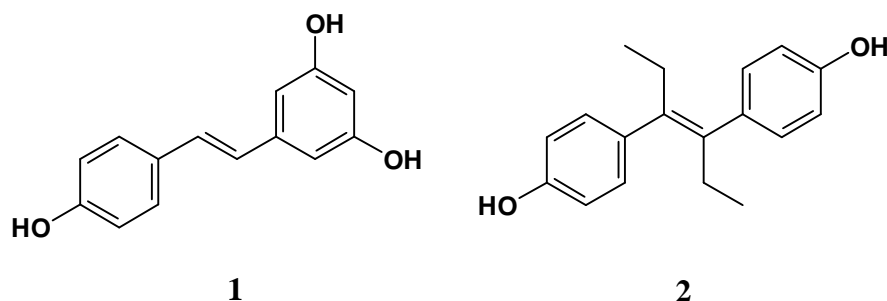


Abb.2.4: Strukturformeln der beiden Stilbenderivate Resveratrol (1) und Diethylstilböstrol (2)



Abb.2.5: Weintrauben

Resveratrol ist ein Vertreter der Polyphenole und in vielen Pflanzen vertreten (Abb.2.5.). Resveratrol wird als sogenannter sekundärer Pflanzeninhaltsstoff in einer Vielzahl von Pflanzen als Abwehrstoff gegen Infektionen, vor allem bei Pilzbefall gebildet. Dieses Phytoalexin (phytos = Pflanze; alekein = abwehren) wird vor allem über Nahrungsmittel auf Basis von

Erdnuss- und Traubenprodukten aufgenommen (Macholz und Lewerenz, 1989). Der Gehalt an Resveratrol variiert verarbeitungsbedingt in Trauben bzw. Wein sehr stark zwischen 0,2 bis 8,0 mg/l (Mattivi, 1993; Romero-Rerez et al., 1996; Wamhoff et al., 1998). Der Gehalt an Resveratrol kann durch erhöhte UV-Einstrahlung gesteigert werden (Celotti et al., 1996; Cantos et al., 2000).

Resveratrol wird chemoprotektive Wirkung zugesprochen (Lee et al., 1998; Calabrese et al., 1999), da es als Radikalfänger wahrscheinlich als natürliches Antioxidans bei oxidativer Schädigung der DNA wirkt (Cadenas und Barja, 1999; Lin und Tsai, 1999). Diese Entdeckung wurde als „French-Paradoxon“ bekannt, da man bei bei Franzosen trotz fettreicher Ernährung ein erniedrigtes Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen fand. Weiterhin wurde antiinflammatorische Wirkung des Resveratrols durch Suppression der Prostaglandinsynthese beschrieben (Martinez und Moreno, 2000) und eine Verbesserung des Lernverhaltens sowie Nervenregeneration im Hirn gefunden (Tredici et al., 1999; Bertelli et al., 2001). Ebenso konnte in mehreren Studien antikanzerogene und antimutagene Wirkung des Resveratrols beschrieben werden (El Attar et al., 1999; Jang et al., 2000; Ciolino und Yeh, 1999; Chun et al., 1999; Mitchell et al., 1999). Bei in-vitro Untersuchungen zur Gentoxizität und Mutagenität konnte Mikrokerninduktion, Chromosomenaberration und Schwesterchromatidenaustausch nachgewiesen werden (Matsuoka et al., 2001). Eine weitere Abklärung dieser unterschiedlichen Datenlage zwischen in-vitro und in-vivo Forschung wäre erstrebenswert.

2.4. Lignane

Die Phytohormongruppe der Lignane ist in der westlichen Küche stärker in der Nahrung vertreten als die Isoflavone (Messina, 1999). Ähnlich den Isoflavonen liegen die Lignane in den Pflanzen als glycosilierte Konjugate vor. Toxikologisch sind vor allem auch die Lignanmetaboliten zu untersuchen, da die Ausgangsverbindungen im Gastrointestinaltrakt durch die dort

ansässige Bakterienflora zum Teil vor der Resorption in Metaboliten aufgespalten wird. Epidemiologische Studien fanden antikarzinogene Wirkung der Lignane (Pool-Zobel et al., 2000; Xu et al., 1998; Osswald et al., 2000). Die genotoxische Wirkung der Lignane und ihrer Metaboliten wurde bisher in einer Studie von Kulling (Kulling et al., 1998) untersucht und man fand keinerlei genotoxische Aktivität in verschiedenen Testsystemen, wobei die Substanzen bis zu einer Konzentration von 100µM oder bis zur Löslichkeitsgrenze untersucht wurden.

2.5. Anthocyane

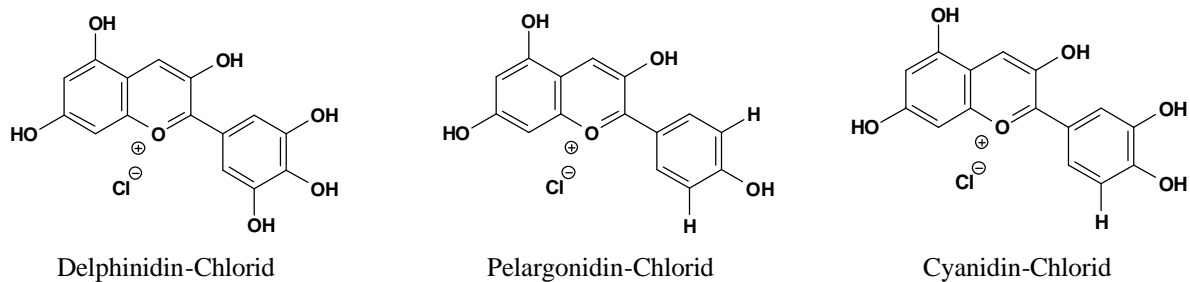


Abb.2.6: Strukturformeln der drei Aglycone der Anthocyane



Abb.2.7: Rote Trauben

Die Stoffklasse der Anthocyane zählt zur Gruppe der Flavanoide und kommt weitverbreitet in Blüten, Früchten und Gemüse vor und ist als natürlicher Farbstoff für das gesamte Spektrum von Blau bis Rot (Abb.2.8) verantwortlich. Die Anthocyane kommen in Pflanzen vorwiegend als Glycoside (Glycosilierung in 5-Stellung) und Polyacyl-Konjugate vor. Diese Polyacyl-Konjugate bilden komplexe dreidimensionale Strukturen (Sandwich-Stacking), die die Mannigfaltigkeit der Farben erklärt. Der Gehalt an Anthocyanen macht in vielen Pflan-

zen und Früchten den Hauptteil an Polyphenolen aus. So werden in Erdbeeren 0,15mg/g, in Kirschen bis 4,5mg/g und in Weintrauben bis zu 800mg/l gefunden (Mattivi, 1993; Lapidot, 1998; Sriram et al., 1999; Spagna et al., 2000; Scalbert und Williamson, 2000). Die errechnete Aufnahmemenge des Menschen über Nahrungsmittel beträgt 23 bis 1000mg/d an Flavanoiden (Markakis, 1982; Peterson und Dwyer, 1998). Nach moderatem Weinkonsum (0,4 l) können beachtliche Plasmaspiegel von bis zu 10µM erreicht werden. In der Lebensmittelindustrie besitzen die Anthocyane als Lebensmittelzusatzstoffe zum Färben von Nahrungsmitteln (E163) und als Antioxidantien Bedeutung (Bold, 1978; Macholz und Lewerenz, 1989). Anthocyane besitzen antioxidative Wirkung (Kanner et al., 1994; Wang et al., 1997; Lapidot

et al., 1999). Chemoprotektive Wirkung konnten Sarma und Sharma (1999) in ihrer Forschung zeigen. Oxidativer Streß, durch UV-Bestrahlung, konnte durch DNA-Anthocyan-Komplexe inhibiert werden. Antimutagene, antimikrobielle, antiinflammatorische und anti-karzinogene Wirksamkeit konnten ebenso belegt werden (Mc Gregor und Jurd, 1978; Formica und Regelson, 1995; Del Rio et al., 1997).

III. Aufgabenstellung und Hintergrund dieser Arbeit

Hintergrund dieser Arbeit ist, daß Pflanzenextrakte, die Phytohormone enthalten, in der heutigen Zeit mehr und mehr als natürliche, ja geradezu omnipotente Heilmittel für eine stetig wachsende Anzahl der verschiedensten Erkrankungen angepriesen werden. Das Augenmerk der folgenden Untersuchungen richtet sich dabei auf Substanzen mit östrogenem Potential, deren Konsum in der Fachliteratur und immer häufiger auch in der Laienpresse invers mit dem Auftreten hormon-abhängiger Erkrankungen, wie Brust- und Prostata-Krebs oder Osteoporose assoziiert wird. Gerade auch im Bereich der klimakterischen Hormonersatztherapie werden die Phytohormone gerne als natürlicher Ersatz für sogenannte „Designer-Östrogene“ herangezogen, da bei ihnen ein besseres Verhältnis von Wirkung zu Nebenwirkung vorzuliegen scheint. So erhöhen sie zum Beispiel im Gegensatz zu den „Designer-Östrogenen“ und „Selektiven Estrogen Rezeptor Modulatoren (SERM)“ angeblich nicht das Risiko für thromboembolische Erkrankungen. Aus genannten Gründen kann die tägliche Aufnahme an Phytohormonen, sei es in Form von Nahrung (z.B. Soja, Wein, Früchte) oder in pharmazeutisch aufbereiteter Form, wie zum Beispiel Pillen, die keinerlei Standardisierung der Dosis unterliegen, über 100 mg pro Tag betragen und dem zufolge Blutplasmaspiegel von über 1 μM erreichen. Als erschreckend kann die Tatsache gewertet werden, daß viele dieser Substanzen den Weg in die Verkaufsregale finden, ohne der gleichen pharmakologischen und toxikologischen Prüfung unterzogen zu werden, wie das für andere in Lebensmitteln vorkommenden Substanzen, wie zum Beispiel Konservierungs-, Farb- und Aromastoffe, inzwischen selbstverständlich ist (Matthews et al., 1999; Doerge et al., 2000). Die Möglichkeit, dass es neben therapeutischen auch toxische Effekte dieser Substanzen geben kann, wird dabei allzu gerne ignoriert.

Daten zur Auslösung von Krankheiten durch Phytohormone mit östrogenen Wirkung sind nur für wenige Verbindungen oder nur für potente synthetische Verbindungen (Diethylstilböstrol), die in hohen Dosen zur Therapie eingesetzt werden, vorhanden. Deshalb es war es Aufgabe dieser Arbeit, für eine Auswahl von Phytohormonen mit östrogenen Aktivität oder für deren Metaboliten, die aus den Ausgangssubstanzen meist durch bakteriellen Umbau im Gastrointestinaltrakt oder durch Metabolisierung in der Leber entstehen, deren Toxizität und Genotoxizität durch in-vitro Tests an Mauslymphomzellen L5178Y zu untersuchen und die bestehende Datenlage zu ergänzen.

Zur Aufklärung der Toxizität und Genotoxizität der Substanzen oder Metaboliten verfügt man über gut etablierte in-vitro Tests, die durch die Möglichkeit der Bearbeitung einer großen Probenzahl sehr gut zur Früherkennung möglicher adverser Effekte geeignet sind. Die Toxizität soll in dieser Arbeit durch konzentrationsabhängige Proliferationsexperimente und durch Bestimmung der Zellvitalität mit der Ethidiumbromid-Flouresceindiacetat-Methode sowie durch Analyse der Teilungsaktivität der Zellen nach Behandlung mit Cytochalasin B und anschließender Bestimmung des Anteils mehrkerniger Zellen bestimmt werden. Zur Überprüfung möglicher genotoxischer Aktivität wird auf den weitverbreiteten in-vitro Mikrokerntest zurückgegriffen. Um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden und damit genotoxische Aktivität von Substanzen oder Metaboliten auch in toxischen und damit zellteilungsinhibierenden Konzentrationen nicht zu übersehen, wurde der Mikrokerntest um die Doppelkernmethode nach Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B ergänzt. Durch Auszählen der Mikrokernfrequenz in doppelkernigen, also teilungsaktiven Zellen kann ein Auftreten einer erhöhten Zahl an Mikrokernen auf die Zellteilungsrate bezogen werden. Um einen Hinweis auf den möglichen Wirkmechanismus der genotoxischen Aktivität von Substanzen zu erhalten wurden in dieser Arbeit die Daten des Mikrokerntestes durch eine nähere Untersuchung der Mikrokernkerne ergänzt. Dazu wurde ein indirekter Immunfluoreszenznachweis von Kinetochorproteinen durchgeführt, der zwischen aneugener oder klastogener Wirksamkeit von Substanzen differenzieren läßt.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sollen die Datenlage, vor allem zu den Phytoöstrogen-Gruppen der Isoflavone, Flavone, Stilbene und Anthocyane ergänzen, damit eine Grundlage geschaffen werden kann, auf der basierend zukünftig eine Risikoabschätzung für die Exposition des Menschen gegenüber östrogen wirksamen Substanzen besser durchführbar sein wird.

IV. Material und Methoden

4.1. Laborchemikalien und Arbeitsgeräte

4.1.1. Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle Chemikalien wurden in höchster Qualität kommerziell erworben. Sie stammten von den Firmen Sigma Chemie (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Aldrich Chemie (Steinheim).

Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden Produkte der Firmen Ventana Medical Systems (USA) und Antibodies Incorporated (USA) verwendet.

Hochreines Lösungsmittel wurde aus der hauseigenen Reinstwasseranlage entnommen (Millipore-System). Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder über Millipore-Filter sterilfiltriert.

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Hartenstein (Würzburg) und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur von der Firma Greiner (Nürtingen) geliefert.

4.1.2. Arbeitsgeräte

Autoklav	Melag Typ 28, Melag, Deutschland
Brutschrank	Typ B 5060 EK-CO ₂ , Heraeus, Deutschland
Coulter Counter	Z1 bzw. Z2, Coulter Electronics, UK
Lichtmikroskop	Zeiss, Deutschland
Netzgeräte	Power Pac 300, Biorad, Deutschland Power Supply 500/500, Roth, Deutschland
Pipetten	Gilson, Frankreich Eppendorf, Hamburg Labsystem, Finnland
Sterile Werkbank	Gelaire BH 26, Flow Laboratories, Deutschland
Sterilisator	Heraeus, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RK 103 H, Bandelin, Deutschland
Wasserbad	Kottermann, Deutschland
Zytozentrifuge	Cytospin 3, Shandon, UK

4.2. Puffer und Lösungen

Acridin-Orange-Lösung: 450 µl 1%ige Acridin-Orange-Stammlösung (Sigma) auf 71,5 ml Sörensen-Puffer.

Mit diesem Fluoreszenzfarbstoff wurden die Zellen für die Mikrokernauszählung gefärbt.

Bisbenzimid-Lösung: 1mg Bisbenzimid (Sigma) in 1ml DMSO lösen. Aus dieser Stammlösung wird eine Gebrauchslösung der Konzentration 5µg/ml durch Verdünnen mit PBS/CMF-Puffer hergestellt.

Mit diesem Fluoreszenzfarbstoff wurde das Chromatin der Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz gefärbt.

Ethidiumbromid/Flouresceindiacetat-Lösung:

- à 30µl Ethidiumbromid (Sigma, 1mg/ml bidest H₂O)
- à 15µl Flouresceindiacetat (Sigma, 5mg/ml Aceton)
- à 2,5 ml PBS/CMF-Puffer

Diese Farbstoffmischung diente zur Überprüfung der Membranintegrität der Zellen und somit zur Überprüfung von deren Vitalität.

Sörensen-Puffer:

- à Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat: 5,84g in 492ml H₂O (bidest)
- à Kaliumhydrogenphosphat: 4,61g in 508ml H₂O (bidest)
- à PH-Wert des Puffers: 6,8

Der Puffer diente dem Entfärben der Zellen bei der Mikrokernauszählung

PBS/CMF-Puffer:

- à 8,0g Natriumchlorid
- à 0,2g Kaliumchlorid
- à 0,575g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
- à 0,2g Kaliumhydrogenphosphat
- à hochgereinigtes Wasser ad 1000ml, sterilfiltriert
- à pH-Wert des Puffers: 7,0

Der Puffer wurde zur Herstellung des Tween-Puffers benötigt.

Tween-Puffer: Herstellung eines 0,1%igen und eines 0,5%igen Tween-Puffers (Polyoxyethy-

lensorbitanmonolaurat – Tween 20, Sigma, 500ml) durch Verdünnung mit PBS/CMF-Puffer.

Dieser Puffer diente dem Waschen der Zellen bei der Bisbenzimidfärbung und zur Verdünnung der FITC-konjugierten-Ziege-anti-Human-IgG-Antikörper (1:100).

4.3. Zellkultur

4.3.1. Verwendete Zelllinie

Alle Versuche wurden mit Maus-Lymphom-Zellen L5178Y tk^{+/-} (MoLy) durchgeführt, die von Prof. Dr. W. J. Caspary, National Institute of Environmental Health Sciences, North Carolina (USA) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zelllinie besitzt nur eine geringe metabolische Kompetenz. Daher sollte für die zu untersuchende DNA-schädigende Wirkung von Substanzen ein aktivierungsunabhängiger Mechanismus verantwortlich sein.

4.3.2. Kulturmedium

Das verwendete Medium setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

à Grundmedium RPMI 1640 (Sigma, 500ml, mit Phenolrot)	500ml
à Pferdeserum, hitzeinaktiviert 30min. bei 56°C (10% der Lösung)	50ml
à Natrium-Pyruvat 107µg/ml (Sigma, 100ml)	5ml
à L-Glutamin 0,25mg/ml (Sigma, 100 ml)	5ml
à Penicillin 40U/ml; Streptomycin 0,04mg/ml (Sigma, 100ml)	2ml

4.3.3. Kultivierung der Zellen

4.3.3.1. Auftauen der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagerten Zellen wurden zu Beginn der Versuchsreihe im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nachdem unter der Sterilbank die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert wurde, waren nun in der Zentrifuge die Zellen vom DMSO-haltigen Einfriermedium zu trennen. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in eine Zellkulturflasche (T25, Greiner) überführt, nachdem es in 5ml Kulturmedium auf-

genommen und zur Vereinzelung der Zellen mehrfach resuspendiert wurde. Es folgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂- Atmosphäre. Am nächsten Tag war ein Mediumwechsel zur Entfernung entstandener Zelltrümmer durchzuführen und die Zellen wurden in eine T100- Zellkulturflasche überführt, von wo aus sie zur Zellgewinnung für die Versuchsreihen passagiert wurden.

4.3.3.2. Passagieren der Stammreihe

Die L5178Y-Zellen wurden als Suspension frei wachsender Zellen bei 37°C und 5%iger CO₂- Atmosphäre in T100-Zellkulturflaschen (Greiner) im Brutschrank kultiviert und drei mal pro Woche passagiert. Das Passagieren der Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

Unter der Sterilbank wurde die Zellsuspension zunächst mit 5ml Pipetten zur Vereinzelung der Zellen wiederholt resuspendiert. Dann wurde durch Entnahme eines Aliquots der Suspension (200 µl) die Zellzahl mit Hilfe des Coulter-Counters bestimmt. Hierdurch konnte auf einfache Art und Weise eine Qualitätskontrolle der Zellen durchgeführt werden, da beurteilt werden konnte, ob eine normale Replikations- bzw. Verdopplungsrate der Zellen von etwa 10 Stunden vorlag. Danach wurde aus der bestehenden Zellkulturflasche mit der konzentrierten Zellsuspension soviel Volumen entnommen und mit neuem Kulturmedium (37°C, ca. 50ml) in einer neuen Flasche resuspendiert, daß eine Aussaat in einer Ausgangskonzentration von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml erreicht wurde.

4.3.3.3. Anlegen der Testkulturen

Am Vortag eines jeden Versuchs wurden Maus-Lymphomzellen aus der Stammkultur entnommen und in einer Zelldichte von $1,5 \cdot 10^5$ Z/ml ausgesät. Dabei mußte soviel Volumen unter Berücksichtigung der Zellverdopplungsrate angesetzt werden, daß am nächsten Tag genügend Zellen zur Durchführung des Versuchs zur Verfügung standen. Die Zellkulturflasche wurde im Brutschrank verwahrt. Zu Beginn des Versuches wurde dann nach Resuspendieren der Zellsuspension die Zelldichte bestimmt und anhand des Wachstums unter Berücksichtigung einer Replikationsrate von ca. 10 Stunden beurteilt, ob die Zellen in Ordnung sind und für den Versuch verwendet werden konnten. Außerdem wurde eine Probe der Zellsuspension der Vitalitätsfärbung unterzogen.

Danach folgte das Ansetzen der Testkulturen, indem die Zellsuspension durch Zusatz von

frischen, auf 37°C erwärmten Mediums auf eine Zelldichte von $2,0 \cdot 10^5$ Z/ml verdünnt und entsprechend der Anzahl der zu überprüfenden Test- und Kontrollsubstanzkonzentrationen in jeweils zwei separaten Ansätzen zu je 4 ml in T25-Zellkulturflaschen gefüllt wurde. Danach wurden noch entsprechende Volumina an Kontroll- oder Testsubstanzen hinzupipetiert und nach Resuspension folgte die 4-stündige Testsubstanzinkubation im Brutschrank.

4.4. Testsubstanzen

Die Zellkulturen wurden mit folgenden Testsubstanzen inkubiert:

à Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, D-5879, 500ml
à Diethylstilbestrol (DES)	Sigma
à Genistein (GEN)	Sigma
à Equol	Biochemica, 45405, 1mg, ~99%
à O-Desmethylangolensin (O-DMA)	Biochemica
à 3,4,7-Trihydroxyisoflavone	Biochemica, 91953, 5mg, ~99%
à 4,6,7-Trihydroxyisoflavone	Biochemica, 91956, 5mg, ~98%
à Fisetin-Hydrat	Sigma, 08011-039, 100mg
à Resveratrol	Sigma, R-5010, 100mg
à Delphinidin-Chlorid	Roth, 4537.1, 10mg
à Pelargonidin-Chlorid	Fluka Chemica, 76320, 10mg
à Cyanidin-Chlorid	Roth, 4545.1, 10mg

Die Testsubstanzen wurden durchweg als Trockenpulver erworben. Die Stammlösungen wurden durch Lösen der Substanz in DMSO mit Hilfe des Ultraschallbades erstellt.

Die Testsubstanzen wurden überprüft, indem das zu testende Konzentrationsspektrum ansteigend vom „no-effect-level“ bis hin zur Toxizitätsgrenze der Substanzen gelegt wurde. Traten bis zur Löslichkeitsgrenze der Substanzen keine adversen Effekte auf, so bildete diese die obere Begrenzung des Untersuchungsspektrums.

Prinzipiell durften die zu den Testansätzen, welche mit einem Volumen von 4ml ausgesät wurden, hinzupipetierten Lösungen der Kontroll- und Testsubstanzen nicht mehr als 1% (=40µl) des Kulturvolumens betragen, um Zellschäden zu vermeiden.

4.5. Testverfahren und methodisches Vorgehen

4.5.1. Allgemeines

Die Vorgehensweise vorliegender Arbeit bei der Untersuchung des Risikoprofils der Testsub-

stanzen beruht auf zwei Prinzipien – die Ermittlung des toxischen sowie des genotoxischen Potentials. Im Gegensatz zur Untersuchung auf akute, chronische und reproduktionstoxische Aktivitäten, für die auf Tierversuche nicht verzichtet werden kann, eigneten sich in dieser Arbeit zur Bestimmung des toxischen und genotoxischen Potentials von Substanzen in-vitro Testverfahren am besten, welche ein großflächiges Screening durch die Möglichkeit der Bearbeitung einer großen Probenzahl ermöglichen. Außerdem eignen sich diese vorzüglich zur Aufklärung molekularer Wirkmechanismen.

Die Kenntnis des toxischen Potentials von Testsubstanzen, insbesondere die Kenntnis der Konzentrationsabhängigkeit zytotoxischer Effekte ist essentielle Voraussetzung für eine korrekte Bewertung und Interpretation genotoxischer Effekte, zu deren Beurteilung die Ermittlung von Mikrokernfrequenzen herangezogen wurde. Eine vitale und ihrer Funktion integre Zelle ist nämlich die Grundvoraussetzung für die Induktion von Mikrokernen. Fehlende Induktion von Mikrokernen bei Missachtung stark zytotoxischer Konzentrationen kann zur falsch-negativen Ergebnisinterpretation führen. Rückschlüsse auf den Mechanismus genotoxischer Aktivität konnten aus der Analyse der Mikrokern nach Immunfärbung mit dem Serum von Scleroderma-Patienten (Crest-Syndrom) gezogen werden.

4.5.2. Toxizitätstests

Zytotoxische Effekte der Testsubstanzen wurden an den folgenden drei Testsystemen erhoben.

4.5.2.1. Proliferationsexperimente

Um eine Steigerung oder Inhibierung der Zellproliferation im Vergleich zur normalen Replikationsrate von ca. 10 Stunden und damit mögliche toxische Effekte festzustellen, wurden Wachstumskurven der Zellen erstellt.

Die Werte zur Erstellung der Wachstumskurven erhielt man, indem aus jedem Versuchsansatz ein Aliquot von 20µl aus den resuspendierten Zellsuspensionen entnommen wurde, dieses mit isotoner Natrium-Chlorid Lösung auf 10ml Gesamtvolumen ergänzt wurde und im Coulter-Counter die Zelldichte des Ansatzes (Mittelwert aus jeweils zwei Messungen) ermittelt wurde.

Die erste Feststellung der Zelldichte erfolgte zu Beginn des Versuches (0 Stunden; entspricht Dichte der Aussaat). Danach erfolgte eine 4-stündige Inkubation mit den Testsubstanzen. Nach Resuspension erfolgte die zweite Feststellung (4 Stunden). Danach wurden die Zellen

gewaschen. Dies erfolgte durch zentrifugieren (5min., 1000rpm), Abgießen des Überstandes (in diesem befand sich die gelöste Testsubstanz) und Resuspension in 4ml neuem, auf 37⁰C erwärmten Medium. Danach wurde 5 Stunden Recovery-inkubiert. Hier erfolgte die dritte Feststellung (9 Stunden). Nach weiteren 15 Stunden Recovery-Inkubieren erfolgte die letzte Feststellung (24 Stunden).

Für jede Substanz wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt. Zur tabellarischen Darstellung kommen die vermittelten Ergebnisse zu jedem Feststellungszeitpunkt für jeden der durchgeführten Einzelversuche. Um für jede Testsubstanz zu einer Gesamtaussage zu kommen wurden zunächst zu jedem Einzelversuch die Relativwerte in Bezug auf die Löse-mittelkontrolle Dimethylsulfoxid berechnet; anschließend wurde das arithmetische Mittel aus allen zur jeweiligen Substanz durchgeführten Versuche gebildet, welches zur graphischen Darstellung kam (nur aus Ansätzen ohne Cytochalasin B).

4.5.2.2. Zellvitalitätstest

Der Zellvitalitätstest nach Strauss (Strauss, 1991) erfasste mögliche zytotoxische Effekte, indem die Überlebensrate von Zellen im allgemeinen oder nach Behandlung mit Testsubstanzen bestimmt wurde. Die Kenntnis der Zellüberlebensrate war ferner von essentieller Bedeutung bei der Beurteilung der Mikrokerninduktion, da bei hoher Toxizität einer Substanz eine potentielle Mikrokerninduktion ausbleibt, wenn die Zelle bereits tot ist. Somit konnte eine falsch-negative Ergebnisinterpretation bei den Gentoxizitätstests verhindert werden. Zu beachten ist jedoch, dass sich der physiologische Prozentsatz toter Zellen in der Suspension in der Regel bei unter 5% bis maximal 10% bewegt.

Die Ethidiumbromid / Flouresceindiacetat-Methode beruht auf 2 Prinzipien:

à **Flouresceindiacetat** ist farblos und wird nachdem es in die Zelle aufgenommen wurde durch die dort anwesenden aktiven Esterasen zu Flourescein gespalten, welches unter dem Floureszenzmikroskop grün leuchtet. Genannte Esterasen sind nur in lebenden Zellen aktiv, weshalb sich bereits abgestorbene Zellen nicht anfärben.

à **Ethidiumbromid** gelangt bei Zellen, die stark geschädigt oder abgestorben sind und deren Membranintegrität deshalb nicht mehr vollständig gegeben ist, in das Zellinnere und bindet dort an die DNA, was sich in einer roten Floureszenz ausdrückt. Intakte Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf.

Die Werte zur Bestimmung der Überlebensrate bzw. der Zellvitalität erhielt man, indem aus jedem Versuchsansatz ein Aliquot von 35µl aus der resuspendierten Zellsuspension entnommen wurde und auf einem Objektträger mit 15µl Färbelösung verrieben wurde. Nachdem die Suspension mit einem Deckglas versehen wurde, erfolgte die Auszählung lebender und toter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden mindestens 100 Zellen pro Versuchsansatz und Feststellungszeitpunkt ausgezählt.

Die erste Feststellung der Zellüberlebensrate erfolgte zu Beginn des Versuchs (0 Stunden). Danach erfolgte die 4-stündige Inkubation mit den Testsubstanzen. Nach Resuspension erfolgte die zweite Feststellung (4 Stunden). Danach wurden die Zellen gewaschen. Dies erfolgte durch zentrifugieren (5min., 1000rpm), Abgießen des Überstandes (in diesem befand sich die gelöste Testsubstanz) und Resuspension in 4ml neuem, auf 37⁰C erwärmten Medium. Danach wurde 20 Stunden Recovery-inkubiert. Hier erfolgte die letzte Feststellung (24 Stunden).

Für jede Substanz wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt. Zur tabellarischen Darstellung kommen die Ergebnisse jedes Feststellungszeitpunktes für jeden der durchgeführten Einzelversuche. Um für jede Testsubstanz zu einer Gesamtaussage zu kommen, wurde für jeden einzelnen Versuchsansatz zunächst der Prozentsatz überlebender Zellen bestimmt. Danach wurden die Prozentsätze für jeden Einzelversuch in Relativwerte in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle Dimethylsulfoxid umgesetzt. Anschließend wurde das arithmetische Mittel aus allen zur jeweiligen Substanz durchgeführten Versuche gebildet, welches zur graphischen Darstellung kam (nur aus Ansätzen ohne Cytochalasin B).

4.5.2.3 Anteil mehrkerniger Zellen

Durch die Zugabe von Cytochalasin B (Sigma, C-6762, 1mg) zu den Versuchsansätzen wird die Zytokinese der Zellen gehemmt und es entstehen doppel- und mehrkernige Zellen. Sollte eine Testsubstanz den Zellzyklus beschleunigen oder die Teilungshäufigkeit erhöhen, so wird sich dies in einem prozentualen Anstieg der doppel- und mehrkernigen Zellen repräsentieren und man erhält ein Maß für die Proliferationsrate. Umgekehrt wird sich ein toxischer Effekt in einer Verminderung des Anteils doppel- bzw. mehrkerniger Zellen in Bezug auf den Ansatz mit der Lösungsmittelkontrolle manifestieren.

Die Werte zur Bestimmung des Anteils mehrkerniger Zellen erhielt man, indem für jeden Einzelversuch parallel zu den normalen Ansätzen jeweils eine identische Reihe von Ansätzen

angelegt wurde. Beide Reihen von Versuchsansätzen wurden nach dem Aussähen für 4 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und danach gewaschen. Dies erfolgte durch zentrifugieren (5min., 1000rpm), Abgießen des Überstandes (in diesem befand sich die gelöste Testsubstanz) und Resuspension in 4ml neuem, auf 37⁰C erwärmten Medium. Den Ansätzen der Reihe, die zur Bestimmung des Anteils mehrkerniger Zellen dienen sollte, wurde an dieser Stelle soviel in Dimethylsulfoxid gelöstes Cytochalasin B zupipettiert, dass dieses in der Zellkultur in einer Konzentration von 5µg/ml vorlag. Dann schlossen sich 20 Stunden Recovery-Inkubation an. Aus diesen Ansätzen wurden nach Resuspension nun jeweils drei Aliquots von 130µl entnommen, mittels Zentrifuge (5 min., 1.000rpm) auf Objektträger aufgebracht und anschließend in tiefgekühlten (-20° C) Methanol fixiert. Die Färbung der Präparate erfolgte durch 3-minütiges Tauchen in Acridin-Orange-Lösung mit anschließendem zweimaligen Entfärben der Präparate für jeweils 5 Minuten durch Tauchen in Sörensen-Puffer. Die Auswertung erfolgte unter dem Floureszenzmikroskop indem pro Ansatz insgesamt etwa 2.000 Zellen, untergliedert nach

- n einkernig
- n zweikernig (diese wurden weiter nach 0 – 4 Mikrokernen untergliedert)
- n dreikernig und mehr

ausgezählt wurden.

Für jede Substanz wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt. Zur tabellarischen Darstellung kommen die Ergebnisse der Auszählungen für jeden der durchgeführten Einzelversuche. Um für jede Testsubstanz zu einer Gesamtaussage zu kommen, wurden zunächst für jeden Ansatz der Prozentanteil mehrkerniger (= zwei, drei oder mehr Kerne) Zellen bestimmt. Danach erfolgte für jeden Einzelversuch die Umrechnung in Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid; anschließend wurde das arithmetische Mittel aus allen zur jeweiligen Substanz durchgeführten Versuche gebildet, welches zur graphischen Darstellung kam.

4.5.3. Gentoxizitätstests

An den folgenden drei Testverfahrenn wurden gentoxische Effekte der Testsubstanzen erhoben. Dabei diente als Endpunkt zur Beurteilung der Gentoxizität die Ermittlung der Mikrokernfrequenzen. Die nähere Untersuchung der Mikrokerne sollte Hinweise auf deren Entstehungsmechanismus erbringen.

4.5.3.1. In-vitro-Mikrokerntest

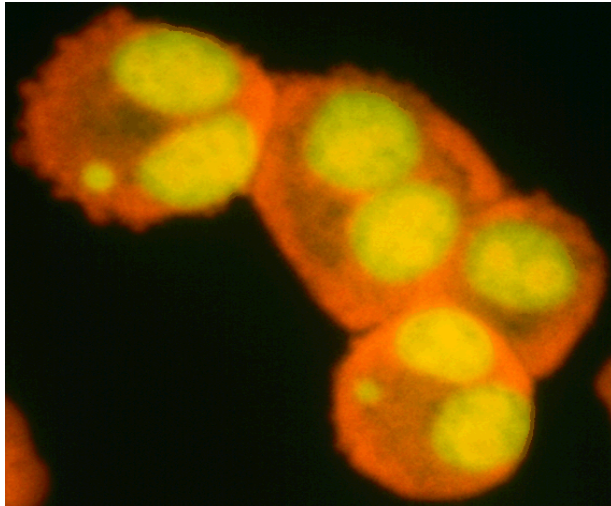


Abb.4.1: Mikrokerne in mit Acridin-Orange gefärbten L5178Y (Foto: Stopper / Full)

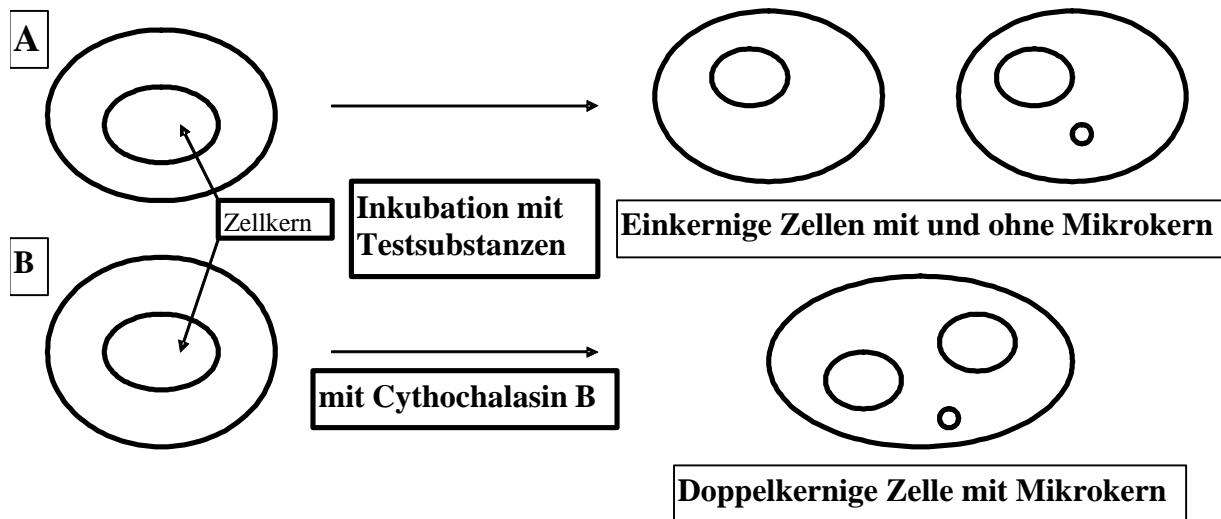
Mikrokerne (MK) stellen von einer doppelten Kernmembran umgebenes Chromatin im Zytoplasma der Zelle dar, das sich vom Hauptkern abgesondert hat (Abb.4.1). Es sind also kleinere Kerne (max. $1/3$ des Hauptkerndurchmessers), die sich außerhalb (dürfen den Hauptkern nicht berühren), aber in enger Nachbarschaft (nicht weiter als 2 Hauptkerndurchmesser entfernt) zum Hauptkern, von dem sie abstammen, befinden. Die Ultrastruktur des MK entspricht der eines

normalen Kerns; er besitzt Kernporen, Kernhülle, Hetero- und Euchromatin. Zur Entstehung von MK trägt der Verlust von Chromatinmaterial aus dem Hauptkern bei (Abb.4.2). Dieser wird in der Mitose möglich, wenn das Chromatin durch Kondensation in der „Transportform“, den Chromosomen vorliegt. Da MK durch den Verlust von Chromatinmaterial bei der Zellteilung entstehen, ist eine vorausgegangene Zellteilung für die Entstehung der MK obligat. Dabei können durch Schäden verschiedener Herkunft ganze Chromosomen oder aber azentrische Fragmente bei der Polwanderung verloren gehen. MK kommen in gesunden Zellen sehr selten vor, ihr Vorkommen kann durch Mutagene aber drastisch erhöht werden (Stopper und Müller, 1997). Dies macht man sich im in-vitro-Mikrokerntest zur Gentoxizitätsprüfung zu nutze.

Der Mikrokerntest kann ex vivo an Mauslymphozyten (Dekant und Vamvakas, 1995), die aus dem Knochenmark exponierter Tiere isoliert wurden, durchgeführt werden. Andere, in-vitro Testsysteme benutzen Säugerzellen. Dabei sind Zelllinien vom Hamster oder, wie in dieser Arbeit der Fall, von der Maus, sehr verbreitet (Combes et al., 1995; Stopper et al., 1997; Eckert und Stopper, 1996; Boos und Sopper, 2000).

Da mutagene Substanzen in höherer Konzentration oft toxisch wirken, teilen sich die Zellen nur noch bedingt. Zur Entstehung eines MK ist aber die Zellteilung Grundvoraussetzung. Um aneuploide oder klastogene Effekte trotz fehlender Mikrokerninduktion aufgrund hoher Zelltoxizität trotzdem nachzuweisen und falsch-negativem Befund vorzubeugen, bietet sich eine

Erweiterung des Mikrokerntests mit der Doppelkernmethode unter Zuhilfenahme des Zytokinesehemmers Cytochalasin B an. Hierbei kann die Mikrokernelnfrequenz auf vitale, sich in Teilung befindliche Zellen bezogen werden, indem nur Doppelkernige zur Auswertung herangezogen werden (Abb 4.2).



A: Bildung von Mikrokerneln in einkernigen Zellen nach Behandlung mit Testsubstanzen

B: Bildung von Mikrokerneln in doppelkernigen Zellen nach Inkubation mit Testsubstanzen und dem Cytokinesehemmer Cytochalasin B

Abb.4.2: Schematische Darstellung der Mikrokernelnbildung (Schmitt E., 2002)

4.5.3.1.1. Anteil mikrokernelnhaltiger Zellen

Die Versuchsansätze wurden nach dem Aussähen für 4 Stunden mit den Kontroll- und Testsubstanzen inkubiert und danach gewaschen. Dies erfolgte durch zentrifugieren (5min., 1000rpm), Abgießen des Überstandes (in diesem befand sich die gelöste Testsubstanz) und Resuspension in 4ml neuem, auf 37⁰C erwärmten Medium. Dann schlossen sich 20 Stunden Recovery-Inkubation an. Nach Resuspension wurden aus diesen Ansätzen jeweils drei Aliquots von 130µl entnommen, mittels Zentrifuge (5 min., 1.000rpm) auf Objektträger aufgebracht und anschließend in tiefgekühlten (-20° C) Methanol fixiert. Die Färbung der Präparate erfolgte durch 3-minütiges Tauchen in Acridin-Orange-Lösung mit anschließendem zweimaligen Entfärben der Präparate für jeweils 5 Minuten durch Tauchen in Sörensen-Puffer.

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop indem pro Ansatz insgesamt etwa 2.000 Zellen (da Ansätze ohne Zugabe von Cytochalasin B inkubiert wurden lagen nur einkernige Zellen vor), untergliedert nach der jeweils aufgetretenen Anzahl von Mikrokerneln (0–4) ausgezählt wurden.

Für jede Substanz wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt. Zur tabellarischen Darstellung kommen die Ergebnisse der Auszählungen für jeden der durchgeführten Einzelversuche. Um für jede Testsubstanz zu einer Gesamtaussage zu kommen, wurden zunächst für jeden Ansatz der Promilleanteil mikrokernhaltiger (Zellen mit 1-4 Mikrokernen) Zellen bestimmt. Danach erfolgte für jeden Einzelversuch die Umrechnung in Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid; anschließend wurde das arithmetische Mittel aus allen zur jeweiligen Substanz durchgeführten Versuche gebildet, welches zur graphischen Darstellung kam (eine nach 5-stündiger Recovery-Zeit in gleicher Weise durchgeführte Feststellung erscheint nur in tabellarischer Darstellung der ausgezählten Absolutwerte).

4.5.3.1.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

Die Werte zur Bestimmung des Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen erhielt man, indem für jeden Einzelversuch parallel zu den normalen Ansätzen jeweils eine identische Reihe von Ansätzen angelegt wurde. Beide Reihen von Versuchsansätzen wurden nach dem Aussähen für 4 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und danach gewaschen. Dies erfolgte durch Zentrifugieren (5min., 1000rpm), Abgießen des Überstandes (in diesem befand sich die gelöste Testsubstanz) und Resuspension in 4ml neuem, auf 37⁰C erwärmten Medium. Den Ansätzen der Reihe, die zur Bestimmung des Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen dienen sollte, wurde an dieser Stelle soviel in Dimethylsulfoxid gelöstes Cytochalasin B zupipettiert, dass dieses in der Zellkultur in einer Konzentration von 5µg/ml vorlag. Dann schlossen sich 20 Stunden Recovery-Inkubation an. Aus diesen Ansätzen wurden nach Resuspension nun jeweils drei Aliquots von 130µl entnommen, mittels Zentrifuge (5 min., 1.000rpm) auf Objektträger aufgebracht und anschließend in tiefgekühlten (-20° C) Methanol fixiert. Die Färbung der Präparate erfolgte durch 3-minütiges Tauchen in Acridin-Orange-Lösung mit anschließendem zweimaligen Entfärben der Präparate für jeweils 5 Minuten durch Tauchen in Sörensen-Puffer. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop indem pro Ansatz insgesamt etwa 2.000 Zellen, untergliedert nach

- n einkernig
- n zweikernig (diese wurden weiter nach 0 – 4 Mikrokernen untergliedert)
- n dreikernig und mehr

ausgezählt wurden, wobei nach Möglichkeit mindestens 1000 doppelkernige Zellen erfasst werden sollten.

Für jede Substanz wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt. Die tabellarische Darstellung der ausgezählten Absolutwerte erfolgte für jede Substanz bereits bei der Untersuchung ihres toxischen Potentials unter dem Punkt „Anteil mehrkerniger Zellen“ und ist dort nachzuschlagen. Um für jede Testsubstanz zu einer Gesamtaussage zu kommen, wurde zunächst für jeden Ansatz der Promilleanteil mikrokernhaltiger (1-4 Mikrokern) doppelkerniger Zellen bezüglich der Summe aller zum jeweiligen Ansatz ausgezählten zweikernigen Zellen bestimmt. Danach erfolgte für jeden Einzelversuch die Umrechnung in Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid. Anschließend wurde das arithmetische Mittel aus allen zur jeweiligen Substanz durchgeführten Versuche gebildet, welches zur graphischen Darstellung kam.

4.5.3.2. Indirekter Immunfluoreszenznachweis von Kinetochorproteinen

Die Anwendung von Zentromermarkierungen erweitert den Mikokern-Test, da er Unterschiede im Mechanismus der Mikrokernentstehung aufdeckt. Testsubstanzen können mit seiner Hilfe in Aneugene und Klastogene unterteilt werden:

Aneugene: Durch Spindeldefekte oder Kinetochorschädigung kommt es zum Verlust ganzer Chromosomen. Das verlorene Chromatinmaterial besitzt dann ein Zentromer

Klastogene: Durch Chromosomenbrüche entstehen azentrische Fragmente, die kein Zentromer besitzen und zentrische Fragmente (zentromerhaltig). Azentrische Fragmente gehen verloren, weil durch das Fehlen der Zentromere keine Befestigung an der Spindel erfolgen kann. Bei der Zellteilung bleiben diese azentrischen Fragmente in der Äquatorialebene liegen und bilden dann Mikrokern aus.

Die Kinetochorregion der Chromosomen wird mit Antikörpern aus dem Serum von Scleroderma-Patienten (Crest-Syndrom) und nachfolgender Bindung eines fluoreszenzmarkierten Ziege-anti-Human-Antikörpers dargestellt (Moroi et al., 1981; Tuffanelli et al., 1983; Degrassi & Tanzarella, 1988). Das Crest-Serum richtet sich spezifisch gegen die Proteine am Zentromer (Kinetochor). Sie lassen sich nach der Behandlung mit dem zweiten Antikörper detektieren. Sofern die Kinetochorproteine nicht beschädigt sind oder fehlen, zeigen vollständige Chromosomen mit dieser Methode ein Signal. Außer den zentrischen Fragmenten zeigen Fragmente kein Signal (Stopper et al., 1993; Pfeiffer et al., 1997; Stopper und Müller, 1997).

Zur Durchführung des Tests wurden jeweils Zellpräparate der Konzentration einer Testsub-

stanz herangezogen, die im Mikrokerntest eine nennenswerte Mikrokerninduktion zeigten und die aus der Versuchsreihe ohne Behandlung mit Cytochalasin B stammten. Zunächst wurden die Präparate 5 Minuten in 0,1%-igen Tween-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 10µl Crest-Serum (Antibodies Incorporated, 1ml) appliziert und mit einem Deckglas abgedeckt. In einer feuchten Kammer wurden die Präparate nun für 75 Minuten im Brutschrank bei 37⁰C inkubiert. Danach wurde zur Entfernung überschüssiger Antikörper zweimal 5 Minuten in 0,5%-igen Tween-Puffer gewaschen. Zur Detektion des ersten Antikörpers werden 20µl eines FITC-konjugierten Ziege-anti-Human-IgG-Antikörpers (Verdünnung 1:100 in 0,1%-igen Tween-Puffer) aufgetragen, mit einem Deckglas bedeckt und für 30 Minuten im Brutschrank bei 37⁰C inkubiert. Nun wurde erneut für 5 Minuten mit 0,1%-igen Tween-Puffer gewaschen.

Im direkten Anschluß an diese Immunfärbung wurden die Präparate für 3 Minuten in einer Bisbenzimid-Färbelösung angefärbt und danach 8 Minuten in 0,1%-igen Tween-Puffer entfärbt. Schließlich wurden die Präparate durch Eindecken mit Antifade (Appligene, Onco, 960µl) und bedecken mit einem Deckglas für die Mikroskopie vorbereitet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung und unter Benutzung von Immersionsöl. Die Doppelfärbung der chromatinhaltigen Strukturen ermöglichte ein Auffinden der Mikrokernkerne und durch Veränderung der Beleuchtungsqualität ein Auffinden grün fluoreszierender Signale in Mikrokernen, wenn Kinetochorproteine vorhanden waren. Es wurden pro Testsubstanz mindestens 200 Mikrokernkerne analysiert. Zur tabellarischen Darstellung kommen die ausgezählten Einzelwerte zu jeder Substanz. Der jeweilige Anteil Signal-positiver Mikrokernkerne in Prozent wurde zum direkten Vergleich der Substanzen untereinander graphisch dargestellt.

V. Ergebnisse

Es folgt die Darstellung der in den einzelnen Versuchen erhobenen Daten und Messwerte in Form von graphischen und tabellarischen Darstellungen. Jeweils im Anschluß daran werden die Testergebnisse zusammenfassend erläutert. Jede der Substanzen oder Metabolite wurde gleichermaßen nach dem gemäß Punkt IV. „Material und Methoden“ beschriebenen Schema ausgewertet, um eine homogene Darstellung und der Daten und eine schnelle Orientierung zu ermöglichen.

Für jedes der durchgeführten Testverfahren wird zunächst immer ein graphischer Gesamtüberblick über alle zur Testsubstanz erzielten Versuchsergebnisse gegeben (bezeichnet als **Abb.5.X.**). Zur graphischen Darstellung kommen nur Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO), welche als arithmetische Mittelwerte aus den durchgeführten Einzelversuchen zu den jeweiligen Testverfahren gemäß Punkt IV. errechnet werden.

Direkt unter den Graphiken sind die Einzelmessergebnisse (Absolutwerte) aus jedem der zur Testsubstanz und Testverfahren durchgeführten Einzelversuche in tabellarischer Übersicht aufgezeigt (bezeichnet als **Tab.5.X.**).

Als Positivkontrollen dienen in allen Versuchen Diethylstilböstrol (**DES**) und Genistein (**GEN**).

Jede Substanz oder Metabolit wird sowohl auf sein toxisches als auch auf sein gentoxisches Potential hin untersucht. Als Testverfahren für das toxische Potential werden das Proliferationsexperiment, die Vitalitätsfärbung und die Bestimmung des Anteils mehrkerniger Zellen durchgeführt. Als Testverfahren für das gentoxische Potential wird die Untersuchung auf mikrokernhaltige Zellen und die Bestimmung von mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen angewandt. Die Ergebnisse aus der Immunfluoreszenzdetektion von Kinetochoren (Crest-Färbung) werden für alle untersuchten Substanzen/Metaboliten im direkten Vergleich in Punkt 5.11. dargestellt.

Erläuterungen und Kommentare zu den graphischen und tabellarischen Darstellungen zu jeder Testsubstanz bzw. zu jedem Metabolit erfolgen immer am Ende des jeweiligen Abschnittes, also immer in Punkt 5.X.3.. Dort findet sich auch die vollständige Erklärung der verwendeten Abkürzungen. Bei weiterführenden methodischen Fragen wird auf den Punkt IV. „Material und Methoden“ verwiesen.

5.1. Equol

5.1.1. Toxisches Potential von Equol

5.1.1.1. Proliferationsexperiment

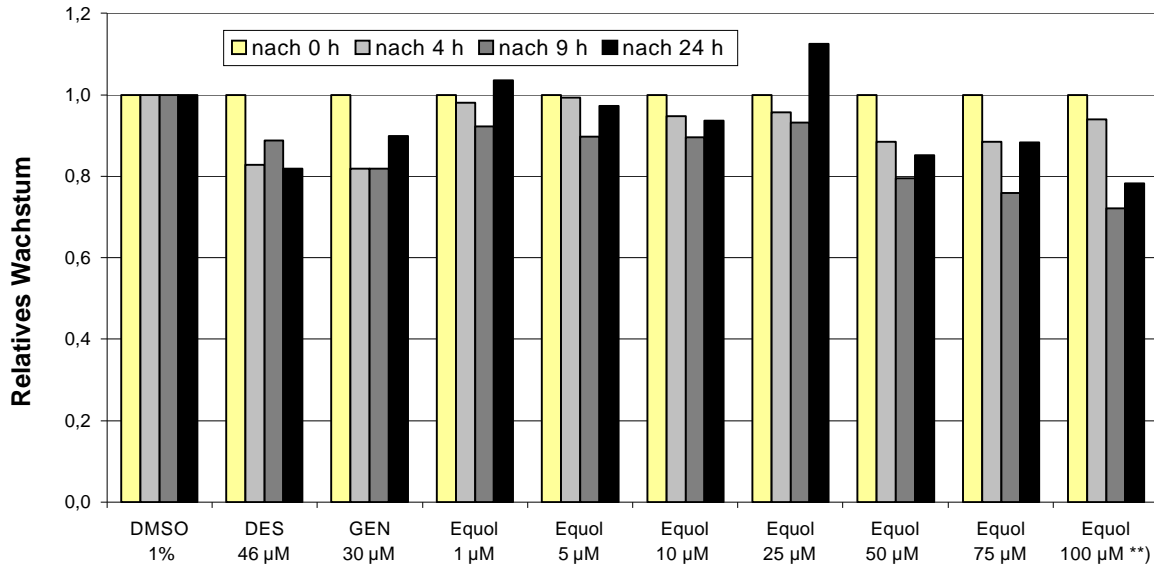


Abb. 5.1: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Equol 1 µM	Equol 25 µM	Equol 50 µM	Equol 75 µM	Equol 100 µM (**)
		ohne Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,1	1,8	2,0	2,1	2,1	1,9	1,9	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,3	2,1	1,8	2,2	2,2	1,9	1,8	1,7
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	5,2	4,4	4,7	5,6	5,8	5,0	5,5	4,5
		mit Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,1	1,8	2,0	2,1	2,1	1,9	1,9	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,8	1,6	1,7	1,8	1,8	1,8	1,6	1,5
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	1,6	1,4	1,5	1,6	1,8	1,7	1,6	1,5

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml) **) Löslichkeitsgrenze der Substanz

Tab. 5.1: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Equol 1 µM	Equol 5 µM	Equol 10 µM	Equol 50 µM	Equol 75 µM	Equol 100 µM (**)
		ohne Cytochalasin B *)								
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,1	1,7	1,4	2,1	2,1	2,0	1,8	1,8	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,7	2,4	2,2	2,4	2,4	2,4	2,1	1,9	1,9
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	6,6	5,2	5,9	6,5	6,5	6,2	4,8	4,7	4,6
		mit Cytochalasin B *)								
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,1	1,7	1,4	2,1	2,1	2,0	1,8	1,8	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,2	1,5	1,8	1,8	1,9	1,8	1,7	1,7	1,7
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,1	1,7	1,8	2,0	1,9	1,8	1,7	1,7	1,7

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml) **) Löslichkeitsgrenze der Substanz

Tab. 5.2: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.1.1.2. Vitalitätsfärbung

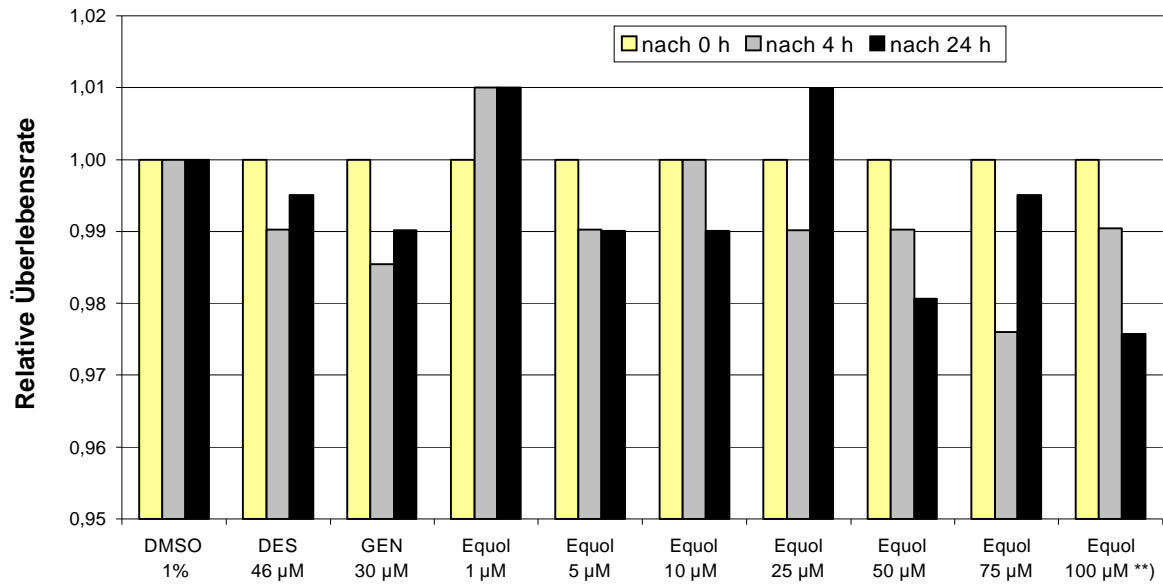


Abb. 5.2: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Feststellung		lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Equol 1 µM	Equol 25 µM	Equol 50 µM	Equol 75 µM	Equol 100 µM (**)
ohne Cytochalin B										
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		1	1	1	1	1	1	1	1
nach 4 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		1	2	3	0	2	3	3	1
nach 24 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		2	2	3	0	1	4	2	4
mit Cytochalin B										
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		1	1	1	1	1	1	1	1
nach 4 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		1	2	3	0	2	3	3	1
nach 24 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		1	3	3	0	2	3	2	3

Tab. 5.3: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Feststellung		lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Equol 1 µM	Equol 5 µM	Equol 10 µM	Equol 50 µM	Equol 75 µM	Equol 100 µM (**)
ohne Cytochalin B											
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		1	1	1	1	1	1	1	1	1
nach 4 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		2	3	3	1	3	2	2	5	4
nach 24 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		0	1	1	0	1	1	2	1	3
mit Cytochalin B											
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		1	1	1	1	1	1	1	1	1
nach 4 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		2	3	3	1	3	2	2	5	4
nach 24 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		2	4	5	3	2	2	4	4	7

Tab. 5.4: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.1.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

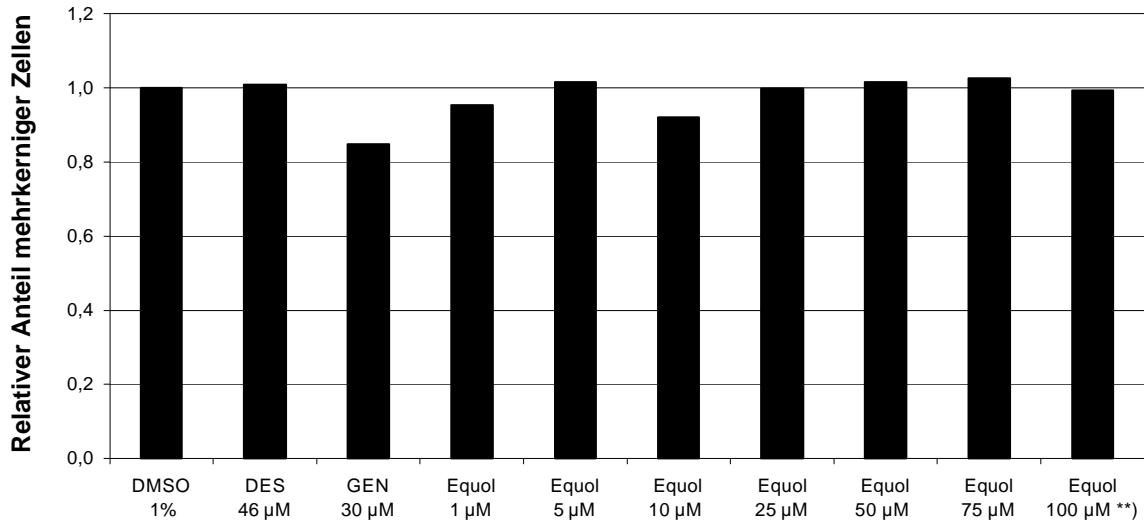


Abb.5.3: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalin B					
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time					
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr
		0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	547	1.389	18	0	0	146
DES 46 µM	130 µl	614	1.331	46	1	0	237
GEN 30 µM	130 µl	944	1.018	92	5	1	42
Equol 1 µM	130 µl	652	1.257	23	1	0	125
Equol 25 µM	130 µl	560	1.442	52	2	0	78
Equol 50 µM	130 µl	485	1.566	57	1	1	59
Equol 75 µM	130 µl	463	1.469	63	3	0	84
Equol 100 µM (**)	130 µl	459	1.482	76	5	1	40

**) Löslichkeitsgrenze der Substanz

Tab. 5.5: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalin B					
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time					
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr
		0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	207	1.696	35	0	0	195
DES 46 µM	130 µl	159	1.737	92	4	0	553
GEN 30 µM	130 µl	347	1.752	124	10	0	223
Equol 1 µM	130 µl	254	1.745	41	1	0	215
Equol 5 µM	130 µl	167	1.630	47	2	0	188
Equol 10 µM	130 µl	95	402	14	1	0	47
Equol 50 µM	130 µl	247	1.767	74	1	0	111
Equol 75 µM	130 µl	215	1.837	79	2	0	82
Equol 100 µM (**)	130 µl	336	1.710	75	3	0	44

**) Löslichkeitsgrenze der Substanz

Tab. 5.6: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.1.2. Gentoxisches Potential von Equol

5.1.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

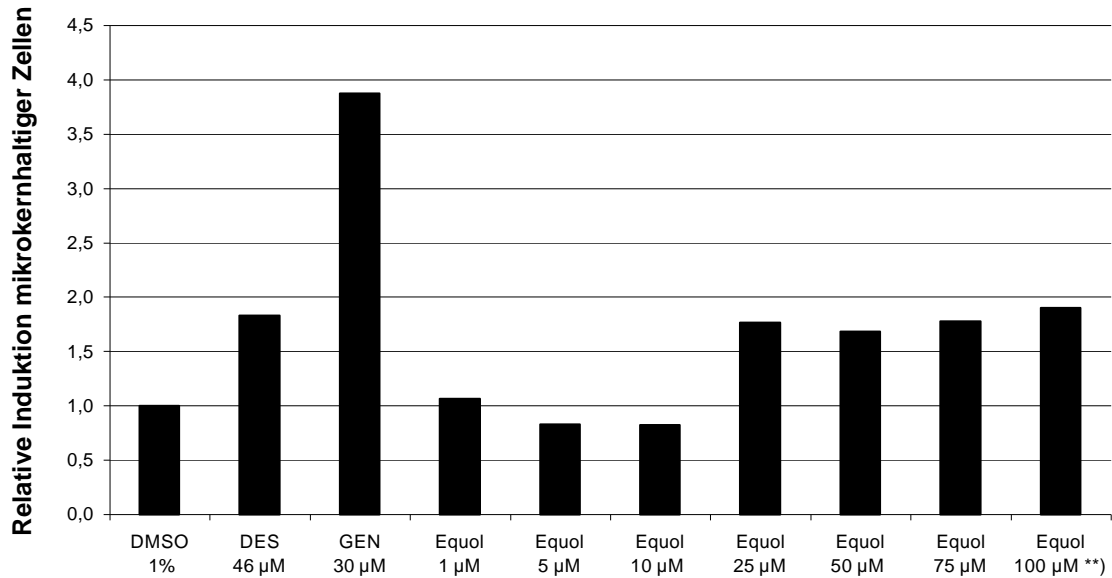


Abb. 5.4: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.033	11	0	0	0	2.013	13	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.013	34	2	0	0	2.000	27	0	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.043	28	2	0	0	2.005	72	1	0	0
Equol 1 µM	130 µl	2.005	14	0	0	0	2.003	15	0	0	0
Equol 25 µM	130 µl	2.009	17	0	0	0	2.010	23	0	0	0
Equol 50 µM	130 µl	2.045	22	0	0	0	2.003	27	1	0	0
Equol 75 µM	130 µl	2.004	17	1	0	0	2.010	27	1	0	0
Equol 100 µM (**)	130 µl	2.002	12	3	0	0	2.000	23	1	0	0

**) Löslichkeitsgrenze der Substanz

Tab. 5.7. Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.014	15	0	0	0	2.013	17	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.003	39	1	0	0	2.005	27	0	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.005	35	1	0	0	2.009	38	1	0	0
Equol 1 µM	130 µl	2.001	13	0	0	0	2.065	17	0	0	0
Equol 5 µM	130 µl	2.015	16	1	0	0	2.004	14	0	0	0
Equol 10 µM	130 µl	2.012	15	0	0	0	2.013	14	0	0	0
Equol 50 µM	130 µl	2.035	21	0	0	0	2.045	21	0	0	0
Equol 75 µM	130 µl	2.003	22	2	0	0	2.013	24	0	0	0
Equol 100 µM (**)	130 µl	2.017	23	1	0	0	2.042	32	2	0	0

**) Löslichkeitsgrenze der Substanz

Tab. 5.8: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.1.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

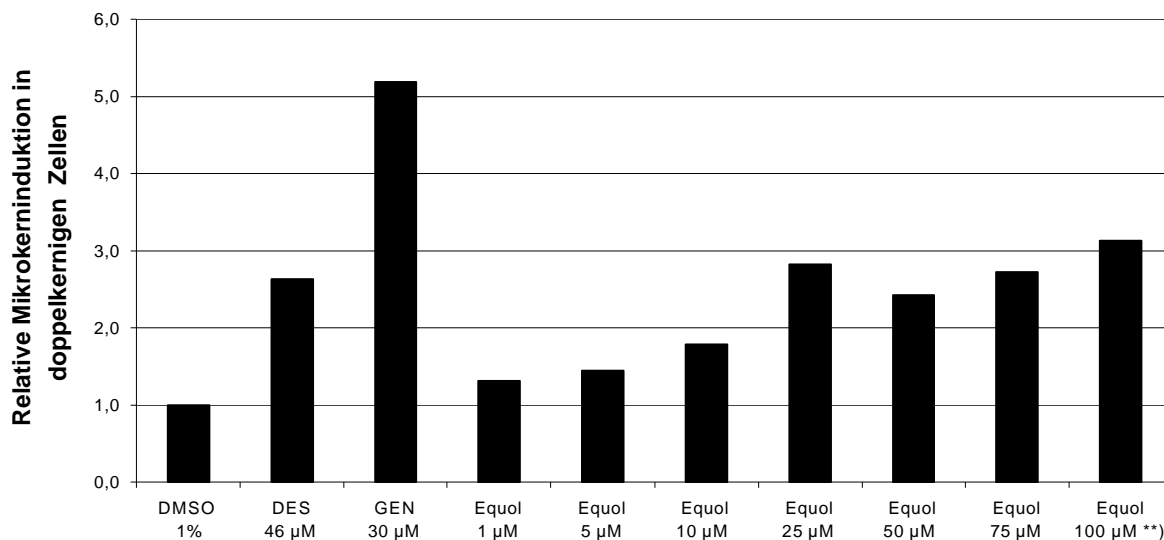


Abb. 5.5: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.1.3. Erläuterungen und Testergebnisse

Equol wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis zur Löslichkeitsgrenze von 100 µM in zwei unabhängigen Versuchen untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die arithmetischen Mittelwerte aus beiden Einzelversuchen, nachdem zuvor für jeden Versuch einzeln die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) berechnet wurden. Die Konzentrationen 5, 10 und 25 µM wurden jeweils nur in einem Versuch untersucht und stellen deshalb keine Mittelwerte dar. Als Kontrollsubstanzen dienen Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.1 – 5.8) kommen jeweils separat die absoluten Messergebnisse für jeden der durchgeführten Einzelversuche.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für Equol im Proliferations-Experiment (Abb. 5.1) nach 20-stündiger Recovery-Zeit ein relativer antiproliferativer Effekt von etwa 20% bei Erreichen der Konzentration von 100 µM in Bezug auf Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden. Bei der Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.2) und des Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.3) konnte bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze kein zytotoxischer Effekt festgestellt werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten gentoxisches Potential von Equol. So wurde bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.4) nahezu eine Verdoppelung und bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.5) eine Verdreifachung der Mikrokerninduktion in Bezug auf die Lösemittelkontrolle bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert.

5.2. O-DMA

5.2.1. Toxisches Potential von O-DMA

5.2.1.1. Proliferationsexperiment

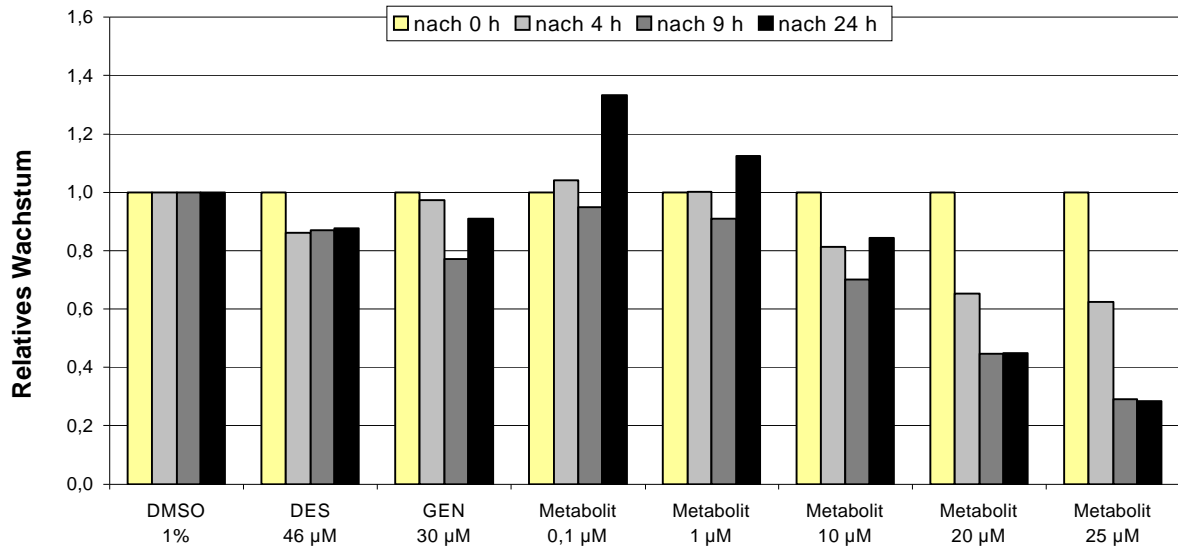


Abb. 5.6: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 0,1 µM	Metabolit 1 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 25 µM
		ohne Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,4	2,0	2,3	2,5	2,3	2,1	1,7
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,4	2,0	1,9	2,2	2,2	1,8	0,9
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	4,2	4,1	4,6	7,2	5,4	4,5	1,8
		mit Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,4	2,0	2,3	2,5	2,3	2,1	1,7
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,2	1,8	2,0	2,1	1,9	1,8	0,8
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,1	1,8	2,0	2,1	1,9	1,7	0,8

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.9: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 0,1 µM	Metabolit 1 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 20 µM	Metabolit 25 µM
		ohne Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,3	2,0	2,2	2,4	2,3	1,7	1,5	1,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,6	2,4	2,1	2,7	2,4	1,8	1,2	0,6
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	7,0	5,5	5,1	6,8	6,8	4,4	3,1	1,1
		mit Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,3	2,0	2,2	2,4	2,3	1,7	1,5	1,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,1	1,6	2,1	2,1	2,0	1,6	1,2	0,6
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	1,7	1,4	1,7	1,5	1,3	1,4	0,9	0,5

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.10: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.2.1.2. Vitalitätsfärbung

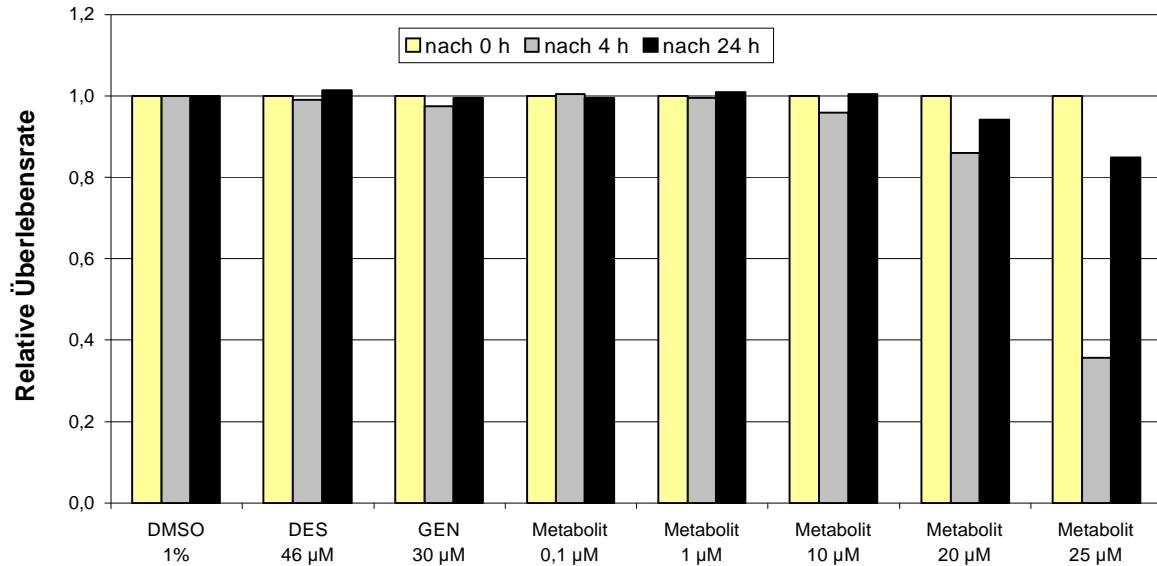


Abb. 5.7: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Feststellung	lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 0,1 µM	Metabolit 1 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 25 µM
ohne Cytochalin B								
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	16
	tot	1	2	4	1	2	7	90
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	3	1	3	5	1	3	20
mit Cytochalin B								
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	16
	tot	1	2	4	1	2	7	90
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	88	70
	tot	4	4	5	7	9	14	32

Tab. 5.11: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Feststellung	lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 0,1 µM	Metabolit 1 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 20 µM	Metabolit 25 µM
ohne Cytochalin B									
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	104	97	56
	tot	1	2	3	0	1	4	17	45
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	96	108
	tot	1	0	2	0	1	0	7	22
mit Cytochalin B									
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	104	97	56
	tot	1	2	3	0	1	4	17	45
nach 24 h	lebend	100	100	92	100	100	100	95	70
	tot	4	5	10	5	10	14	35	42

Tab. 5.12: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.2.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

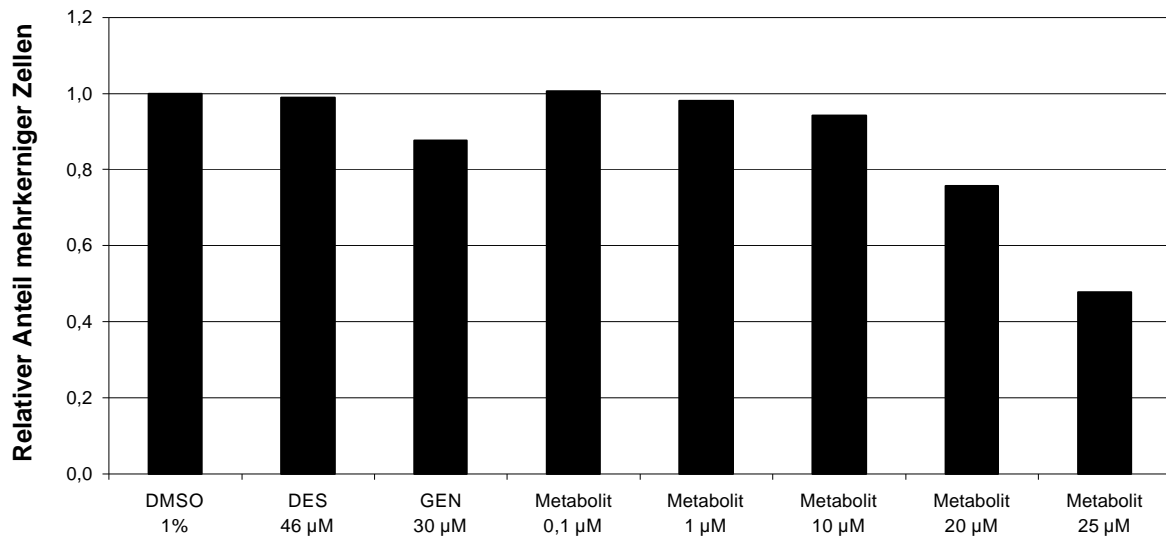


Abb.5.8: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	424	1.640	18	0	0	0	32
DES 46 µM	130 µl	545	1.586	29	1	0	0	23
GEN 30 µM	130 µl	798	1.142	202	14	3	0	15
Metabolit 0,1 µM	130 µl	405	1.615	16	1	0	0	49
Metabolit 1 µM	130 µl	413	1.600	29	0	0	0	23
Metabolit 10 µM	130 µl	534	1.443	72	8	2	0	15
Metabolit 25 µM	130 µl	178	57	2	0	0	0	0

teilweise bis stark
zerstörtes Zellbild

Tab. 5.13: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	303	1.731	27	0	0	0	139
DES 46 µM	130 µl	213	1.455	54	2	0	0	353
GEN 30 µM	130 µl	356	1.319	273	20	2	0	118
Metabolit 0,1 µM	130 µl	281	1.648	26	0	0	0	139
Metabolit 1 µM	130 µl	394	1.686	43	1	0	0	180
Metabolit 10 µM	130 µl	389	1.523	172	16	2	0	113
Metabolit 20 µM	130 µl	714	1.274	21	3	0	0	48
Metabolit 25 µM	130 µl	91	109	3	0	0	0	2

teilweise bis stark
zerstörtes Zellbild

Tab. 5.14: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.2.2. Gentoxisches Potential von O-DMA

5.1.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

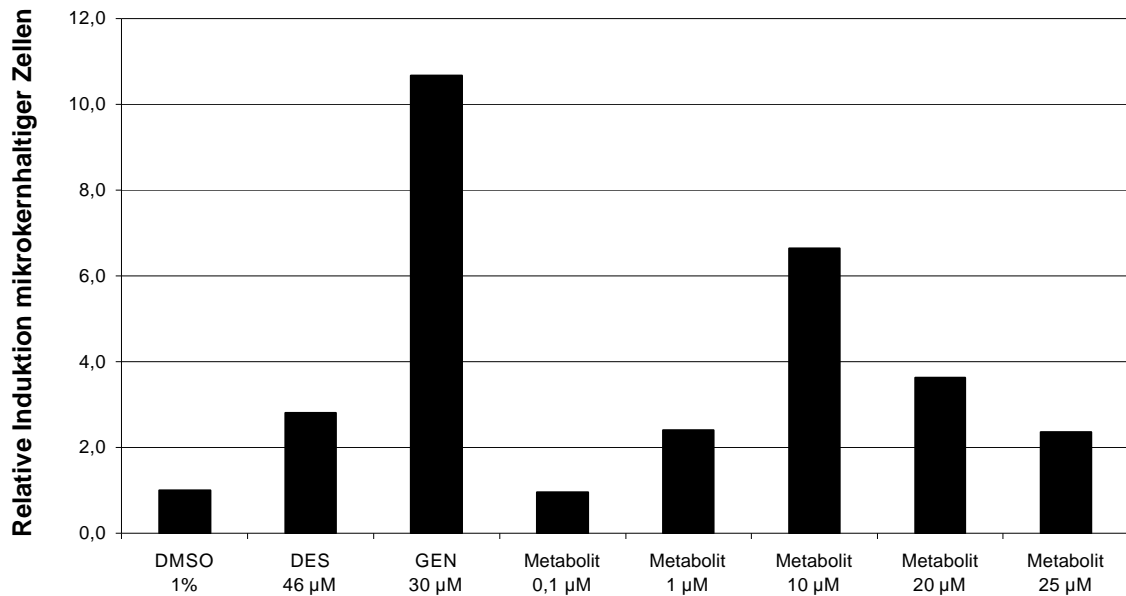


Abb. 5.9: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.000	14	1	0	0	2.000	13	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.019	32	0	0	0	2.000	35	1	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	50	2	0	0	2.000	149	4	2	1
Metabolit 0,1 µM	130 µl	2.000	12	0	0	0	2.000	14	0	0	0
Metabolit 1 µM	130 µl	2.020	13	0	0	0	2.000	30	2	0	0
Metabolit 10 µM	130 µl	2.006	26	1	0	0	2.009	66	4	1	1
Metabolit 25 µM	130 µl	246	2	0	0	0	2.000	28	0	2	1

Tab. 5.15: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.040	13	0	0	0	2.000	13	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.000	45	3	0	0	2.010	35	3	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	56	1	0	0	2.000	126	13	1	0
Metabolit 0,1 µM	130 µl	2.050	13	0	0	0	2.000	11	0	0	0
Metabolit 1 µM	130 µl	2.012	12	1	0	0	2.005	31	0	0	0
Metabolit 10 µM	130 µl	2.022	44	5	1	0	2.000	96	10	1	1
Metabolit 20 µM	130 µl	2.000	33	1	0	0	2.000	43	3	1	1
Metabolit 25 µM	130 µl	551	7	0	0	0	2.000	31	0	0	0

Tab. 5.16: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.2.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

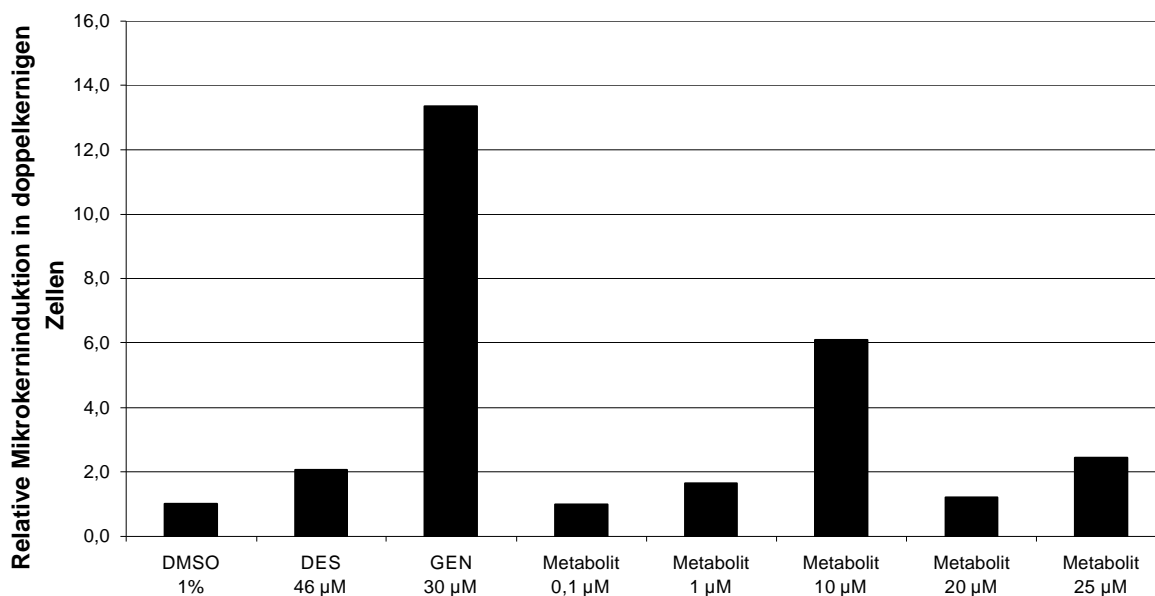


Abb. 5.10: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.2.3. Erläuterungen und Testergebnisse

O-Desmethylangolensin (O-DMA) wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis 25 µM in zwei unabhängigen Versuchen untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die arithmetischen Mittelwerte aus beiden Einzelversuchen, nachdem zuvor für jeden Versuch einzeln die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) berechnet wurden. Die Konzentration 20 µM wurde nur in einem Versuch untersucht und stellt deshalb keinen Mittelwert dar. Als Kontrollsubstanzen dienten Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.9 – 5.16) kommen jeweils separat die absoluten Messergebnisse für jeden der durchgeführten Einzelversuche.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für O-DMA im Proliferationsexperiment (Abb. 5.6) nach 20-stündiger Recovery-Zeit ab einer Konzentration von 20 µM ein deutlicher relativer antiproliferativer Effekt von über 50% in Bezug auf Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden, der sich bei einer Konzentration von 25 µM auf ~70% erhöht. Die Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.7) zeigte nach 4-stündiger Testsubstanzinkubation bei einer Konzentration von 25 µM ein deutliches Absinken der relativen Zellüberlebensrate auf unter

40%, von der sich die L5178Y aber nach Waschen und 20-stündiger Recovery-Inkubation wieder weitgehend erholten (relative Überlebensrate größer 80%). Bei der Bestimmung des relativen Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.8) konnte für die Konzentration 20 μM eine Einschränkung der Teilungsaktivität von über 20% und für die Konzentration 25 μM eine Einschränkung von über 50% in Bezug auf die Lösemittelkontrolle und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten gentoxisches Potential von O-DMA. So wurde bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.9) und bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.10) bis zum Erreichen der Zytotoxizitätsgrenze eine Mikrokerninduktion auf das 6-fache (bei einer Konzentration von 10 μM) im Vergleich zur Lösemittelkontrolle und nach 20-stündiger Recovery-Zeit detektiert. Ab einer Konzentration von 20 μM , bei der in den Toxizitätstests bereits deutliche antiproliferative Effekte detektiert wurden, konnte analog dazu ein Absinken der Mikrokernfrequenz registriert werden.

5.3. 3,4,7-Trihydroxyisoflavon

5.3.1. Toxisches Potential von 3,4,7-Trihydroxyisoflavon

5.3.1.1. Proliferationsexperiment

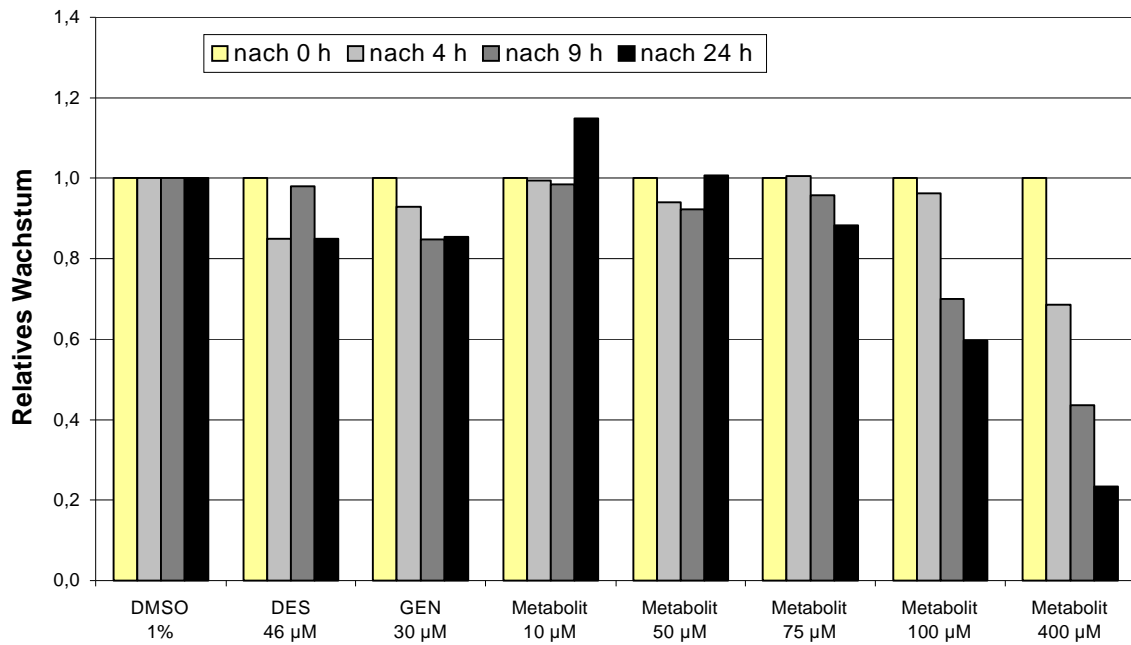


Abb. 5.11: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 50 µM	Metabolit 100 µM	Metabolit 400 µM
		ohne Cytochalin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,2	1,8	2,0	2,2	2,0	2,0	1,5
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,3	2,1	1,8	2,3	2,2	1,3	1,0
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	4,8	3,8	4,6	5,7	4,6	2,2	1,1
		mit Cytochalin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,2	1,8	2,0	2,2	2,0	2,0	1,5
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,8	1,3	1,6	1,4	1,3	1,5	0,9
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,1	1,5	1,1	1,9	1,6	1,7	1,1

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.17: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 50 µM	Metabolit 75 µM	Metabolit 100 µM
		ohne Cytochalin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,7	1,8	1,9	1,8	2,0	1,9
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,5	1,6	1,4	1,5	1,4	1,5	1,3
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	3,0	2,7	2,2	3,4	3,2	2,7	2,3
		mit Cytochalin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,7	1,8	1,9	1,8	2,0	1,9
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,3	1,3	1,3	1,4	1,5	1,5	1,4
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	1,3	1,2	1,2	1,3	1,4	1,3	1,1

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.18: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.3.1.2. Vitalitätsfärbung

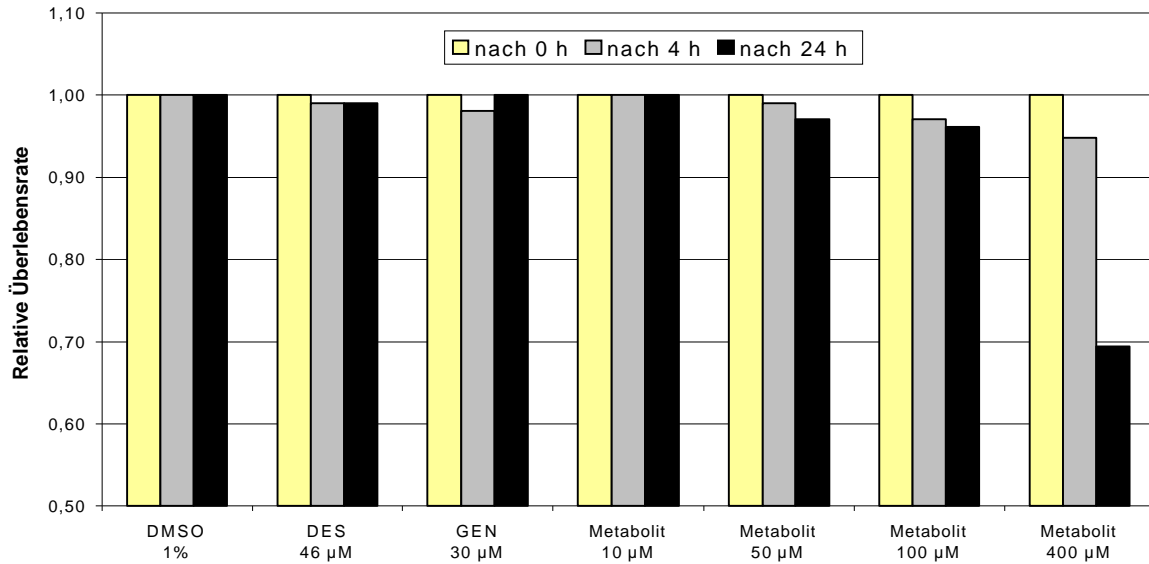


Abb. 5.12: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Hinweis: Versuche zum Vitalitätstest mit dem Metabolit 75 µM wurden nicht durchgeführt

Feststellung		lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 50 µM	Metabolit 100 µM	Metabolit 400 µM
ohne Cytochalasin B									
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100
	tot		0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend		100	100	100	100	100	100	91
	tot		0	1	2	0	1	3	5
nach 24 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100
	tot		0	1	0	0	3	4	44
mit Cytochalasin B									
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100
	tot		0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend		100	100	100	100	100	100	91
	tot		0	1	2	0	1	3	15
nach 24 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100
	tot		6	5	6	3	6	5	54

Tab. 5.19: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Feststellung		Lebend / Tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 50 µM	Metabolit 75 µM	Metabolit 100 µM
ohne Cytochalasin B									
nach 0 h	lebend		0	0	0	0	0	0	0
	tot		0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend		0	0	0	0	0	0	0
	tot		0	0	0	0	0	0	0
nach 24 h	lebend		0	0	0	0	0	0	0
	tot		0	0	0	0	0	0	0
mit Cytochalasin B									
nach 0 h	lebend		0	0	0	0	0	0	0
	tot		0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend		0	0	0	0	0	0	0
	tot		0	0	0	0	0	0	0
nach 24 h	lebend		0	0	0	0	0	0	0
	tot		0	0	0	0	0	0	0

Tab. 5.20: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.3.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

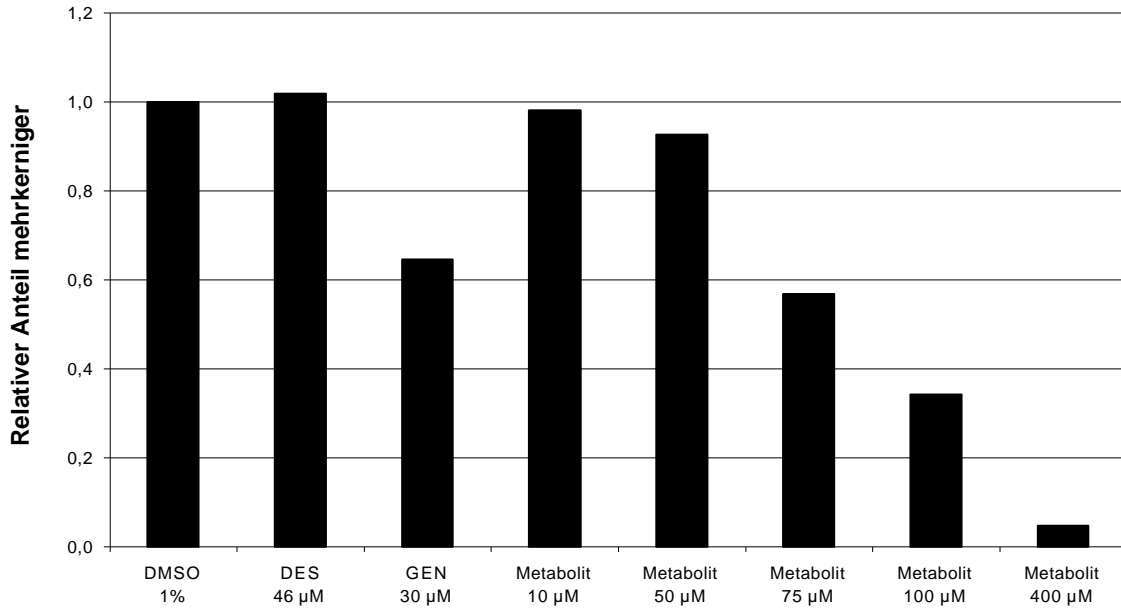


Abb.5.13: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3		4
DMSO 1%	130 µl	277	2.004	32	0	0	0	192
DES 46 µM	130 µl	398	2.040	64	0	0	0	505
GEN 30 µM	130 µl	783	1.607	480	66	19	2	94
Metabolit 10 µM	130 µl	289	2.005	33	2	0	0	140
Metabolit 50 µM	130 µl	500	2.000	37	0	0	0	118
Metabolit 100 µM	130 µl	2.007	606	39	6	0	0	19
Metabolit 400 µM	130 µl	2.001	80	5	2	0	0	2

Tab. 5.21: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3		4
DMSO 1%	130 µl	525	2.015	33	1	0	0	108
DES 46 µM	130 µl	414	2.086	70	5	1	0	268
GEN 30 µM	130 µl	1.528	582	221	38	11	3	30
Metabolit 10 µM	130 µl	625	2.033	30	2	0	0	136
Metabolit 50 µM	130 µl	717	2.040	40	0	0	0	155
Metabolit 75 µM	130 µl	1.176	917	27	1	1	0	41
Metabolit 100 µM	130 µl	1.507	681	27	2	1	0	10

Tab. 5.22: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.3.2. Gentoxisches Potential von 3,4,7-Trihydroxyisoflavon

5.3.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

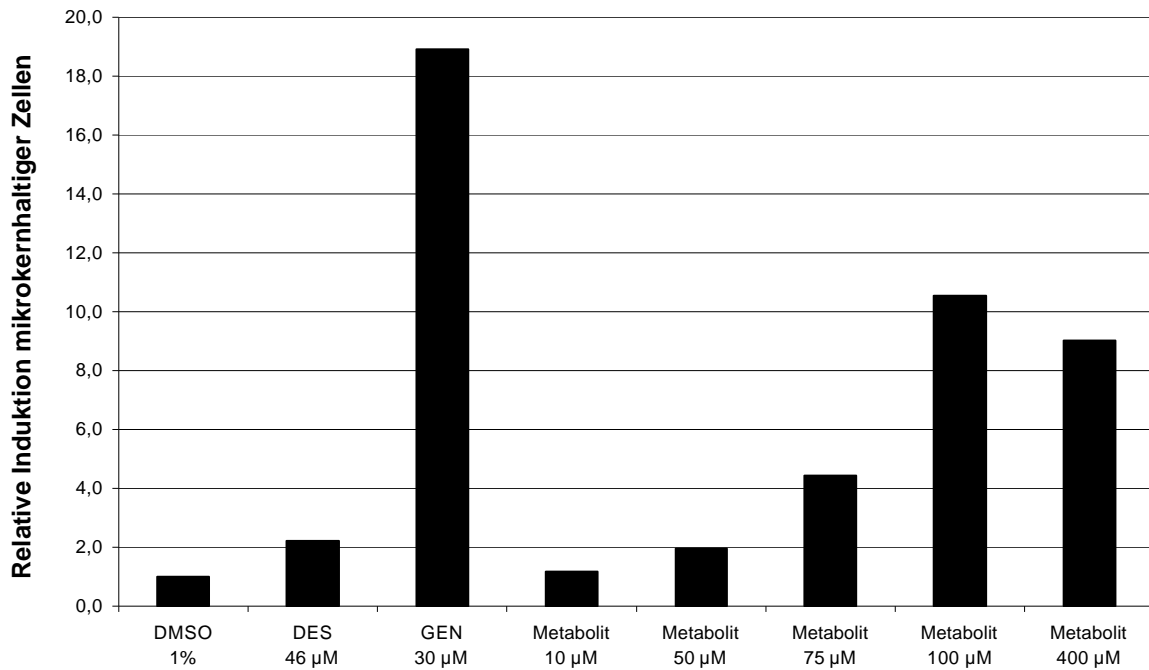


Abb. 5.14: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.030	15	0	0	0	2.002	14	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.017	36	0	0	0	2.019	35	1	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.024	77	3	0	0	2.031	218	8	7	0
Metabolit 10 µM	130 µl	2.005	18	0	0	0	2.003	17	1	0	0
Metabolit 50 µM	130 µl	2.079	21	0	1	0	2.005	23	4	0	0
Metabolit 100 µM	130 µl	2.014	23	2	0	0	2.003	139	25	9	28
Metabolit 400 µM	130 µl	2.090	46	0	0	0	2.008	105	12	9	8

Tab. 5.23: Tabellarische Darstellung der Messwerte aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.050	15	0	0	0	2.005	17	1	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.007	34	2	0	0	2.046	33	2	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.060	48	4	0	0	1.903	399	58	13	19
Metabolit 10 µM	130 µl	2.073	14	0	0	0	2.008	18	1	0	0
Metabolit 50 µM	130 µl	2.053	12	1	0	0	2.013	30	4	2	0
Metabolit 75 µM	130 µl	2.048	22	0	0	0	2.047	69	13	1	1
Metabolit 100 µM	130 µl	2.001	33	3	0	0	1.950	118	16	9	6

Tab. 5.24: Tabellarische Darstellung der Messwerte aus Versuch 2

5.3.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

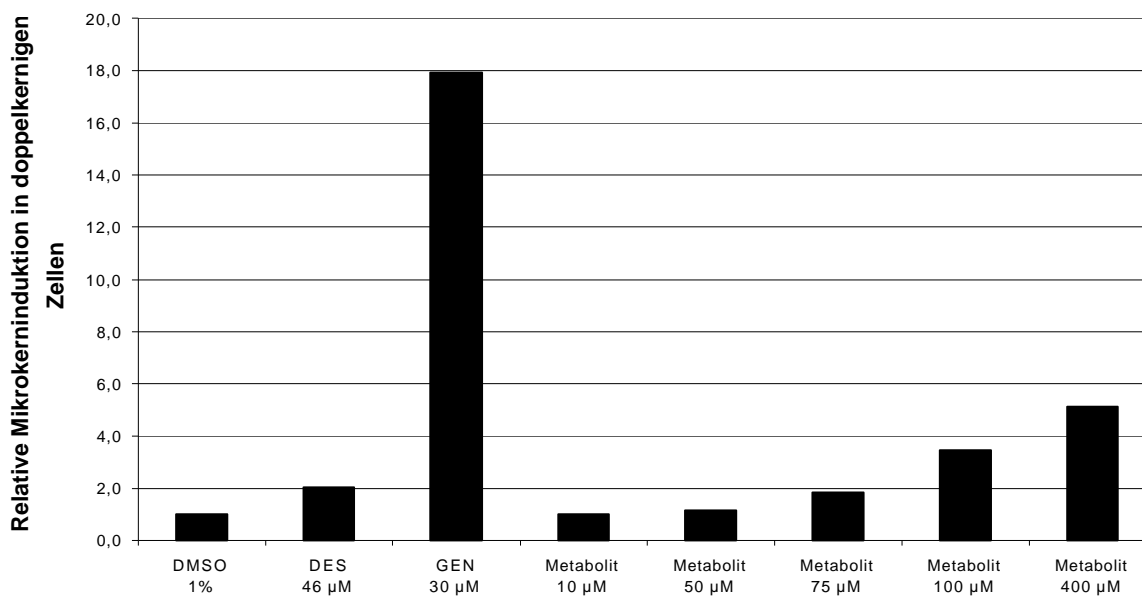


Abb. 5.15: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.3.3. Erläuterungen und Testergebnisse

3,4,7-Trihydroxyisoflavon wurde in den Konzentrationen von 10 µM bis 400 µM in zwei unabhängigen Versuchen untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die arithmetischen Mittelwerte aus beiden Einzelversuchen, nachdem zuvor für jeden Versuch einzeln die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) berechnet wurden. Die Konzentrationen 75 µM und 400 µM wurden nur in einem Versuch untersucht und stellen deshalb keinen Mittelwert dar. Die zur Bestimmung der relativen Zellüberlebensrate dienende Vitalitätsfärbung wurde ebenfalls nur in einem Versuch durchgeführt, so dass für die Konzentration von 75 µM kein Messwert vorliegt. Als Kontrollsubstanzen dienen Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.17 – 5.24) kommen jeweils separat die absoluten Messergebnisse für jeden der durchgeführten Einzelversuche.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für 3,4,7-Trihydroxyisoflavon im Proliferationsexperiment (Abb. 5.11) nach 20-stündiger Recovery-Zeit ab einer Konzentration von 75 µM ein konzentrationsabhängiger relativer antiproliferativer Effekt von ~10%, über ~40% bei einer Konzentration von 100 µM bis zu mehr als 70% bei einer Konzentration von 400 µM in

Bezug auf Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden. Die Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.12) erbrachte erst ab einer Konzentration von 400 μM einen relativen Abfall der Überlebensrate auf Werte um 70% nach 20-stündiger Recovery-Zeit. Bei der Bestimmung des relativen Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.13) konnte eine konzentrationsabhängige Einschränkung der relativen Teilungsaktivität ab einer Konzentration von 75 μM auf Werte um weniger als 60% über weniger als 40% bei einer Konzentration von 100 μM bis auf Werte von weniger als 10% bei einer Konzentration von 400 μM in Bezug auf die Lösemittelkontrolle und nach 20-stündiger Recovery-Zeit detektiert werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten gentoxisches Potential von 3,4,7-Trihydroxyisoflavin. So wurde bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.14) bis zur Konzentration von 100 μM eine Mikrokerninduktion um mehr als das 10-fache im Vergleich zur Lösemittelkontrolle nach 20-stündiger Recovery-Zeit festgestellt. Bei der Konzentration von 400 μM war die Mikrokernfrequenz aufgrund des Überwiegens zytotoxischer Effekte rückläufig. Bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.15) wurde konzentrationsabhängig ein kontinuierlicher Anstieg der Mikrokernfrequenz über das gesamte untersuchte Konzentrationsspektrum auf Werte um das 5-fache bei einer Konzentration von 400 μM im Vergleich zur Lösemittelkontrolle und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert.

5.4. 4,6,7-Trihydroxyisoflavon

5.4.1. Toxisches Potential von 4,6,7-Trihydroxyisoflavon

5.4.1.1. Proliferationsexperiment

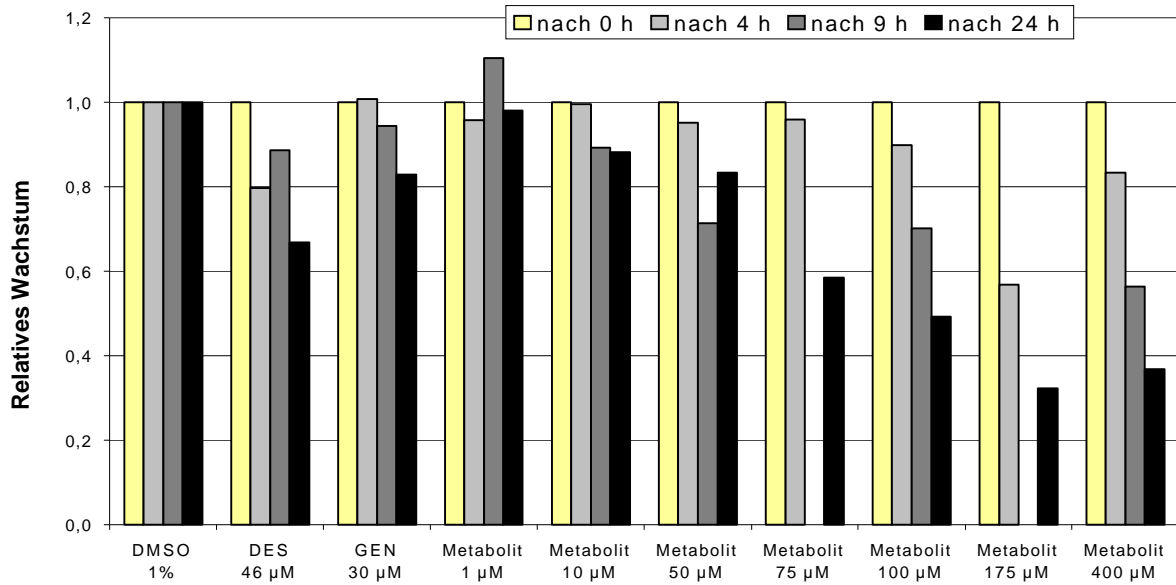


Abb. 5.16: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 50 µM	Metabolit 100 µM	Metabolit 400 µM
		ohne Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,3	2,0	2,1	2,0	2,0	1,7
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,5	1,3	1,3	1,4	1,3	1,0	0,8
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	5,0	2,6	3,9	4,4	4,4	2,4	1,6
		mit Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,1	1,8	1,9	2,0	1,9	1,9	1,7
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,2	1,0	1,7	1,4	0,4	0,4	0,4
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	1,5	1,2	1,5	1,5	1,6	1,7	1,2

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.25: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 1 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 50 µM	Metabolit 100 µM	Metabolit 400 µM
		ohne Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,8	2,0	1,9	1,9	1,8	1,7	1,6
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,5	1,4	1,5	1,6	1,3	0,8	1,1	0,9
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	5,2	4,4	4,9	5,1	4,6	4,1	3,2	2,2
		mit Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,8	2,0	1,9	1,9	1,8	1,7	1,6
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,7	1,4	1,4	1,8	1,3	0,6	1,4	1,2
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	1,7	1,6	1,7	1,8	1,7	1,2	1,1	1,0

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.26: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 75 µM	Metabolit 100 µM	Metabolit 100 µM -A-	Metabolit 175 µM
		ohne Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,1	1,8	2,2	2,0	1,9	1,8	1,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	nicht anwendbar	nicht anwendbar	nicht anwendbar	nicht anwendbar	nicht anwendbar	nicht anwendbar	nicht anwendbar
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	5,9	3,8	4,6	3,4	2,6	2,6	1,9
		mit Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,1	1,8	2,2	2,0	1,9	1,8	1,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h							
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,1	1,5	1,9	1,8	1,8	1,7	1,2

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.27: Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse aus Versuch 3

5.4.1.2. Vitalitätsfärbung

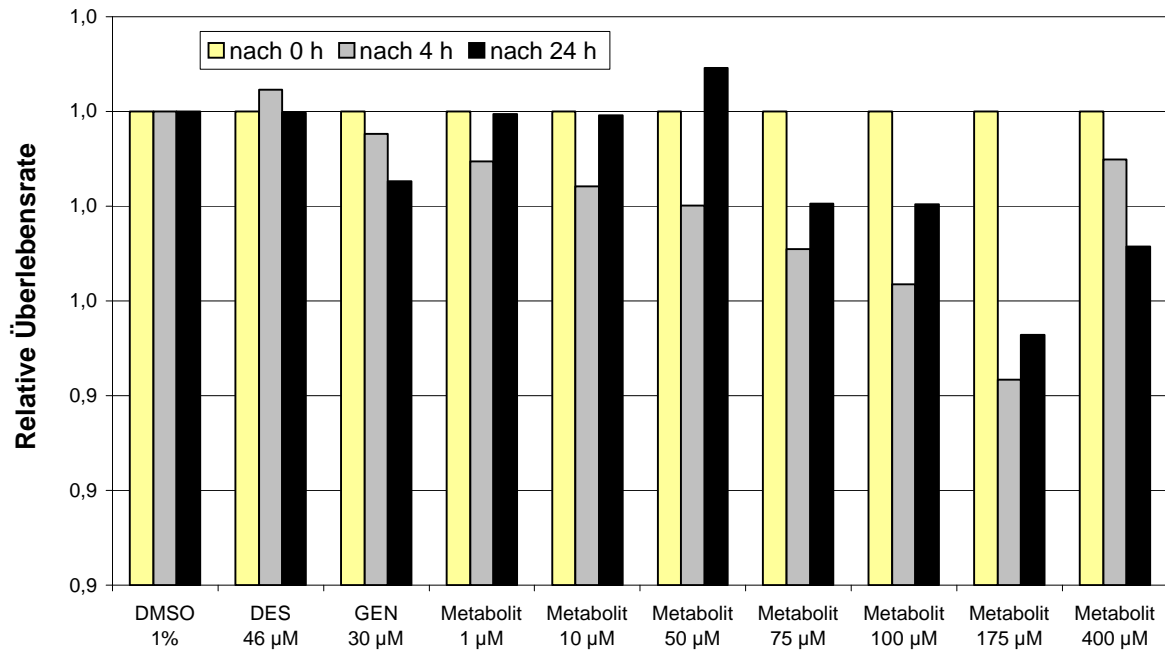


Abb. 5.17: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Beim Versuch 1 wurde die Überlebensrate nicht festgestellt.

Tab. 5.28: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Feststellung		lebend / tot		DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 1 µM	Metabolit 10 µM	Metabolit 50 µM	Metabolit 100 µM	Metabolit 400 µM
ohne Cytochalasin B											
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	103	102	105	100	108	100	108	100	110	101
	tot	4	1	3	5	6	6	7	5	5	5
nach 24 h	lebend	109	100	101	102	100	100	100	100	100	103
	tot	1	0	1	1	1	0	2	4	4	4
mit Cytochalasin B											
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	103	102	105	100	108	100	110	101	101	101
	tot	4	1	3	5	6	6	7	5	5	5
nach 24 h	lebend	100	100	100	104	102	100	101	101	101	101
	tot	1	0	3	0	1	1	2	4	4	4

Tab. 5.29: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

Feststellung		lebend / tot		DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Metabolit 75 µM	Metabolit 100 µM	Metabolit 100 µM -A-	Metabolit 175 µM
ohne Cytochalasin B										
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	2	2	3	4	5	6	6	6
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	1	2	4	3	4	3	6	6	6
mit Cytochalasin B										
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	0	2	2	3	4	5	6	6	6
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	3	5	3	3	5	6	7	7	7

Tab. 5.30: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 3

5.4.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

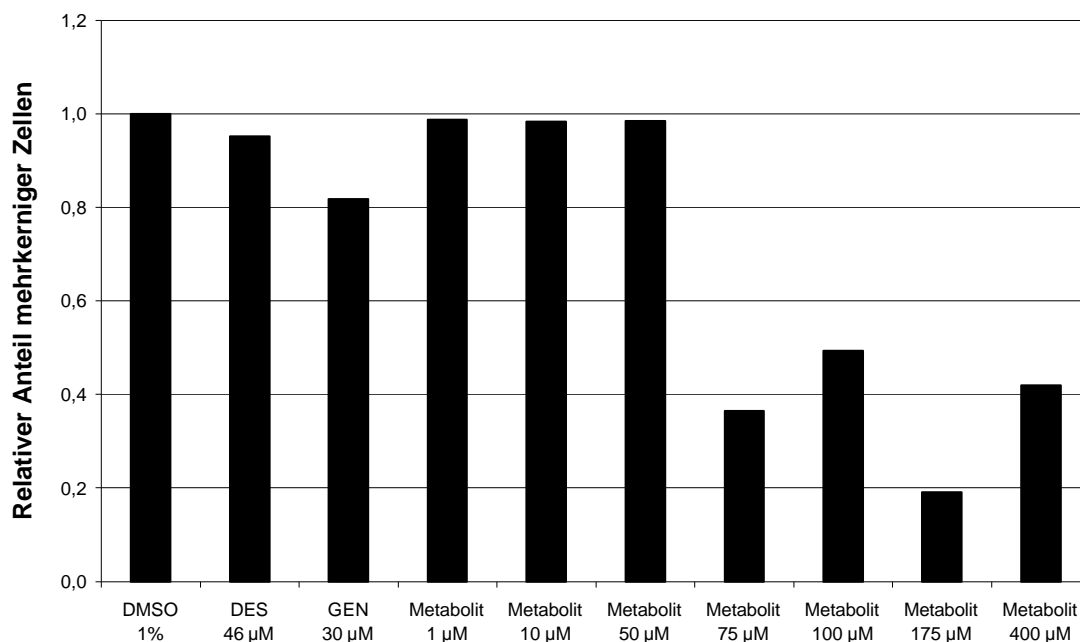


Abb. 5.18: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B					
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time					
		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	252	2.298	23	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	290	2.195	42	0	0	0
GEN 30 µM	130 µl	1.408	1.495	789	11	3	5
Metabolit 10 µM	130 µl	250	2.143	45	3	0	0
Metabolit 50 µM	130 µl	233	2.134	61	3	0	0
Metabolit 100 µM	130 µl	1.489	2.030	160	0	0	0
Metabolit 400 µM	130 µl	1.940	299	19	0	0	0

Tab. 5.31: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B					
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time					
		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	154	2.001	37	0	0	2.142
DES 46 µM	130 µl	324	2.034	60	1	1	2.155
GEN 30 µM	130 µl	419	2.040	170	0	0	2.113
Metabolit 1 µM	130 µl	216	2.275	44	0	1	2.079
Metabolit 10 µM	130 µl	284	2.092	61	0	0	2.076
Metabolit 50 µM	130 µl	316	2.040	130	0	1	2.253
Metabolit 100 µM	130 µl	487	2.097	194	1	0	2.224
Metabolit 400 µM	130 µl	1.874	1.412	121	0	0	2.078

Tab. 5.32: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B					
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time					
		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	230	800	14	0	0	40
DES 46 µM	130 µl	330	745	22	0	0	70
GEN 30 µM	130 µl	380	613	33	4	0	48
Metabolit 75 µM	130 µl	724	259	22	4	0	8
Metabolit 100 µM	130 µl	1.000	153	8	2	1	5
Metabolit 100 µM -A-	130 µl	900	148	6	2	2	6
Metabolit 175 µM	130 µl	885	140	12	1	0	4

leichtgradig
dysmorph
mittelgradig
dysmorph
mittelgradig
dysmorph
schwergradig
dysmorph

Tab. 5.33: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 3

5.4.2. Gentoxisches Potential von 4,6,7-Trihydroxyisoflavon

5.4.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

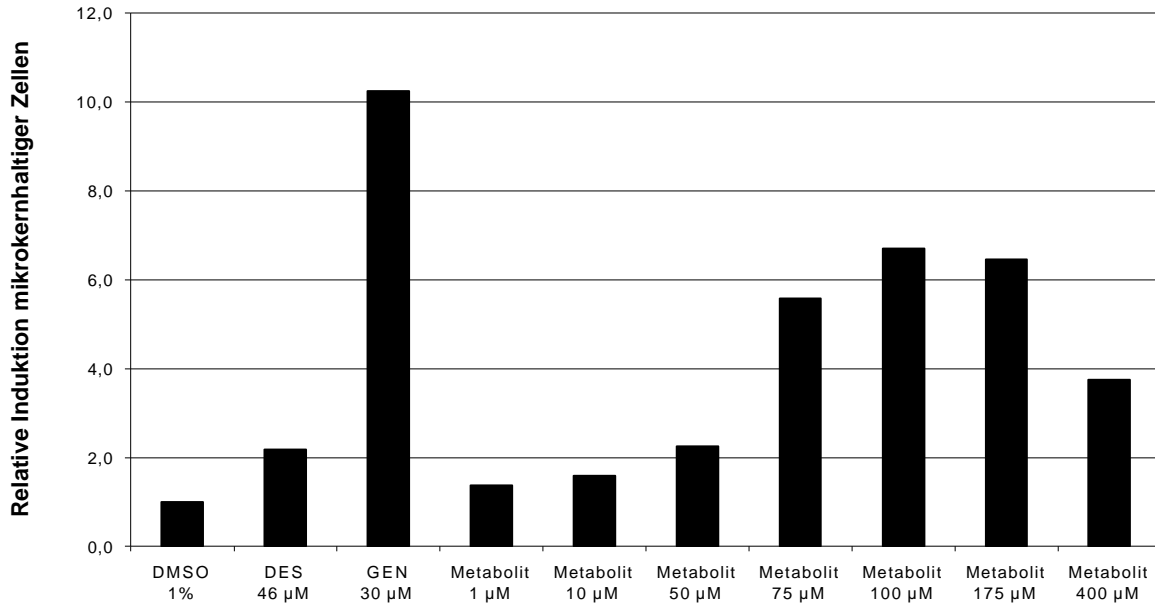


Abb. 5.19: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.071	20	1	0	0	2.129	18	2	1	0
DES 46 µM	130 µl	2.026	28	1	0	0	2.128	50	4	2	0
GEN 30 µM	130 µl	2.063	56	1	2	0	2.062	532	88	16	0
Metabolit 10 µM	130 µl	2.048	17	2	0	0	2.119	37	3	0	0
Metabolit 50 µM	130 µl	2.133	23	1	0	0	2.036	47	4	1	0
Metabolit 100 µM	130 µl	2.016	25	1	1	0	2.012	104	31	13	7
Metabolit 400 µM	130 µl	2.106	29	1	0	0	2.056	72	6	4	1

Tab. 5.34. Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.040	21	1	0	0	2.121	19	1	1	0
DES 46 µM	130 µl	2.005	36	1	0	0	2.111	39	2	3	0
GEN 30 µM	130 µl	2.056	49	1	0	0	2.023	83	5	2	0
Metabolit 1 µM	130 µl	2.024	21	2	0	1	2.051	27	1	0	0
Metabolit 10 µM	130 µl	2.136	26	3	2	0	2.050	23	2	1	0
Metabolit 50 µM	130 µl	2.045	31	3	2	0	2.210	40	3	0	0
Metabolit 100 µM	130 µl	2.017	29	4	3	1	2.143	77	2	2	0
Metabolit 400 µM	130 µl	2.045	25	1	0	0	2.006	69	1	2	0

Tab. 5.35: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokern nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokern nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokern		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	0	0	0	0	0	2.000	14	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	0	0	0	0	0	2.017	25	1	0	0
GEN 30 µM	130 µl	0	0	0	0	0	2.005	32	0	0	0
Metabolit 75 µM	130 µl	0	0	0	0	0	2.007	68	9	3	1
Metabolit 100 µM	130 µl	0	0	0	0	0	2.017	100	15	5	1
Metabolit 100 µM -A-	130 µl	0	0	0	0	0	2.000	92	9	8	3
Metabolit 175 µM	130 µl	0	0	0	0	0	2.000	74	11	6	3

Tab. 5.36: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 3

5.4.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

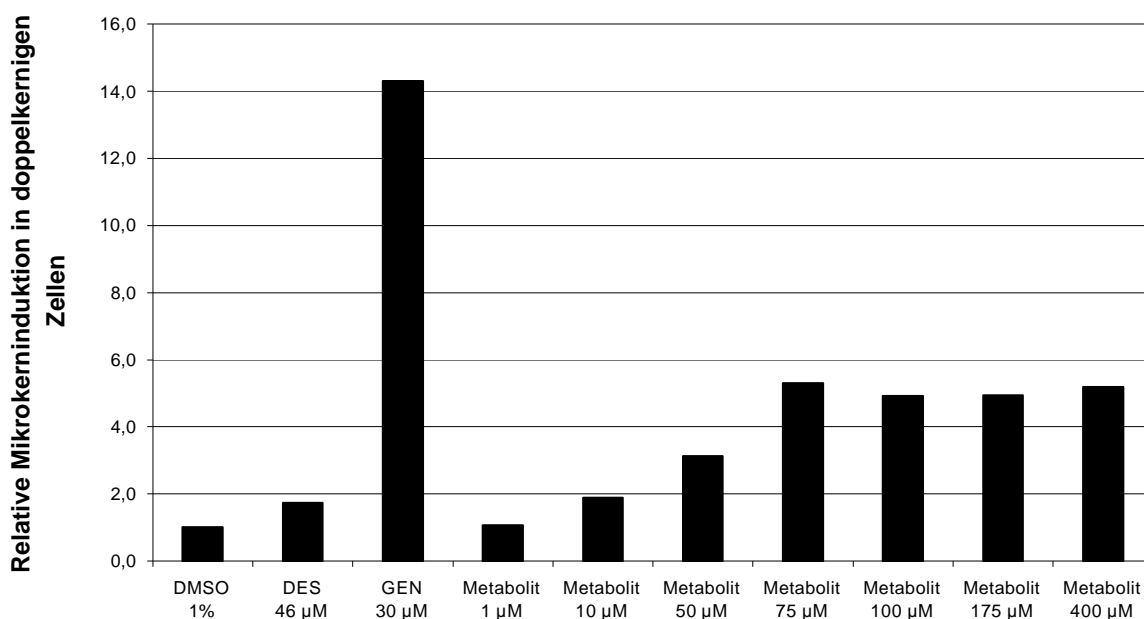


Abb. 5.20: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.4.3. Erläuterungen und Testergebnisse

4,6,7-Trihydroxyisoflavon wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis 400 µM in drei unabhängigen Versuchen untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die arithmetischen Mittelwerte aus allen Einzelversuchen, nachdem zuvor für jeden Versuch einzeln die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) berechnet wurden. Die Konzentrationen 1 µM, 75 µM und 175 µM wurden nur in einem Versuch untersucht und stellen deshalb keinen Mittelwert dar. Die Konzentrationen 10 µM, 50 µM und 400 µM wurden in zwei Versuchen untersucht und die Konzentration 100 µM wurde in vier Versuchsansätzen untersucht. Die zur Bestimmung der relativen

Zellüberlebensrate dienende Vitalitätsfärbung wurde in zwei Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationsansätzen durchgeführt, so dass alle graphisch dargestellten Werte außer der Konzentration 100 μM keinen Mittelwert darstellen. Als Kontrollsubstanzen dienten Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.25 – 5.36) kommen jeweils separat die absoluten Messergebnisse für jeden der durchgeführten Einzelversuche.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für 4,6,7-Trihydroxyisoflavon im Proliferationsexperiment (Abb. 5.16) nach 20-stündiger Recovery-Zeit ab einer Konzentration von 50 μM ein konzentrationsabhängiger relativer antiproliferativer Effekt von mehr als 10%, ~40% bei einer Konzentration von 75 μM , ~50% bei einer Konzentration von 100 μM und mehr als 60% bei den Konzentrationen 175 μM und 400 μM in Bezug auf Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden. Die Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.17) erbrachte über das gesamte untersuchte Konzentrationsspektrum keinen nennenswerten Abfall der Zellüberlebensrate nach 20-stündiger Recovery-Zeit. Bei der Bestimmung des relativen Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.18) konnte eine Einschränkung der relativen Teilungsaktivität ab einer Konzentration von 75 μM auf Werte um weniger als 50% in Bezug auf die Lösemittelkontrolle und nach 20-stündiger Recovery-Zeit detektiert werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten gentoxisches Potential von 3,4,7-Trihydroxyisoflavon. So wurde bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.19) ab einer Konzentration von 50 μM eine Verdopplung der Mikrokerninduktion bis zu einer Vervielfachung auf Werte über das 6-fache bei einer Konzentration von 100 μM im Vergleich zur Lösemittelkontrolle nach 20-stündiger Recovery-Zeit festgestellt. Bei Konzentrationen über 100 μM war die Mikrokernfrequenz aufgrund des überwiegens zytotoxischer Effekte rückläufig. Bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.20) wurde konzentrationsabhängig ein kontinuierlicher Anstieg der Mikrokernfrequenz beginnend mit einer Verdopplung bei einer Konzentration von 10 μM bis auf Werte um das 5-fache ab einer Konzentration von 75 μM im Vergleich zur Lösemittelkontrolle und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert.

5.5. Fisetin

5.5.1. Toxisches Potential von Fisetin

5.5.1.1. Proliferationsexperiment

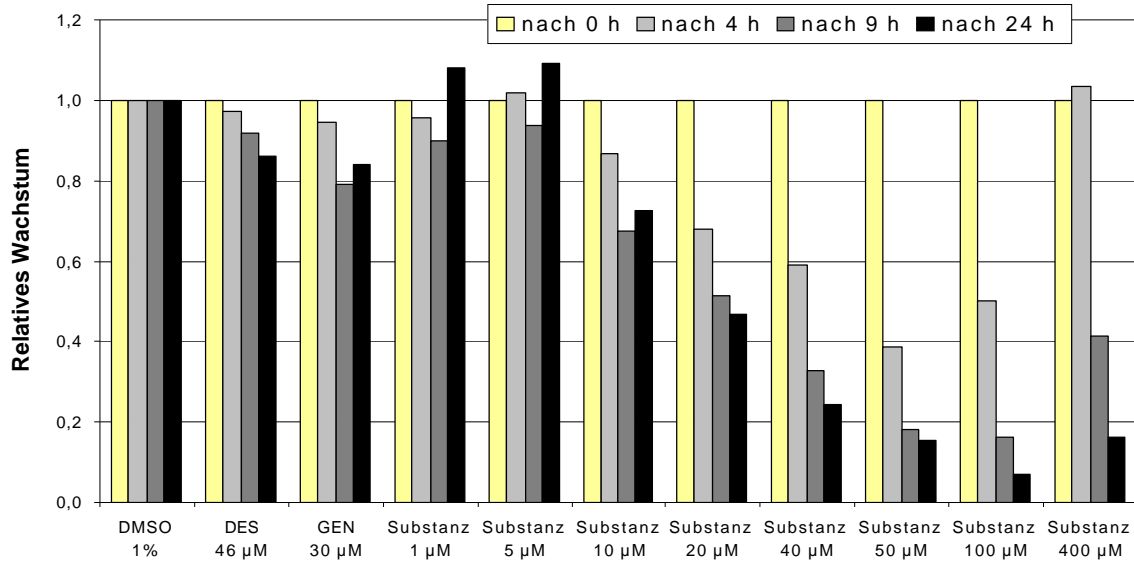


Abb. 5.21: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 10 µM	Substanz 50 µM	Substanz 100 µM	Substanz 400 µM
		ohne Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,9	1,9	1,6	0,8	1,0	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,9	2,8	2,3	1,7	0,5	0,5	1,2
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	6,4	4,9	5,4	3,7	1,0	0,4	1,0
		mit Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,9	1,9	1,6	0,8	1,0	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,1	1,8	2,0	1,3	0,4	0,5	1,2
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,0	1,3	1,3	1,1	0,4	0,3	1,1

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.37: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 11,3 µM	Substanz 1 µM	Substanz 10 µM	Substanz 20 µM	Substanz 40 µM
		ohne Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,2	1,9	2,1	1,9	1,4	0,8	0,6
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,8	2,5	2,5	2,6	1,5	0,9	0,4
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	4,8	5,0	4,9	6,0	3,3	1,6	0,6
		mit Cytochalasin B *)						
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,2	1,9	2,1	1,9	1,4	0,8	0,6
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,0	1,5	1,9	1,7	1,3	0,6	0,3
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	1,9	1,6	1,9	1,9	1,2	0,7	0,3

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.38: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 37 µM	Substanz 1 µM	Substanz 5 µM	Substanz 10 µM	Substanz 20 µM	Substanz 40 µM
Zelldichtemessung		1,9							
1. Wachstumsmessung		1,8							
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time		2,6							
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time		7,7							
ohne Cytochalasin B *)									
Zelldichtemessung		1,9							
1. Wachstumsmessung		1,8							
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time		2,3							
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time		7,3							
mit Cytochalasin B *)									
Zelldichtemessung		1,9							
1. Wachstumsmessung		1,8							
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time		2,3							
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time		2,6							

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.39: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 3

5.5.1.2. Vitalitätsfärbung

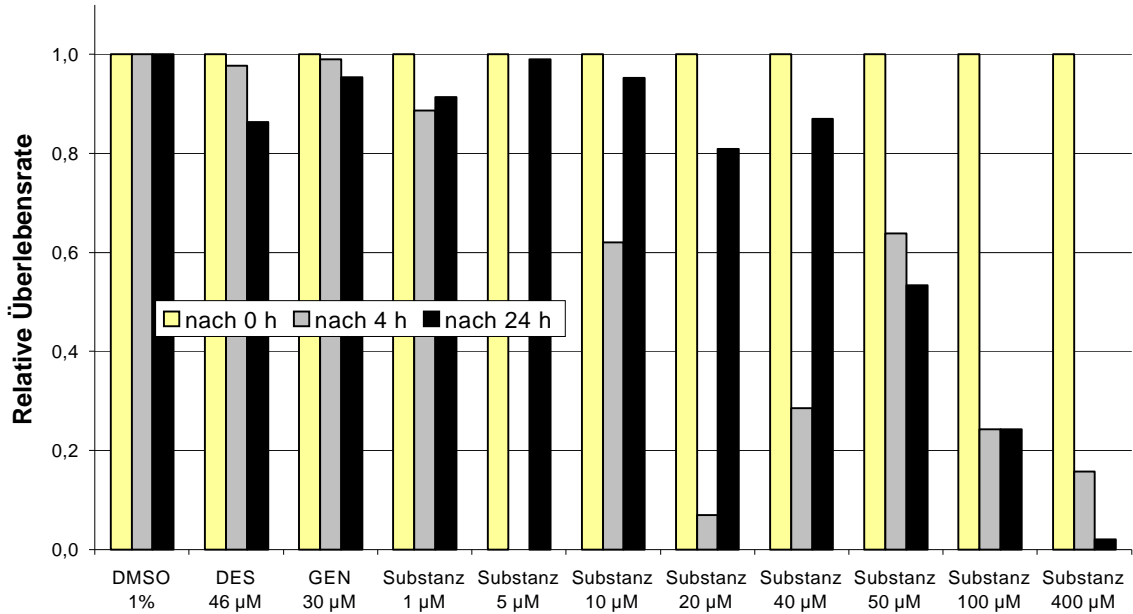


Abb. 5.22: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Feststellung	lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 10 µM	Substanz 50 µM	Substanz 100 µM	Substanz 400 µM
ohne Cytochalasin B								
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
nach 0 h	tot	1	1	1	1	1	1	1
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	65	25	18
nach 4 h	tot	3	3	4	4	40	81	100
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	84	40	2
nach 24 h	tot	3	5	8	20	78	130	100
mit Cytochalasin B								
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
nach 0 h	tot	1	1	1	1	1	1	1
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	65	25	18
nach 4 h	tot	3	3	4	4	40	81	100
nach 24 h	lebend	100	90	75	70	59	3	1
nach 24 h	tot	18	40	37	35	95	100	100

Tab. 5.40: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Feststellung		lebend / tot		DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 11,3 µM	Substanz 1 µM	Substanz 10 µM	Substanz 20 µM	Substanz 40 µM
ohne Cytochalasin B										
nach 0 h	lebend	100	2	100	100	100	100	100	100	100
	tot	2	2	2	2	2	2	2	2	2
nach 4 h	lebend	100	2	100	100	100	100	100	7	28
	tot	2	7	6	15	17	95	72		
nach 24 h	lebend	100	2	53	20	80	106	55	76	
	tot	18	48	40	29	18	47	24		
mit Cytochalasin B										
nach 0 h	lebend	100	2	100	100	100	100	100	100	100
	tot	2	2	2	2	2	2	2	2	2
nach 4 h	lebend	100	2	100	100	100	100	7	28	
	tot	2	7	6	15	17	95	72		
nach 24 h	lebend	30	2	71	64	67	77	67	76	
	tot	44	40	39	33	34	39	52		

Tab. 5.41: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

Feststellung		lebend / tot		DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 37 µM	Substanz 1 µM	Substanz 5 µM	Substanz 10 µM	Substanz 20 µM	Substanz 40 µM
ohne Cytochalasin B											
nach 0 h	lebend	100	1	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
nach 4 h	lebend	100	1	nicht	nicht	nicht	100	nicht	100	100	
	tot	4	10	auswertbar	auswertbar	auswertbar	7	auswertbar	25		
nach 24 h	lebend	100	1	100	100	100	100	100	100	100	
	tot	1	2	7	5	2	2	3	20		
mit Cytochalasin B											
nach 0 h	lebend	100	1	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
nach 4 h	lebend	100	1	nicht	nicht	nicht	100	nicht	100	100	
	tot	4	10	auswertbar	auswertbar	auswertbar	7	auswertbar	25		
nach 24 h	lebend	100	1	100	100	100	100	100	100	100	
	tot	1	2	7	5	2	2	3	20		

Tab. 5.42: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 3

5.5.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

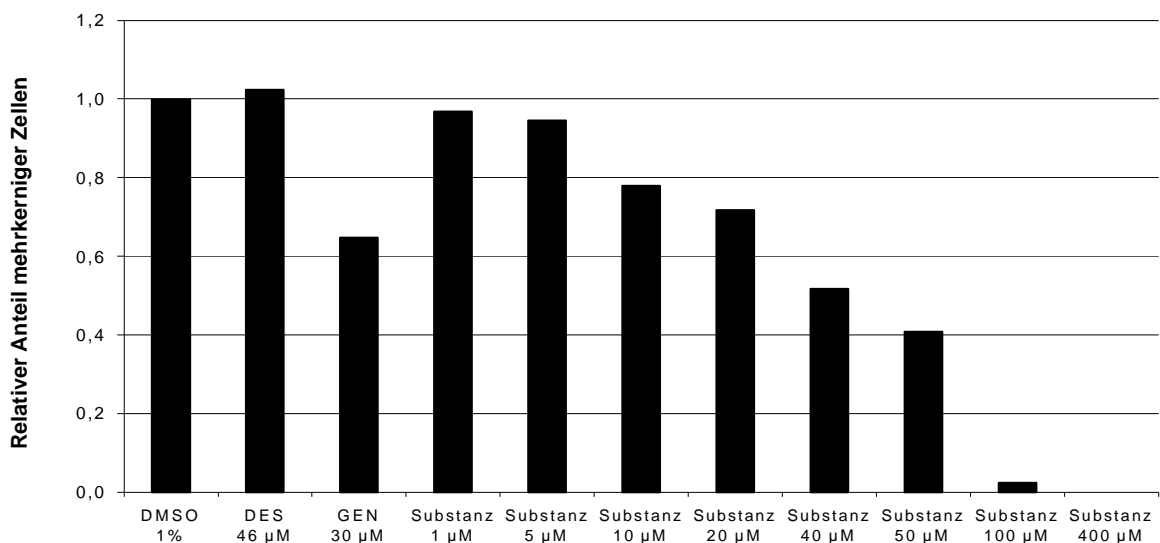


Abb.5.23: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B					
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time					
		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr
Anzahl Mikrokerne →		0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	473	2.000	27	0	0	60
DES 46 µM	130 µl	442	2.012	36	2	1	155
GEN 30 µM	130 µl	1.643	1.071	619	101	9	37
Substanz 10 µM	130 µl	779	1.317	23	2	1	42
Substanz 50 µM	130 µl	299	143	3	0	0	3
Substanz 100 µM	130 µl	51	1	0	0	0	0
Substanz 400 µM	130 µl	0	0	0	0	0	0

teilweise zerstörtes Zellbild
stark zerstörtes Zellbild
total zerstörtes Zellbild

Tab. 5.43: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B					
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time					
		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr
Anzahl Mikrokerne →		0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	429	1.558	21	1	0	54
DES 46 µM	130 µl	342	1.710	42	3	0	220
GEN 11,3 µM	130 µl	462	1.630	66	2	0	54
Substanz 1 µM	130 µl	469	1.679	17	2	1	50
Substanz 10 µM	130 µl	937	1.249	15	1	1	17
Substanz 20 µM	130 µl	976	1.151	19	0	0	14
Substanz 40 µM	130 µl	143	69	2	0	0	0

teilweise zerstörtes Zellbild

Tab. 5.44: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B					
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time					
		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr
Anzahl Mikrokerne →		0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	315	1.511	19	0	0	219
DES 46 µM	130 µl	376	1.308	40	3	0	407
GEN 37 µM	130 µl	477	1.363	76	1	0	242
Substanz 1 µM	130 µl	400	1.325	21	0	0	225
Substanz 5 µM	130 µl	433	1.523	31	0	0	189
Substanz 10 µM	130 µl	620	1.291	33	1	0	101
Substanz 20 µM	130 µl	788	1.241	27	1	0	63
Substanz 40 µM	130 µl	949	961	21	3	0	46

teilweise bis stark zerstörtes Zellbild

Tab. 5.45: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 3

5.5.2. Gentoxisches Potential von Fisetin

5.5.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

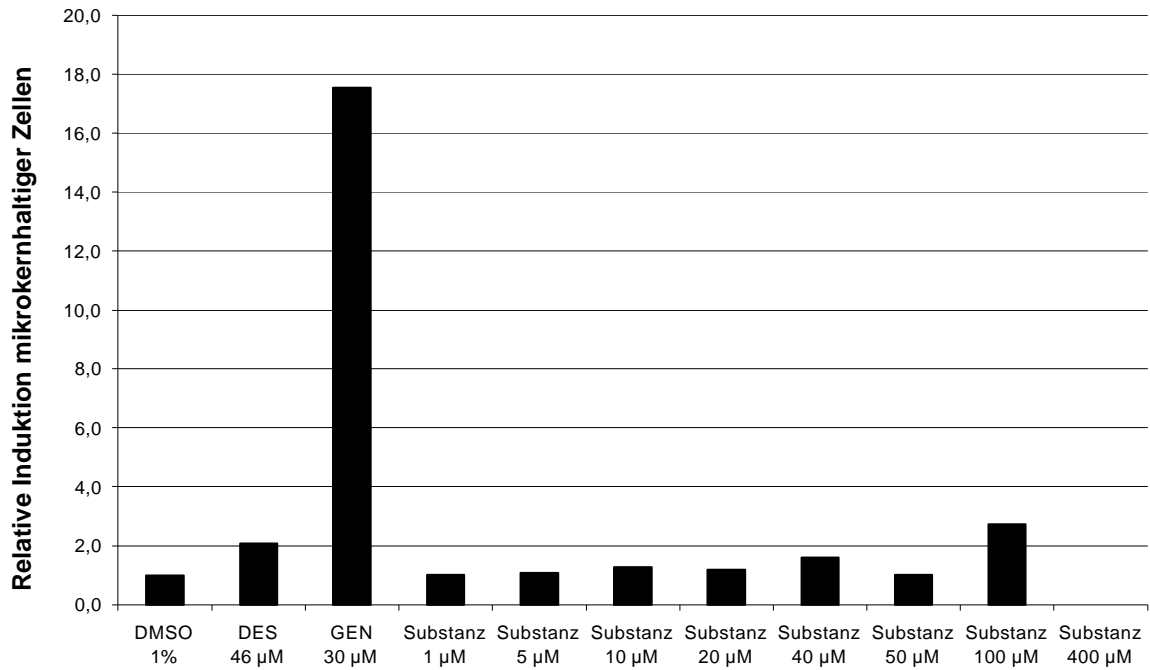


Abb. 5.24: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
Anzahl Mikrokerne		n.a.					n.a.				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.009	17	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.015	37	5	1	0	2.003	35	5	1	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	78	5	0	0	1.824	278	32	4	1
Substanz 10 µM	130 µl	2.013	16	0	0	0	2.010	23	1	0	0
Substanz 50 µM	130 µl	723	12	0	0	0	1.630	13	1	0	0
Substanz 100 µM	130 µl	310	7	0	0	0	298	6	1	0	0
Substanz 400 µM	130 µl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 5.46: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
Anzahl Mikrokerne		n.a.					n.a.				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.010	12	0	0	0	2.041	17	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.009	33	0	0	0	2.003	35	0	0	0
GEN 11,3 µM	130 µl	2.023	25	0	0	0	2.011	57	1	0	0
Substanz 1 µM	130 µl	2.010	13	0	0	0	2.013	15	0	1	0
Substanz 10 µM	130 µl	2.041	13	0	0	0	2.014	19	1	0	0
Substanz 20 µM	130 µl	2.003	19	0	0	0	2.035	19	2	1	0
Substanz 40 µM	130 µl	299	4	0	0	0	2.027	31	3	1	0

Tab. 5.47: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokern nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokern nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokern		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.037	13	0	0	0	2.000	12	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.009	41	2	0	0	2.015	21	0	0	0
GEN 37 µM	130 µl	2.000	22	0	0	0	2.028	33	0	0	0
Substanz 1 µM	130 µl	2.003	11	0	0	0	2.019	13	0	0	0
Substanz 5 µM	130 µl	2.020	14	0	0	0	2.015	13	0	0	0
Substanz 10 µM	130 µl	2.009	12	1	0	0	2.028	14	1	0	0
Substanz 20 µM	130 µl	2.000	15	0	0	0	2.013	12	1	0	0
Substanz 40 µM	130 µl	252	3	0	0	0	1.003	7	0	0	0

Tab. 5.48: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 3

5.5.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

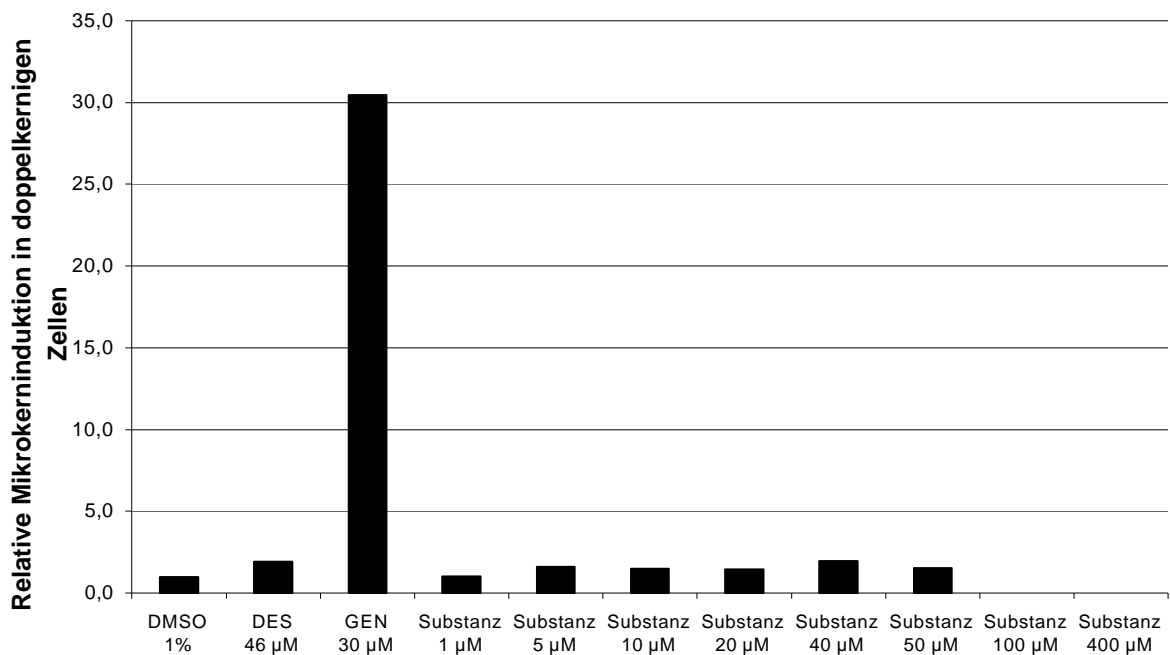


Abb. 5.25: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.5.3. Erläuterungen und Testergebnisse

Fisetin wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis 400 µM in drei unabhängigen Versuchen untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die arithmetischen Mittelwerte aus allen Einzelversuchen, nachdem zuvor für jeden Versuch einzeln die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) berechnet wurden. Die Konzentrationen 5 µM, 50 µM, 100 µM und 400 µM wurden nur in einem Versuch untersucht und stellen deshalb keinen Mittelwert dar. Die Konzentrationen 1 µM, 20 µM und 40 µM wurden in zwei Versuchen untersucht. Als Kontrollsubstanzen dienten

Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.37 – 5.48) kommen jeweils separat die absoluten Messergebnisse für jeden der durchgeführten Einzelversuche.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für Fisetin im Proliferationsexperiment (Abb. 5.21) nach 20-stündiger Recovery-Zeit ab einer Konzentration von 10 μM ein konzentrationsabhängiger relativer antiproliferativer Effekt von ~30%, über 50% bei einer Konzentration von 20 μM , über 70% bei einer Konzentration von 40 μM , mehr als 80% bei einer Konzentration von 50 μM und über 90% bei einer Konzentration von 100 μM in Bezug auf Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden. Die Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.22) erbrachte eine deutliche Einschränkung der relativen Zellüberlebensrate in Bezug auf die Lösemittelkontrolle ab einer Konzentration von 50 μM auf Werte um 50% und konzentrationsabhängig weiter fallend auf Werte unter 10% bei einer Konzentration von 400 μM nach 20-stündiger Recovery-Zeit. Bei der Bestimmung des relativen Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.23) konnte eine Einschränkung der relativen Teilungsaktivität ab einer Konzentration von 10 μM auf Werte um 80% und konzentrationsabhängig weiter fallend auf Werte um 40% bei einer Konzentration von 50 μM in Bezug auf die Lösemittelkontrolle und nach 20-stündiger Recovery-Zeit detektiert werden. Bei der Konzentration 100 μM waren weniger als 10% der Teilungsaktivität im Vergleich zur Lösemittelkontrolle erreicht, wobei eine sichere Auswertung wegen des aufgrund zytotoxischer Effekte stark zerstörten Zellbildes nur eingeschränkt möglich war. Bei 400 μM war das Zellbild total zerstört und eine Auswertung unmöglich.

Die **Gentoxizitätstests** konnten aufgrund starker Überlagerung durch zytotoxische Effekte mögliches gentoxisches Potential von Fisetin nicht sicher belegen. Bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.24) und bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.25) wurde bis zur Konzentration von 40 μM keine deutliche Erhöhung der Mikrokernfrequenz gefunden und verbindliche Aussagen bei höheren Konzentrationen sollten aufgrund der nur unsicher auszuwertenden Zellbilder unterbleiben.

5.6. Resveratrol

5.6.1. Toxisches Potential von Resveratrol

5.6.1.1. Proliferationsexperiment

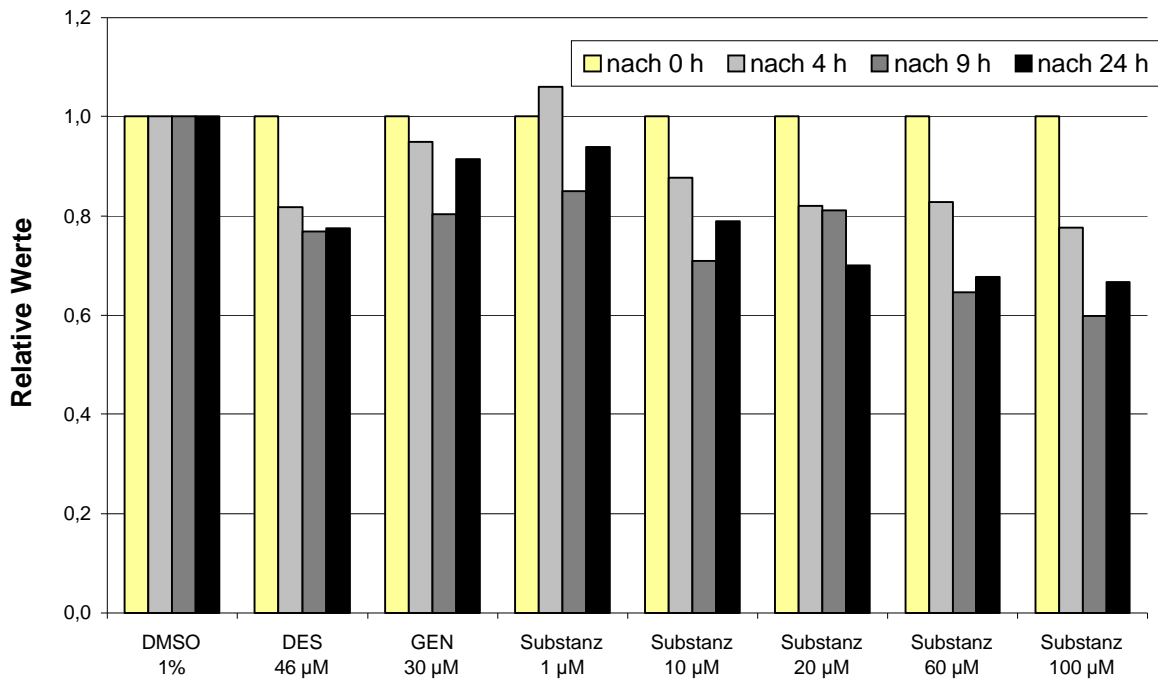


Abb. 5.26: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 10 µM	Substanz 20 µM	Substanz 60 µM	Substanz 100 µM
		ohne Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,9	2,3	2,7	3,0	2,5	2,4	2,4	2,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	3,4	2,6	2,7	2,9	2,4	2,8	2,2	2,0
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	8,1	6,3	7,4	7,6	6,4	5,7	5,5	5,4
		mit Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,9	2,3	2,7	3,0	2,5	2,4	2,4	2,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,4	1,8	2,1	2,3	2,1	2,0	2,0	1,8
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,6	1,9	2,1	2,4	2,0	2,1	2,0	1,7

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.49: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.6.1.2. Vitalitätsfärbung

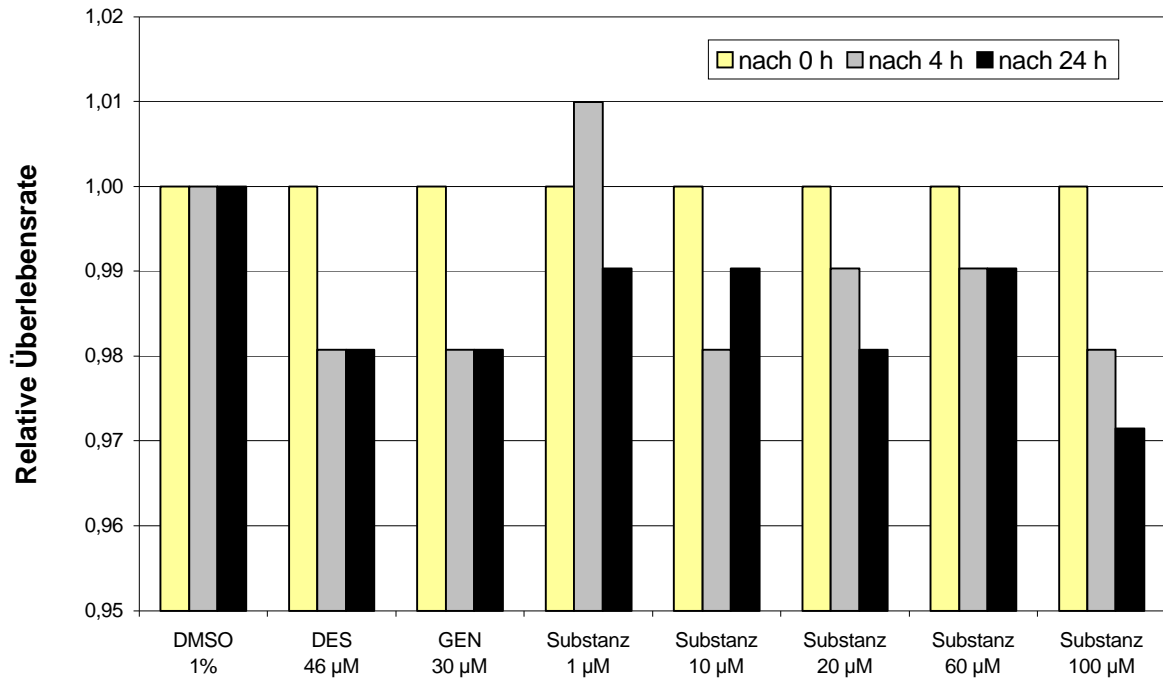


Abb. 5.27: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Feststellung		lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 10 µM	Substanz 20 µM	Substanz 60 µM	Substanz 100 µM
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	0	0	0	0	0	0	0
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	4	4	1	4	3	3	4
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	4	4	3	3	4	3	5
ohne Cytochalin B										
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	0	0	0	0	0	0	0
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	4	4	1	4	3	3	4
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	4	5	6	5	5	7	8	10
mit Cytochalin B										

Tab. 5.50: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.6.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

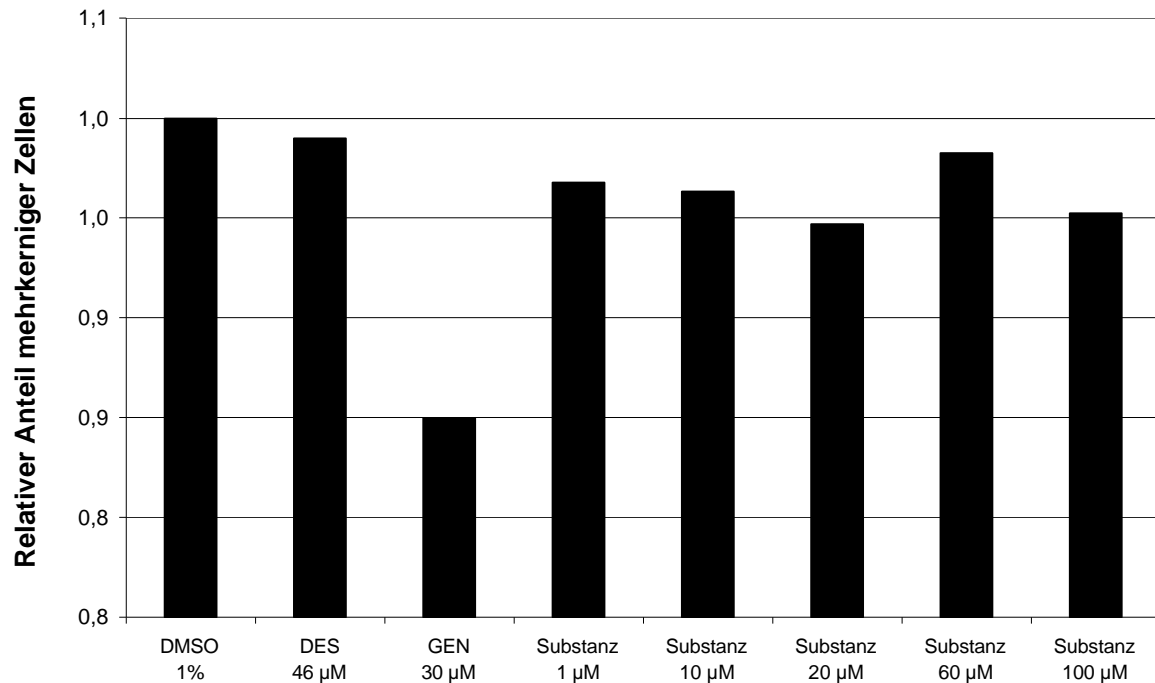


Abb.5.28: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	228	1.685	35	0	0	0	113
DES 46 µM	130 µl	263	1.583	87	5	3	1	256
GEN 30 µM	130 µl	597	1.649	87	5	1	0	105
Substanz 1 µM	130 µl	286	1.611	38	1	0	0	118
Substanz 10 µM	130 µl	310	1.697	53	1	0	0	101
Substanz 20 µM	130 µl	334	1.635	56	2	0	0	89
Substanz 60 µM	130 µl	262	1.660	64	3	0	0	88
Substanz 100 µM	130 µl	313	1.576	77	2	1	0	77

Tab. 5.51: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.6.2. Gentoxisches Potential von Resveratrol

5.6.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

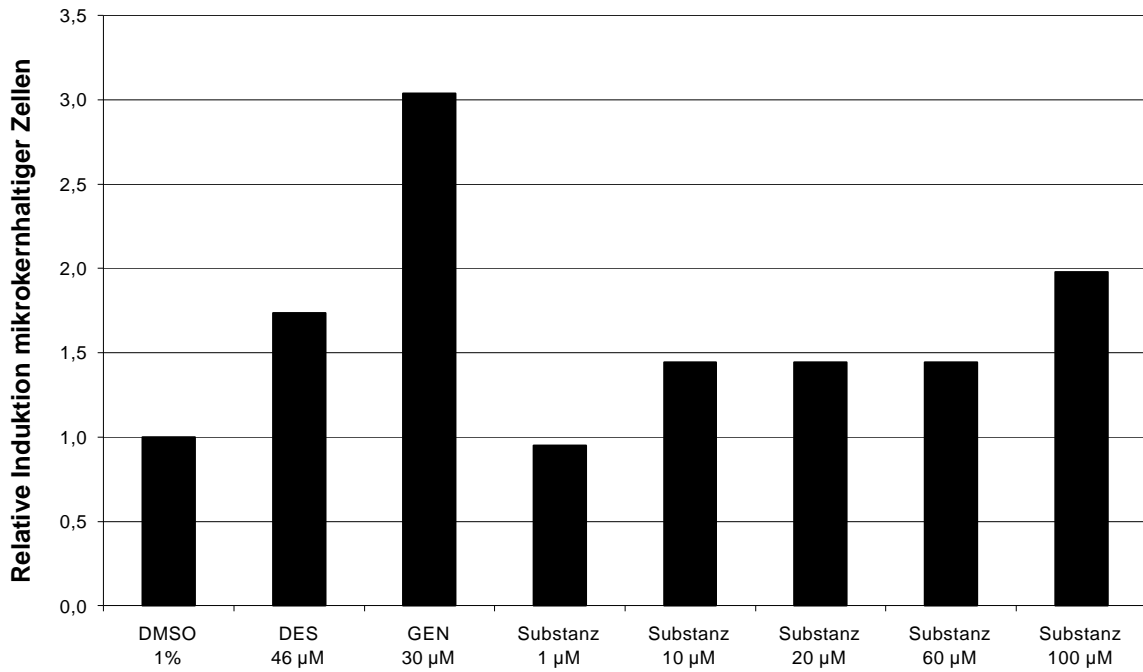


Abb. 5.29: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B										
		Mikrokern nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokern nach 20 Stunden Recovery Time					
		n.a.					n.a.					
Anzahl Mikrokern		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	2.000	18	0	0	0	2.000	20	0	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.000	37	4	0	0	2.000	35	0	0	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	38	1	0	0	2.000	53	8	1	0	0
Substanz 1 µM	130 µl	2.000	19	0	0	0	2.000	19	0	0	0	0
Substanz 10 µM	130 µl	2.000	23	0	0	0	2.000	29	0	0	0	0
Substanz 20 µM	130 µl	2.000	25	0	0	0	2.000	29	0	0	0	0
Substanz 60 µM	130 µl	2.000	23	0	0	0	2.000	28	1	0	0	0
Substanz 100 µM	130 µl	2.000	24	0	0	0	2.000	38	2	0	0	0

Tab. 5.52: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.6.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

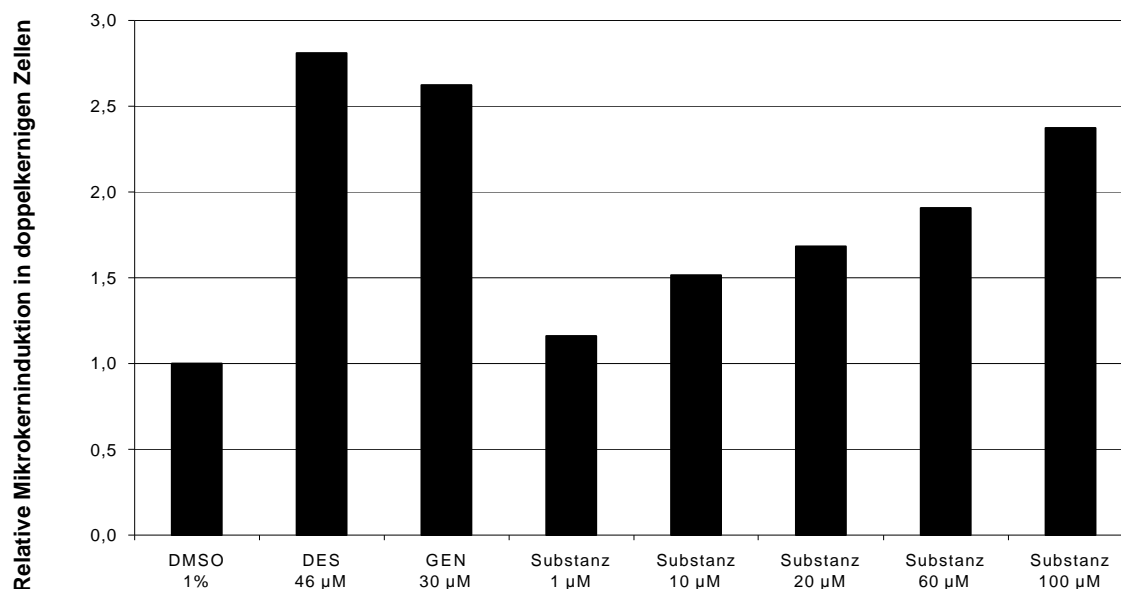


Abb. 5.30: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.6.3. Erläuterungen und Testergebnisse

Resveratrol wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis 100 µM untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Als Kontrollsubstanzen dienten Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (.Tab. 5.49 – 5.52) kommen die absoluten Messergebnisse aus dem zur Testsubstanz durchgeführten Versuch.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für Resveratrol im Proliferations-Experiment (Abb. 5.26) nach 20-stündiger Recovery-Zeit ein relativer konzentrationsabhängiger antiproliferativer Effekt von ~ 20% beginnend bei einer Konzentration von 10 µM bis auf Werte um 30% bei Erreichen einer Konzentration von 100 µM in Bezug auf Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden. Bei der Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.27) und des Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.28) konnte bis zum Erreichen der Konzentration von 100 µM kein zytotoxischer Effekt festgestellt werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten gentoxisches Potential von Resveratrol. So wurde bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.29) und bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.30) übereinstimmend eine gute Verdopplung der Mikrokerninduktion in Bezug auf die Lösemittelkontrolle bis zum Erreichen einer Konzentration von 100 µM und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert.

5.7. Delphinidin

5.7.1. Toxisches Potential von Delphinidin

5.7.1.1. Proliferationsexperiment

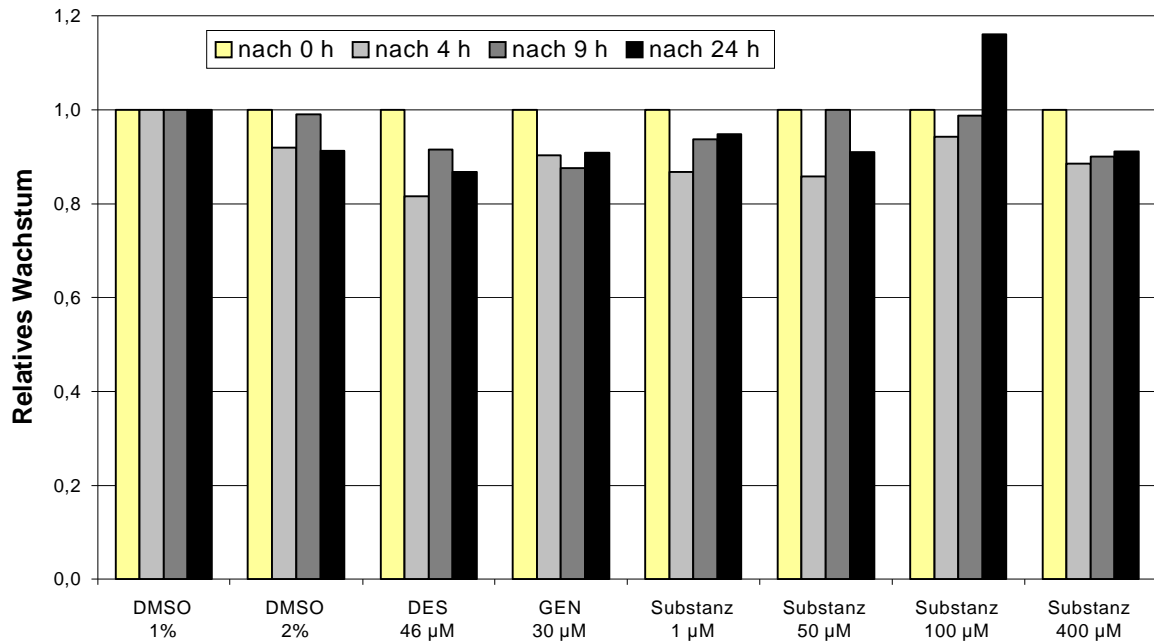


Abb. 5.31: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DMSO 2%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 50 µM	Substanz 100 µM	Substanz 400 µM
		ohne Cytochalin B *)							
Zellichtmessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,4	2,2	2,0	2,2	2,1	2,1	2,3	2,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,9	2,9	2,6	2,5	2,7	2,9	2,9	2,6
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	7,5	6,8	6,5	6,8	7,1	6,8	8,7	6,8
		mit Cytochalin B *)							
Zellichtmessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,4	2,2	2,0	2,2	2,1	2,1	2,3	2,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,3	2,2	1,6	2,0	1,9	2,2	2,2	1,9
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,4	2,3	1,9	2,4	2,2	2,2	2,3	2,0

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.53: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.7.1.2. Vitalitätsfärbung

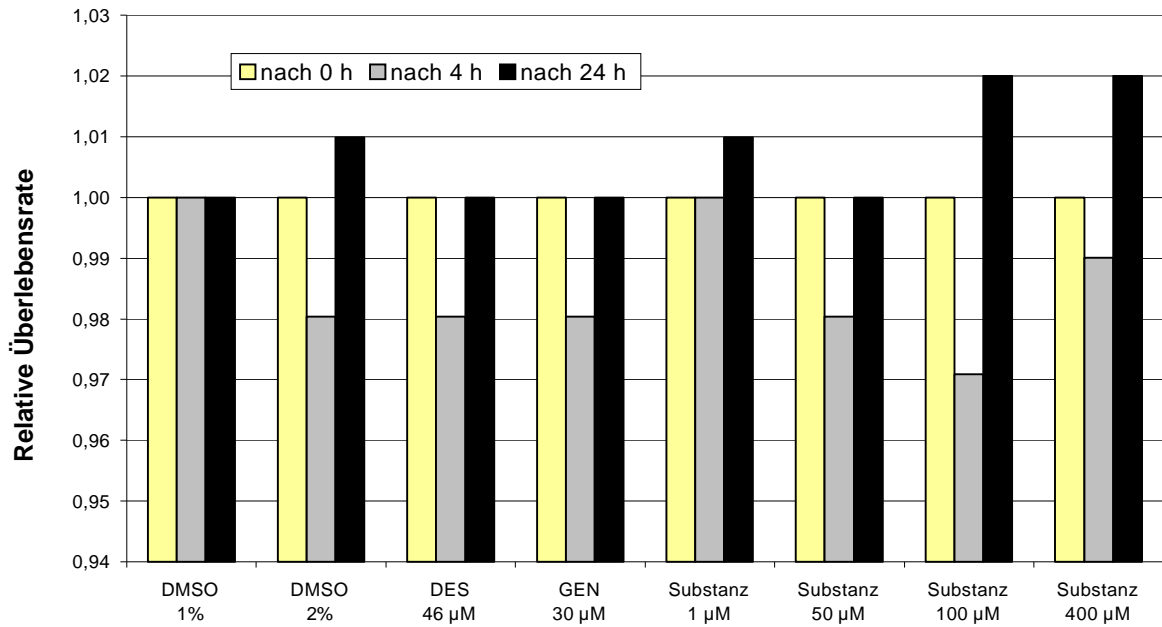


Abb. 5.32g: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Feststellung		lebend / tot	DMSO 1%	DMSO 2%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 50 µM	Substanz 100 µM	Substanz 400 µM
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	1	1	1	1	1	1	1
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	2	2	2	0	2	3	1
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	1	2	2	1	2	0	0
ohne Cytochalasin B										
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	1	1	1	1	1	1	1
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	2	2	2	0	2	3	1
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	2	2	3	1	0	1	2
mit Cytochalasin B										
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	1	1	1	1	1	1	1
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	2	2	2	0	2	3	1
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	2	2	3	1	0	1	2

Abb. 5.54: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.7.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

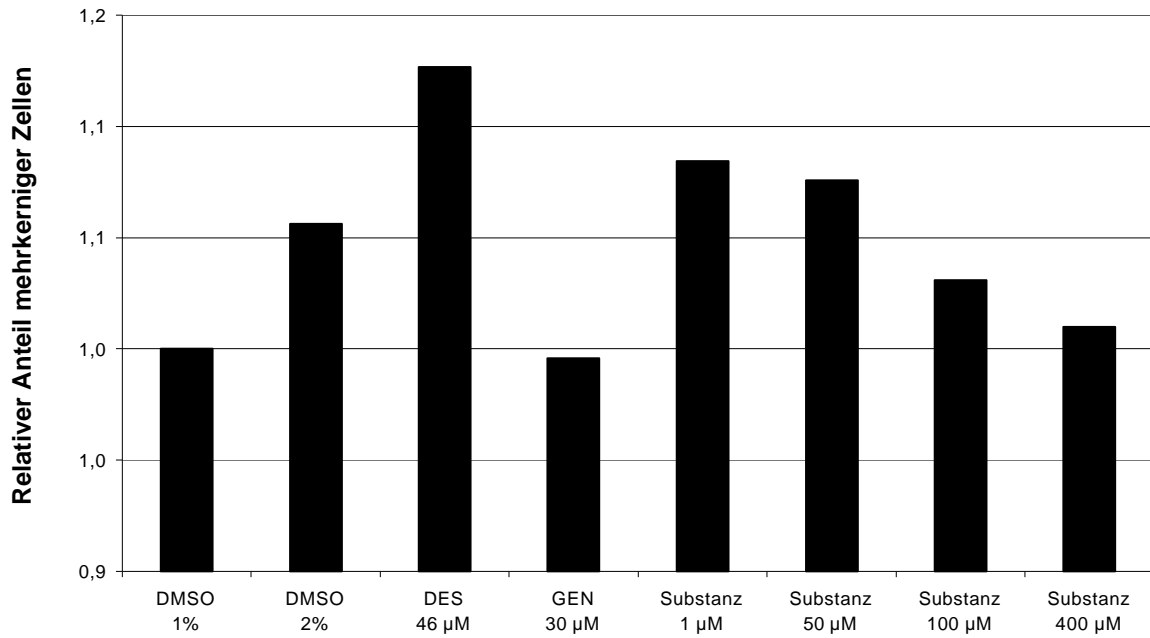


Abb.5.33: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3		4
DMSO 1%	130 µl	375	1.405	38	1	0	0	169
DMSO 2%	130 µl	305	1.585	47	1	0	0	193
DES 46 µM	130 µl	198	1.562	90	3	0	0	452
GEN 30 µM	130 µl	409	1.398	112	3	0	0	207
Substanz 1 µM	130 µl	254	1.568	52	0	0	0	241
Substanz 50 µM	130 µl	263	1.537	45	0	0	0	222
Substanz 100 µM	130 µl	338	1.517	47	3	0	0	161
Substanz 400 µM	130 µl	359	1.482	41	0	0	0	106

Tab. 5.55: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.7.2. Gentoxisches Potential von Delphinidin

5.7.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

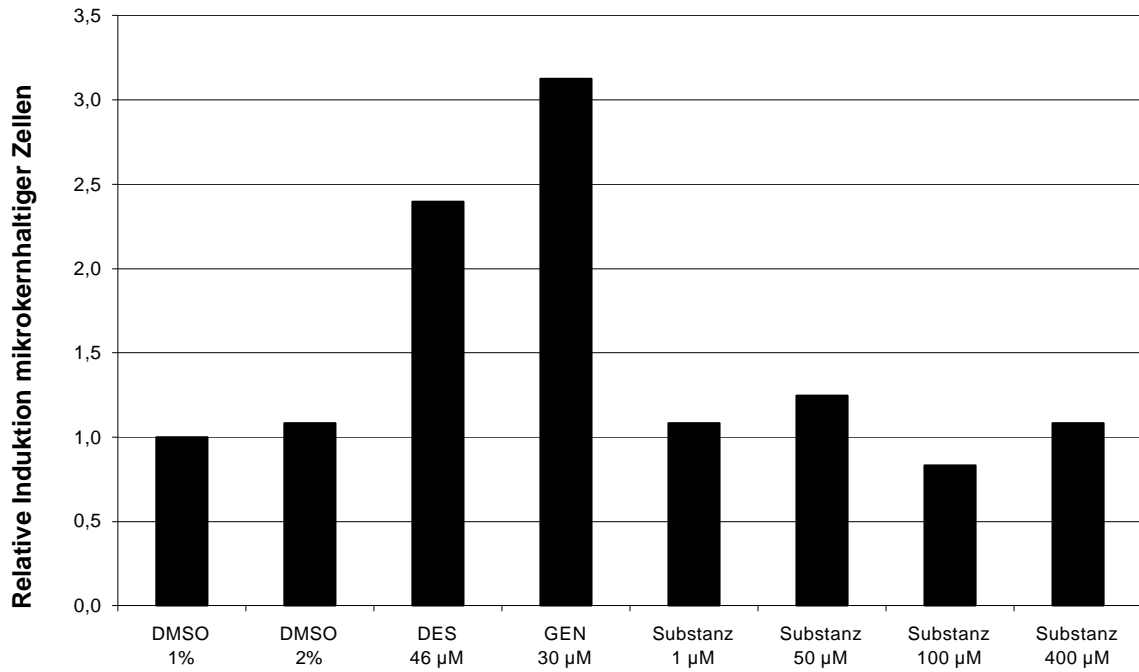


Abb. 5.34: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokern nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokern nach 20 Stunden Recovery Time				
Anzahl Mikrokern		n.a.					n.a.				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.000	15	0	0	0	2.000	12	0	0	0
DMSO 2%	130 µl	2.000	12	0	0	0	2.000	13	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.000	40	1	0	0	2.000	28	1	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	30	3	0	0	2.000	37	1	0	0
Substanz 1 µM	130 µl	2.000	15	0	0	0	2.000	13	0	0	0
Substanz 50 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	15	0	0	0
Substanz 100 µM	130 µl	2.000	11	0	0	0	2.000	10	0	0	0
Substanz 400 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	13	0	0	0

Tab. 5.56: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.7.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

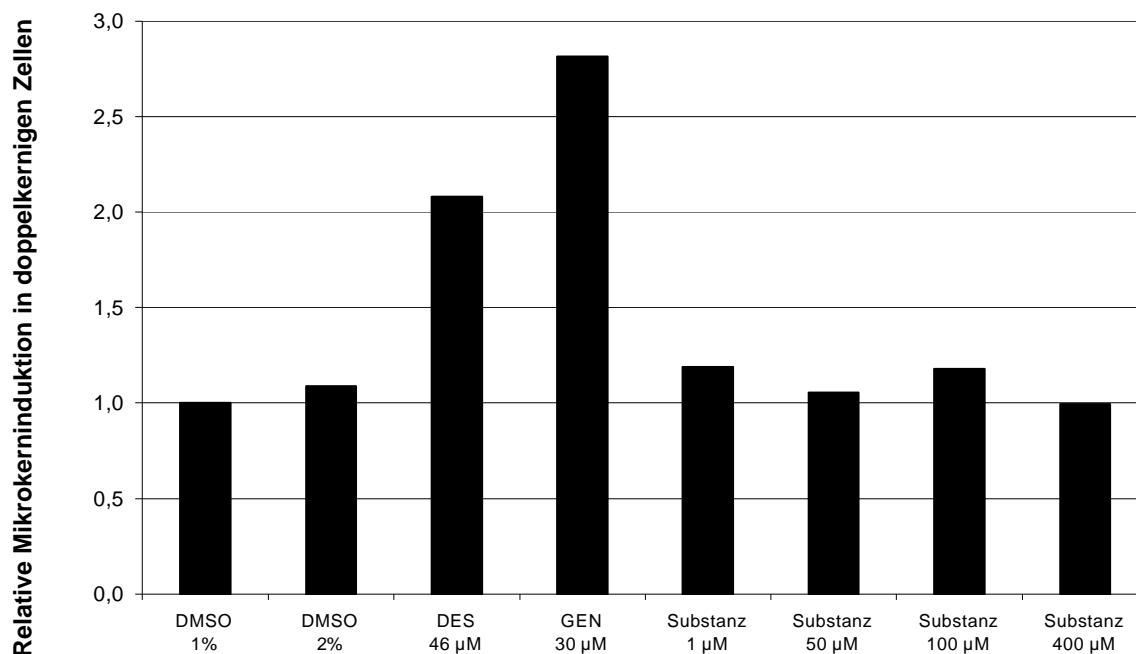


Abb. 5.35: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.7.3. Erläuterungen und Testergebnisse

Delphinidin-Chlorid wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis 400 µM untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Als Kontrollsubstanzen dienten Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.53 – 5.56) kommen die absoluten Messergebnisse aus dem zur Testsubstanz durchgeführten Versuch.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für Delphinidin-Chlorid bis zu der Konzentration von 400 µM und nach 20-stündiger Recovery-Zeit weder im Proliferations-Experiment (Abb. 5.31) noch bei der Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.32) oder des Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.33) ein zytotoxischer Effekt der Testsubstanz im Vergleich zur Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten kein gentoxisches Potential von Delphinidin-Chlorid. Bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.34) und bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.35) wurde übereinstimmend keine Mikrokerninduktion in Bezug auf die Lösemittelkontrolle bis zum Erreichen einer Konzentration von 400 µM und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert.

5.7. Delphinidin

5.7.1. Toxisches Potential von Delphinidin

5.7.1.1. Proliferationsexperiment

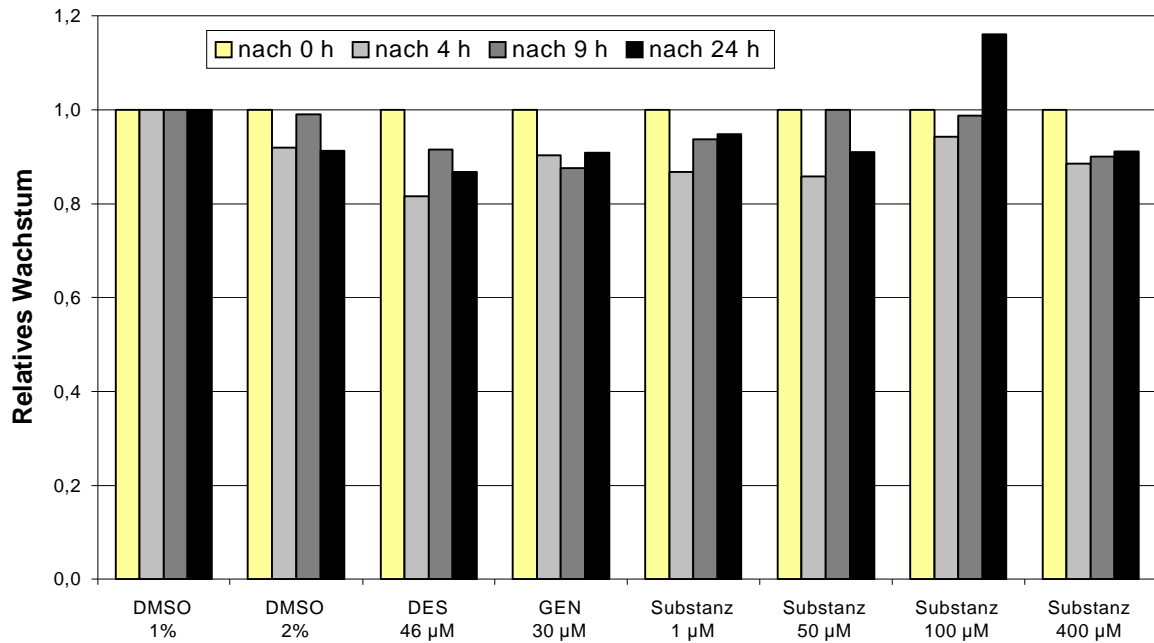


Abb. 5.31: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DMSO 2%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 50 µM	Substanz 100 µM	Substanz 400 µM
ohne Cytochalin B *)									
Zelllichtermessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,4	2,2	2,0	2,2	2,1	2,1	2,3	2,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,9	2,9	2,6	2,5	2,7	2,9	2,9	2,6
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	7,5	6,8	6,5	6,8	7,1	6,8	8,7	6,8
mit Cytochalin B *)									
Zelllichtermessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,4	2,2	2,0	2,2	2,1	2,1	2,3	2,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,3	2,2	1,6	2,0	1,9	2,2	2,2	1,9
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,4	2,3	1,9	2,4	2,2	2,2	2,3	2,0

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.53: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.7.1.2. Vitalitätsfärbung

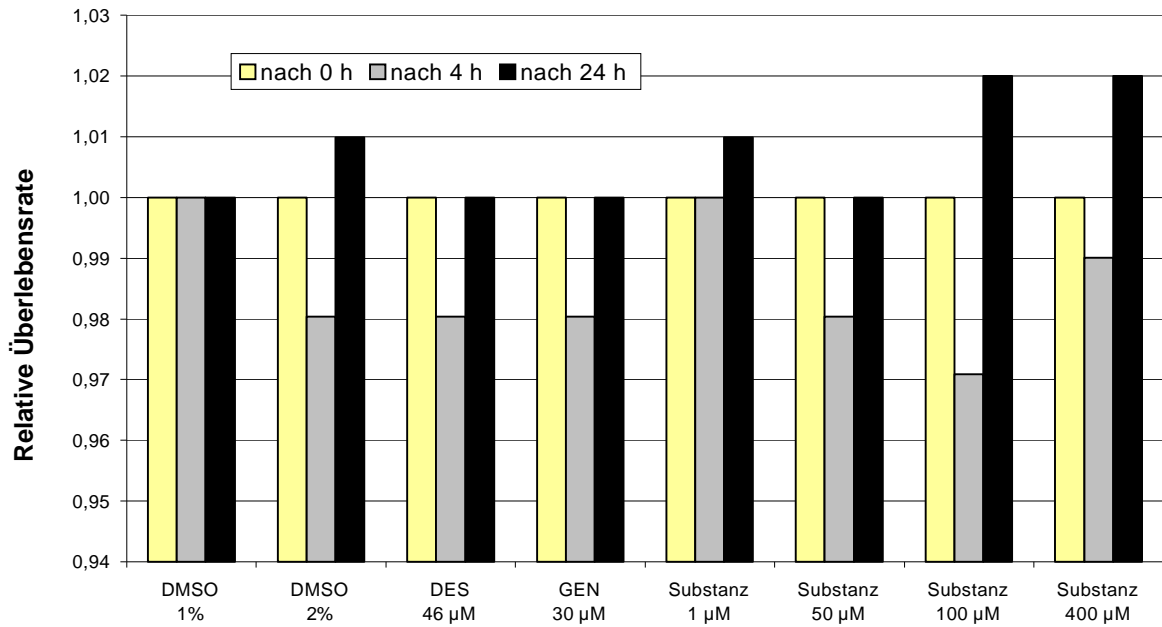


Abb. 5.32g: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Feststellung		lebend / tot	DMSO 1%	DMSO 2%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 50 µM	Substanz 100 µM	Substanz 400 µM
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	1	1	1	1	1	1	1
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	2	2	2	0	2	3	1
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	1	2	2	1	2	0	0
ohne Cytochalasin B										
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	1	1	1	1	1	1	1
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	2	2	2	0	2	3	1
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	2	2	3	1	0	1	2
mit Cytochalasin B										
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	1	1	1	1	1	1	1
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	2	2	2	0	2	3	1
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	2	2	2	3	1	0	1	2

Abb. 5.54: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.7.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

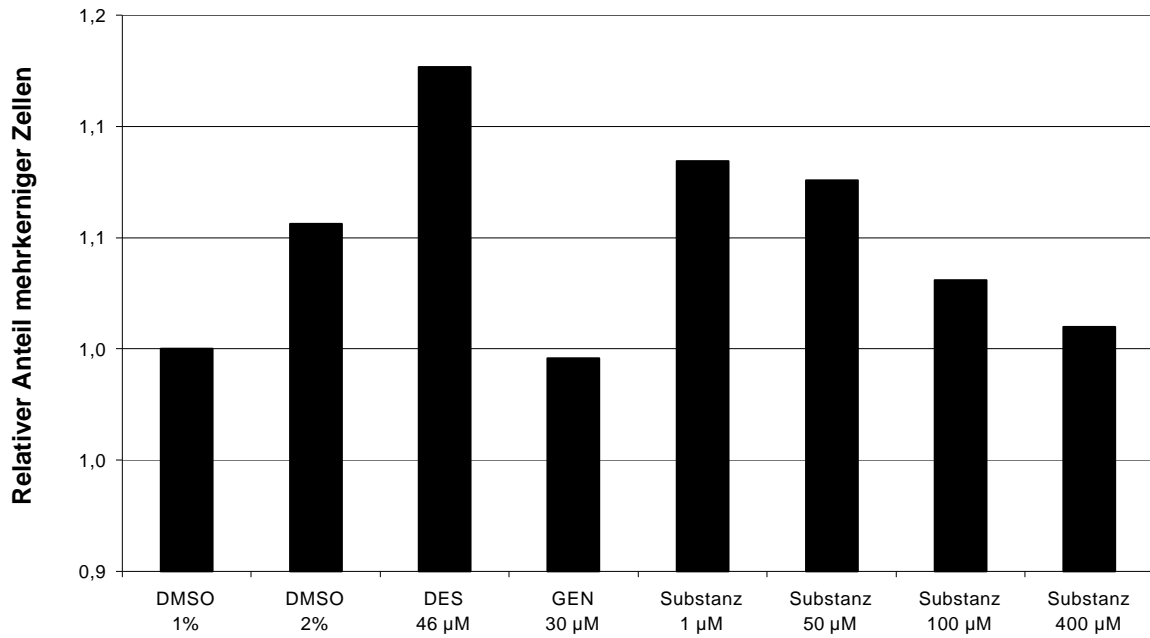


Abb.5.33: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3	4	
DMSO 1%	130 µl	375	1.405	38	1	0	0	169
DMSO 2%	130 µl	305	1.585	47	1	0	0	193
DES 46 µM	130 µl	198	1.562	90	3	0	0	452
GEN 30 µM	130 µl	409	1.398	112	3	0	0	207
Substanz 1 µM	130 µl	254	1.568	52	0	0	0	241
Substanz 50 µM	130 µl	263	1.537	45	0	0	0	222
Substanz 100 µM	130 µl	338	1.517	47	3	0	0	161
Substanz 400 µM	130 µl	359	1.482	41	0	0	0	106

Tab. 5.55: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.7.2. Gentoxisches Potential von Delphinidin

5.7.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

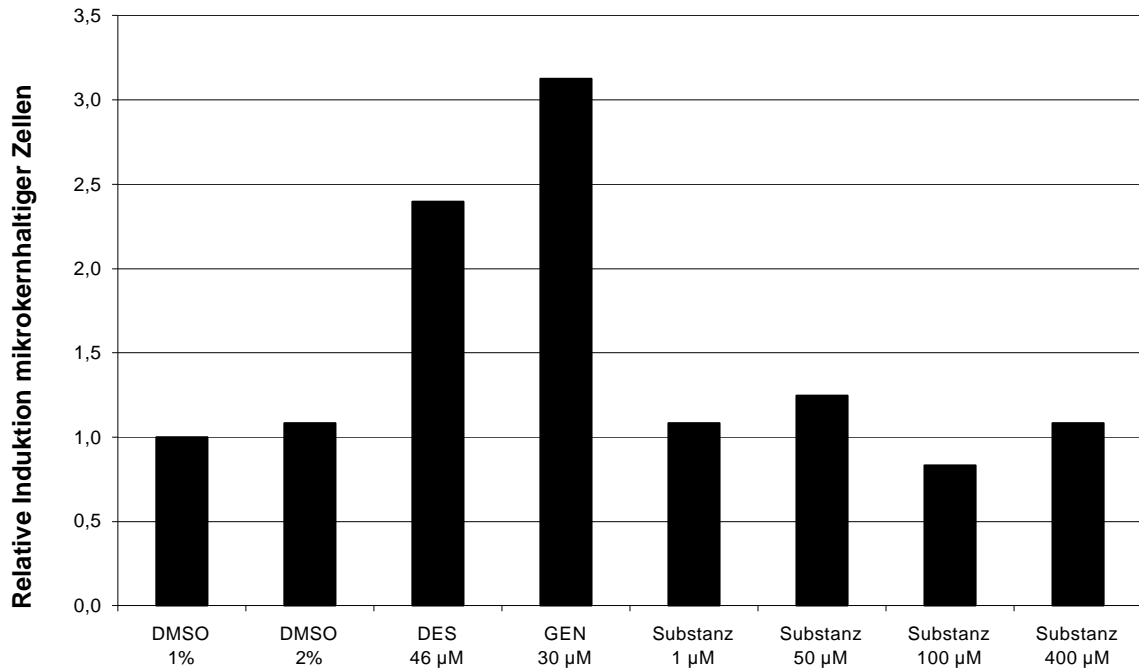


Abb. 5.34: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokern nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokern nach 20 Stunden Recovery Time				
Anzahl Mikrokern		n.a.					n.a.				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.000	15	0	0	0	2.000	12	0	0	0
DMSO 2%	130 µl	2.000	12	0	0	0	2.000	13	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.000	40	1	0	0	2.000	28	1	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	30	3	0	0	2.000	37	1	0	0
Substanz 1 µM	130 µl	2.000	15	0	0	0	2.000	13	0	0	0
Substanz 50 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	15	0	0	0
Substanz 100 µM	130 µl	2.000	11	0	0	0	2.000	10	0	0	0
Substanz 400 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	13	0	0	0

Tab. 5.56: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.7.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

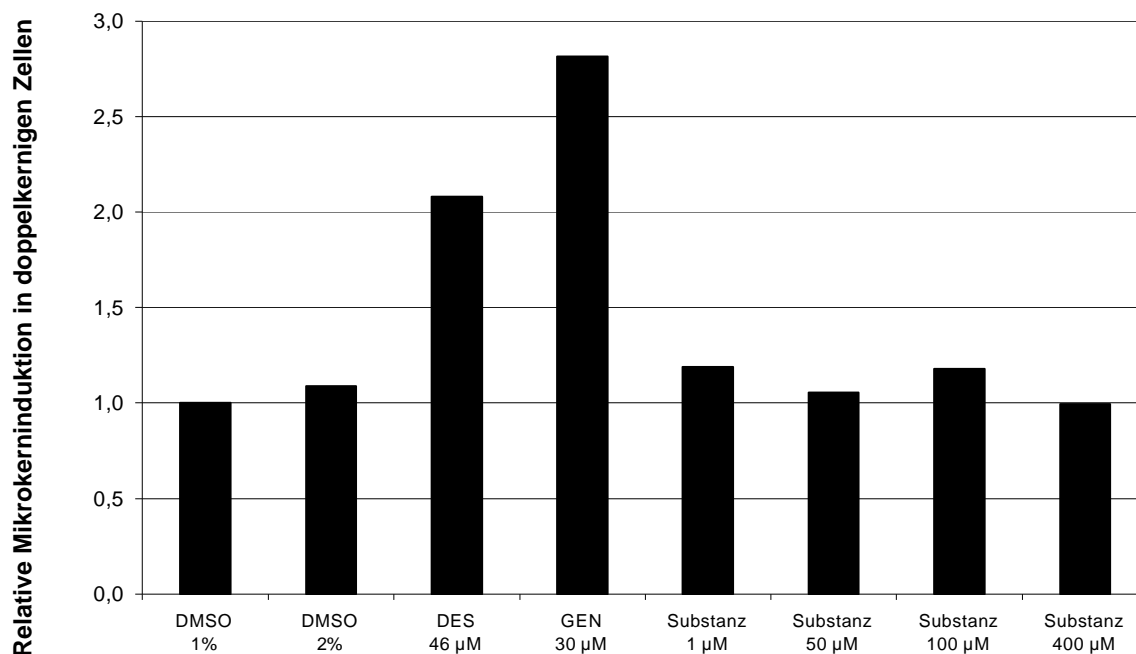


Abb. 5.35: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.7.3. Erläuterungen und Testergebnisse

Delphinidin-Chlorid wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis 400 µM untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Als Kontrollsubstanzen dienten Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.53 – 5.56) kommen die absoluten Messergebnisse aus dem zur Testsubstanz durchgeführten Versuch.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für Delphinidin-Chlorid bis zu der Konzentration von 400 µM und nach 20-stündiger Recovery-Zeit weder im Proliferations-Experiment (Abb. 5.31) noch bei der Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.32) oder des Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.33) ein zytotoxischer Effekt der Testsubstanz im Vergleich zur Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten kein gentoxisches Potential von Delphinidin-Chlorid. Bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.34) und bei der Bestimmung der relativen Mikrokernelinduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.35) wurde übereinstimmend keine Mikrokernelinduktion in Bezug auf die Lösemittelkontrolle bis zum Erreichen einer Konzentration von 400 µM und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert.

5.8. Pelargonidin

5.8.1. Toxisches Potential von Pelargonidin

5.8.1.1. Proliferationsexperiment

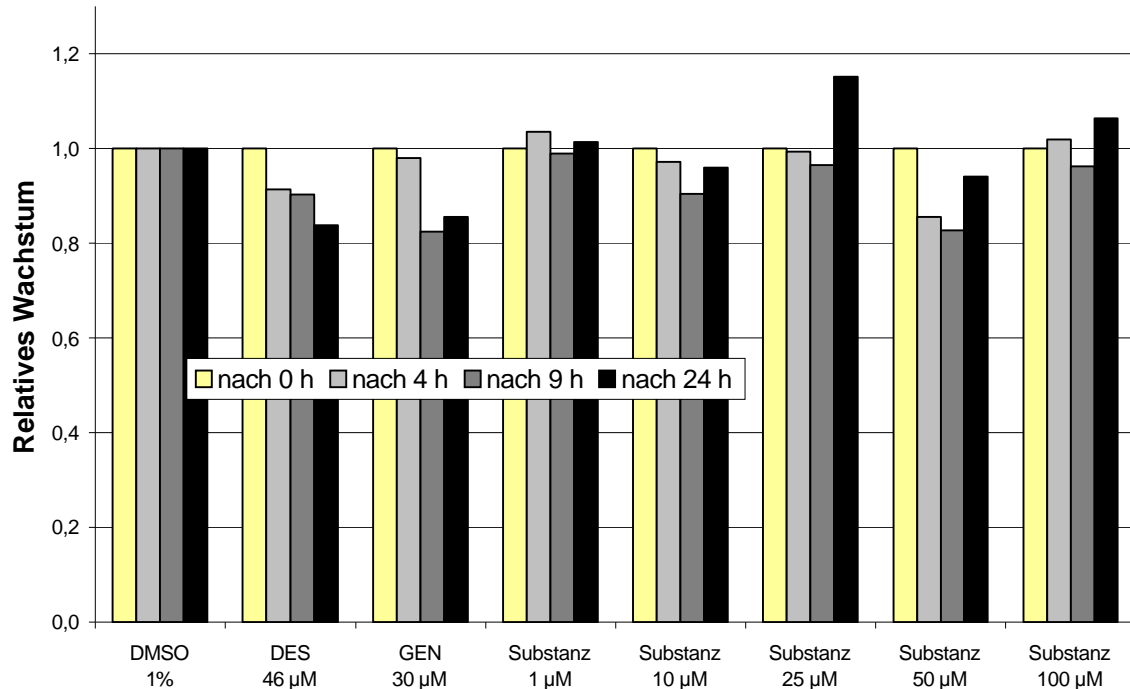


Abb. 5.36: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 10 µM	Substanz 25 µM	Substanz 50 µM	Substanz 100 µM
		ohne Cytochalin B *)							
Zellichtmessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,8	1,9	2,1	1,9	2,0	1,7	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,1	1,9	1,7	2,1	1,9	2,0	1,7	2,0
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	5,2	4,3	4,4	5,2	4,9	5,9	4,9	5,5
		mit Cytochalin B *)							
Zellichtmessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,8	1,9	2,1	1,9	2,0	1,7	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,5	1,2	1,4	1,5	1,5	1,5	1,2	1,5
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	1,7	1,4	1,5	1,6	1,5	1,6	1,3	1,5

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.57: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.8.1.2. Vitalitätsfärbung

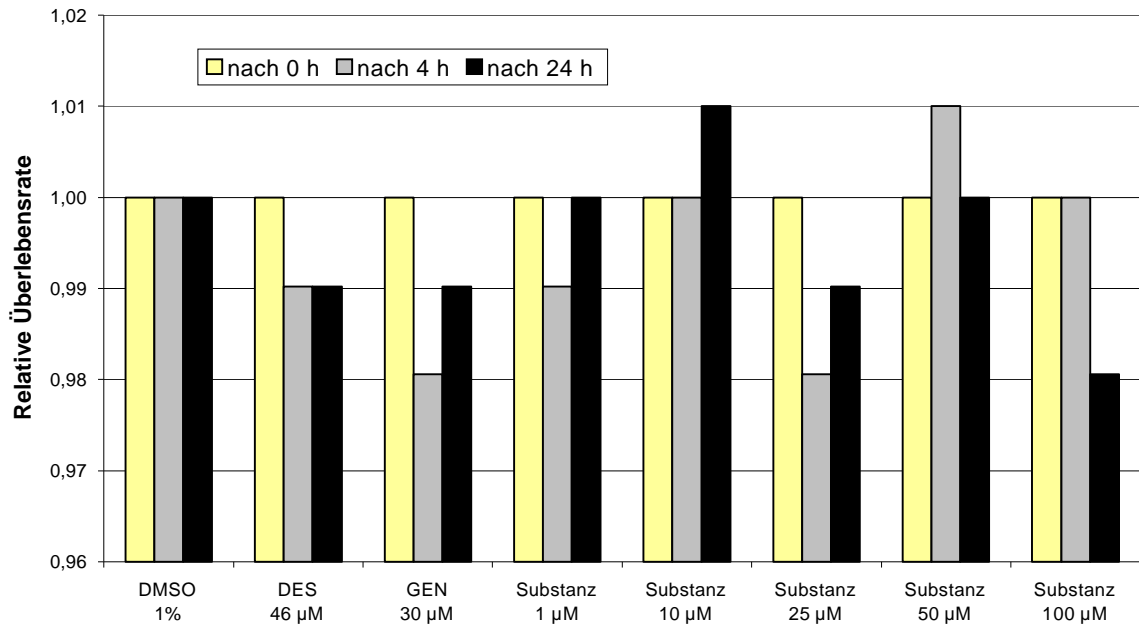


Abb. 5.37: Graphische Darstellung der relativen Überlebensrate von L5178Y

Feststellung		lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 10 µM	Substanz 25 µM	Substanz 50 µM	Substanz 100 µM
ohne Cytochalasin B	nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	0	0	0	0	0	0	0
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	2	3	2	1	3	0	1
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	2	2	1	0	2	1	3
mit Cytochalasin B	nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	0	0	0	0	0	0	0	0
	nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	1	2	3	2	1	3	0	1
	nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100	100
		tot	3	3	2	2	3	4	3	3

Tab. 5.58: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.8.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

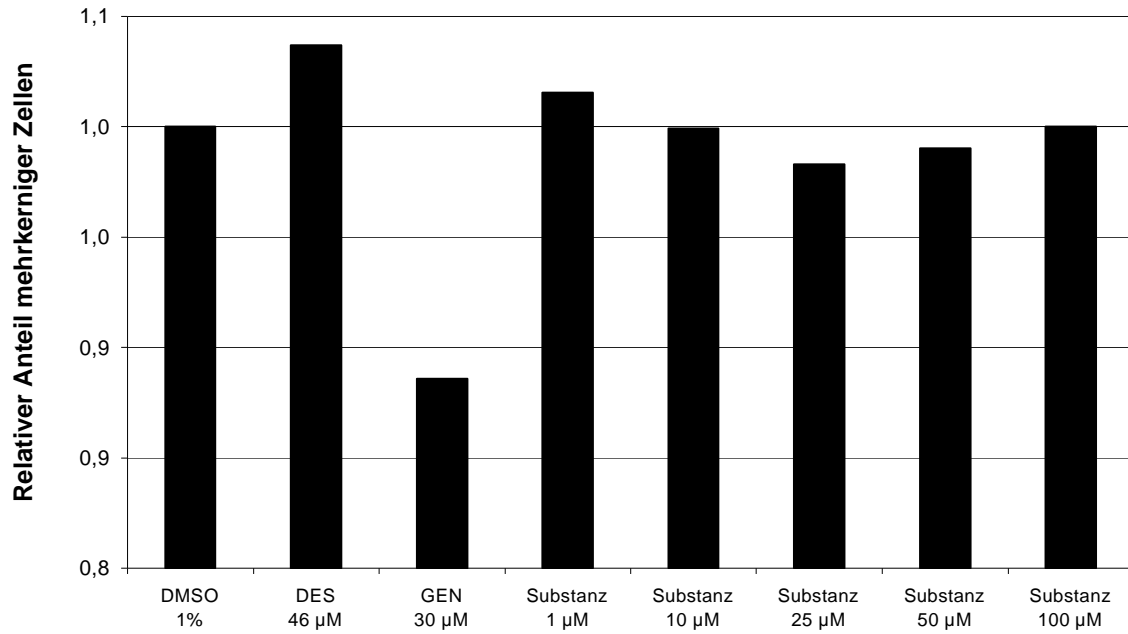


Abb. 5.38: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3		4
DMSO 1%	130 µl	218	1.724	39	0	0	0	139
DES 46 µM	130 µl	158	1.773	70	1	0	0	264
GEN 30 µM	130 µl	465	1.255	379	74	29	6	58
Substanz 1 µM	130 µl	182	1.670	45	1	0	0	146
Substanz 10 µM	130 µl	244	1.895	45	0	0	0	175
Substanz 25 µM	130 µl	263	1.775	49	1	0	0	139
Substanz 50 µM	130 µl	237	1.692	43	0	0	0	150
Substanz 100 µM	130 µl	210	1.663	41	0	0	0	132

Tab. 5.59: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.8.2. Gentoxisches Potential von Pelargonidin

5.8.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

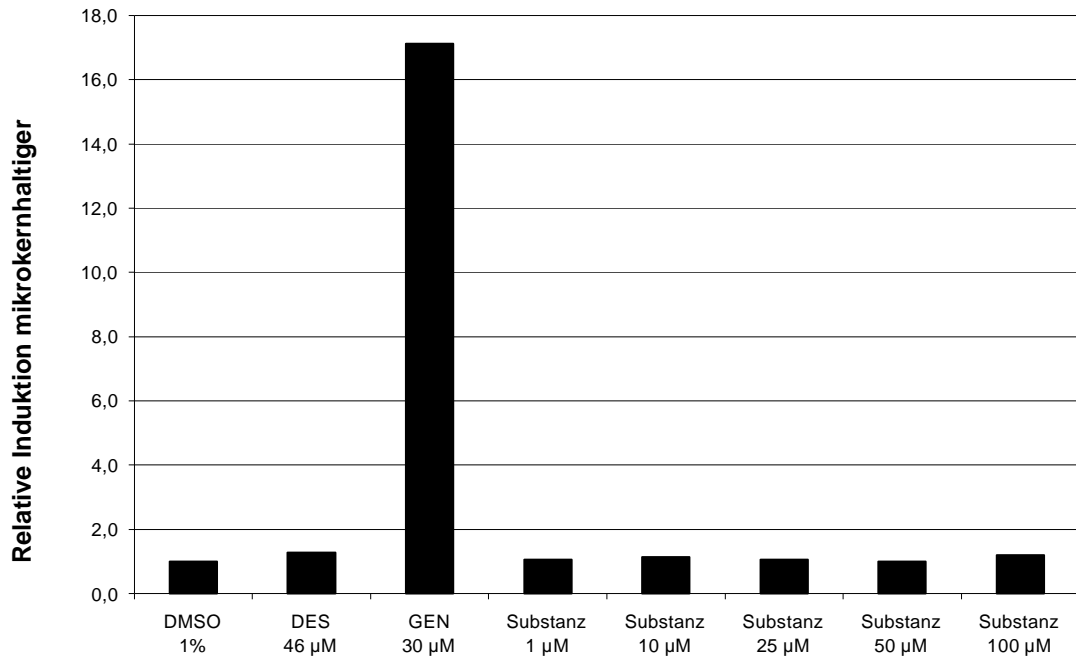


Abb. 5.39: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.000	11	0	0	0	2.000	14	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.000	32	1	0	0	2.000	17	1	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	59	4	0	0	2.000	247	15	6	2
Substanz 1 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	15	0	0	0
Substanz 10 µM	130 µl	2.000	11	0	0	0	2.000	16	0	0	0
Substanz 25 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	15	0	0	0
Substanz 50 µM	130 µl	2.000	12	0	0	0	2.000	14	0	0	0
Substanz 100 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	17	0	0	0

Tab. 5.60: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.8.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

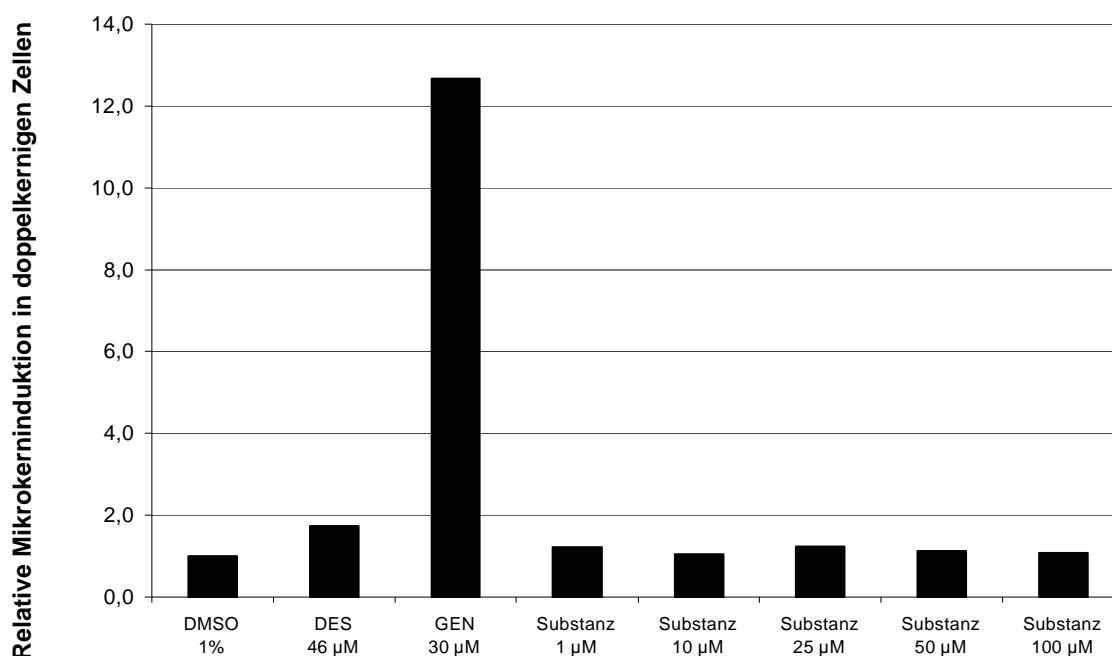


Abb. 5.40: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.8.3. Erläuterungen und Testergebnisse

Pelargonidin-Chlorid wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis 100 µM untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Als Kontrollsubstanzen dienten Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.57 – 5.60) kommen die absoluten Messergebnisse aus dem zur Testsubstanz durchgeführten Versuch.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für Pelargonidin-Chlorid bis zu der Konzentration von 100 µM und nach 20-stündiger Recovery-Zeit weder im Proliferations-Experiment (Abb. 5.36) noch bei der Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.37) oder des Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.38) ein zytotoxischer Effekt der Testsubstanz im Vergleich zur Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten kein gentoxisches Potential von Pelargonidin-Chlorid. Bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.39) und bei der Bestimmung der relativen Mikrokernelinduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.40) wurde übereinstimmend keine Mikrokernelinduktion in Bezug auf die Lösemittelkontrolle bis zum Erreichen einer Konzentration von 100 µM und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert.

5.9. Cyanidin

5.9.1. Toxisches Potential von Cyanidin

5.9.1.1. Proliferationsexperiment

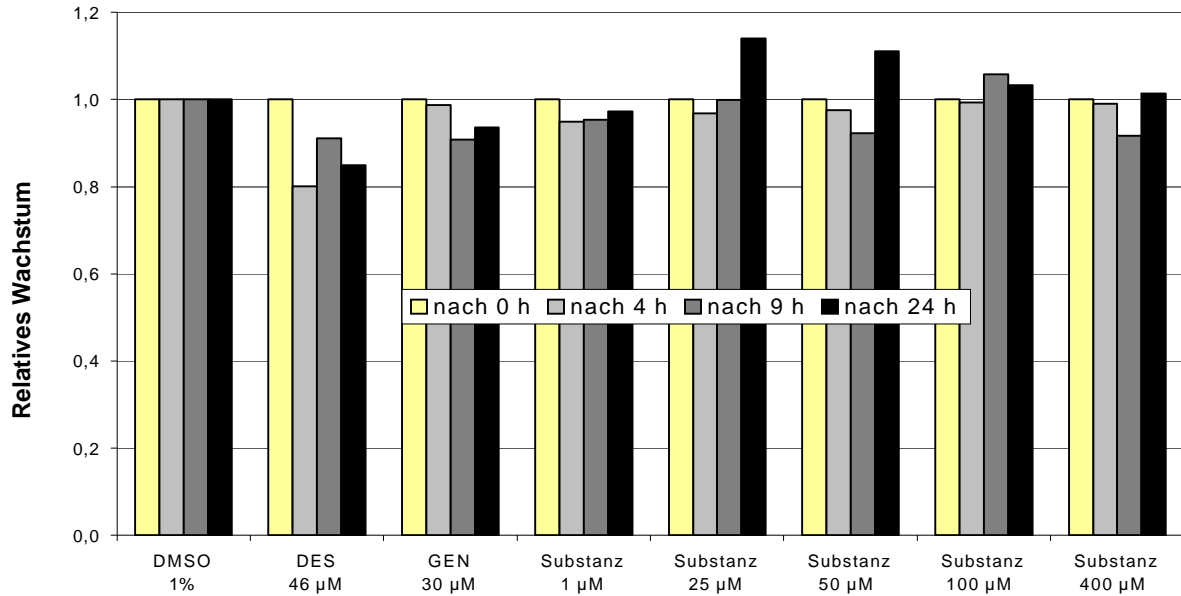


Abb. 5.41: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 25 µM	Substanz 100 µM
ohne Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,8	2,0	2,7	2,6	2,7	2,8
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,7	2,3	2,6	2,7	2,8	2,9
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	7,4	5,9	7,2	7,2	9,1	7,6
mit Cytochalasin B *)							
Zelldichtemessung	nach 0 h	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,8	2,0	2,7	2,6	2,7	2,8
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,2	1,5	2,1	2,0	2,1	2,1
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,3	1,6	2,1	2,2	2,2	2,3

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.61: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Art der Messung	Feststellung	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 25 µM	Substanz 50 µM	Substanz 400 µM
ohne Cytochalasin B *)								
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,8	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,8	1,8	1,6	1,7	1,8	1,7	1,7
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	4,3	3,9	3,9	4,1	4,5	4,8	4,3
mit Cytochalasin B *)								
Zelldichtemessung	nach 0 h	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,0	1,8	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	1,5	1,3	1,3	1,3	1,5	1,4	1,5
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	1,4	1,5	1,3	1,2	1,4	1,2	1,3

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.62: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.9.1.2. Vitalitätsfärbung

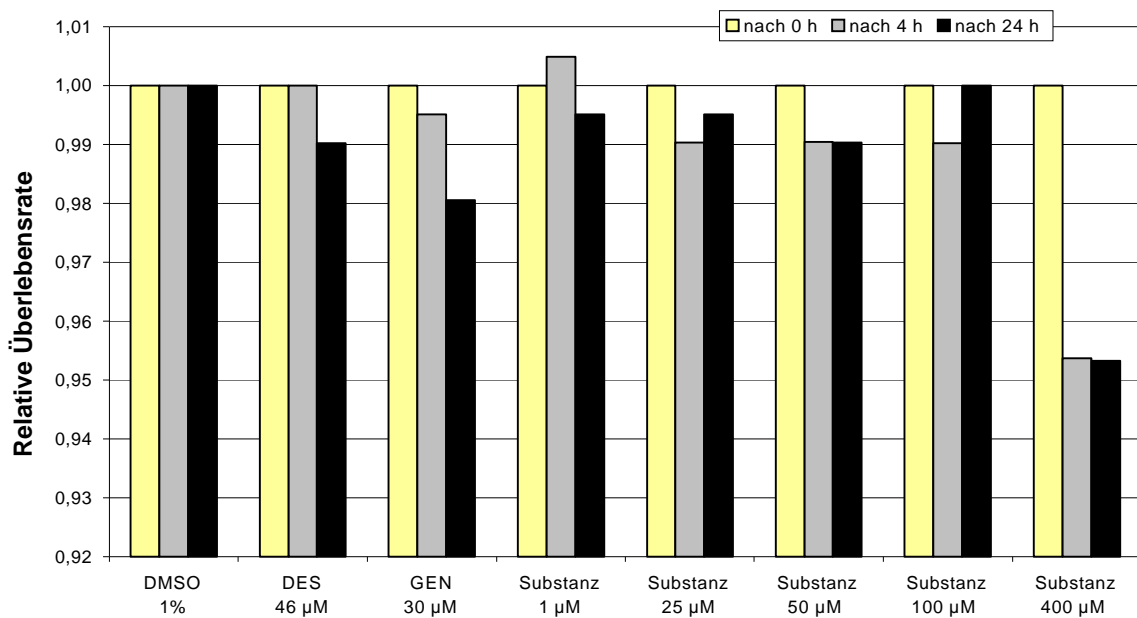


Abb. 5.42: Graphische Darstellung der relativen Zellüberlebensrate von L5178Y

Feststellung	lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 25 µM	Substanz 100 µM
ohne Cytochalin B							
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100
	tot	1	2	2	1	3	2
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100
	tot	0	1	2	0	1	0
mit Cytochalin B							
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100
	tot	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100
	tot	1	2	2	1	3	2
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100
	tot	2	3	3	0	2	1

Tab. 5.63: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Feststellung	lebend / tot	DMSO 1%	DES 46 µM	GEN 30 µM	Substanz 1 µM	Substanz 25 µM	Substanz 50 µM	Substanz 400 µM
ohne Cytochalin B								
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	2	2	2	2	2	2	2
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	3	2	3	2	3	4	8
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	2	3	4	3	2	3	7
mit Cytochalin B								
nach 0 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	2	2	2	2	2	2	2
nach 4 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	3	2	3	2	3	4	8
nach 24 h	lebend	100	100	100	100	100	100	100
	tot	3	4	4	3	4	5	8

Tab. 5.64: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.9.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

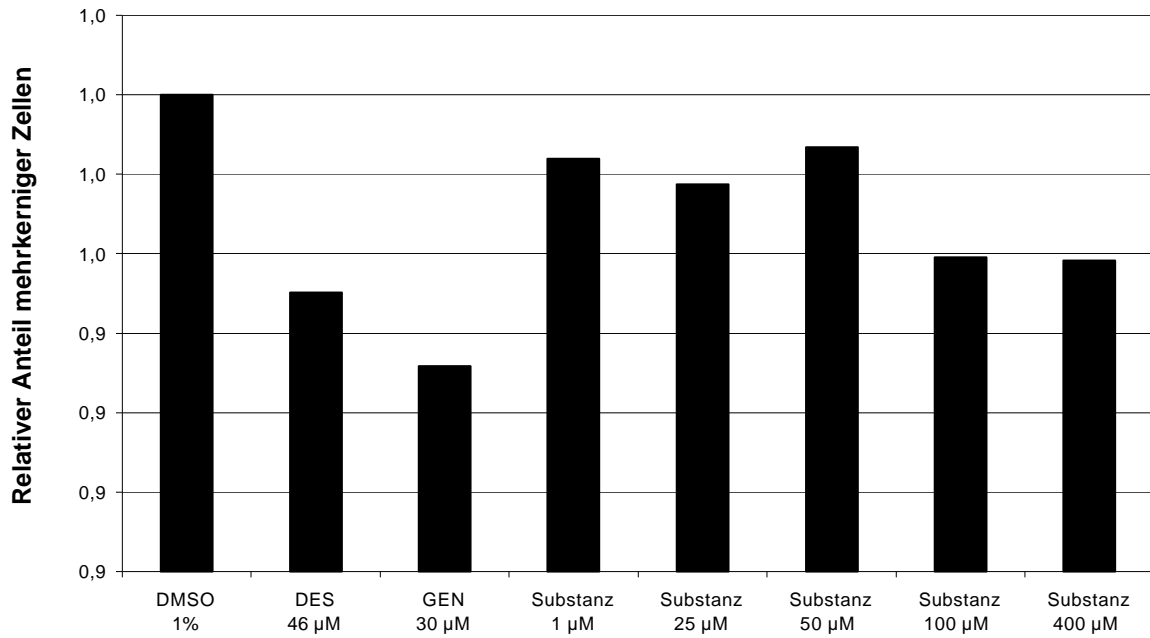


Abb. 5.43: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
		0	1	2	3	4		
DMSO 1%	130 µl	127	1.681	108	1	0	0	300
DES 46 µM	130 µl	340	1.496	154	8	0	0	610
GEN 30 µM	130 µl	362	1.466	251	8	0	0	312
Substanz 1 µM	130 µl	179	1.589	111	1	0	0	353
Substanz 25 µM	130 µl	201	1.533	123	7	0	0	407
Substanz 100 µM	130 µl	207	1.480	134	5	0	0	335

Tab. 5.65: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
		0	1	2	3	4		
DMSO 1%	130 µl	184	1.515	53	3	0	0	278
DES 46 µM	130 µl	248	1.407	118	7	0	1	463
GEN 30 µM	130 µl	277	1.435	263	21	8	3	221
Substanz 1 µM	130 µl	198	1.493	46	3	0	0	289
Substanz 25 µM	130 µl	200	1.434	54	3	0	0	279
Substanz 50 µM	130 µl	212	1.558	65	5	1	0	226
Substanz 400 µM	130 µl	284	1.646	83	11	3	1	183

Tab. 5.66: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.9.2. Gentoxisches Potential von Cyanidin

5.9.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

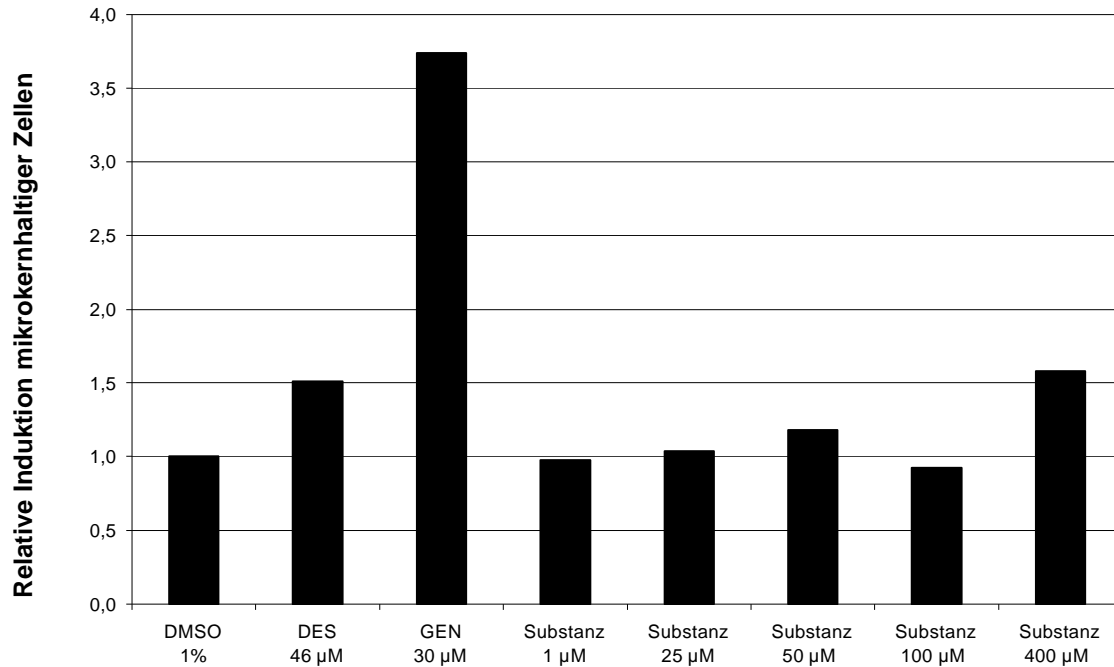


Abb. 5.44: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
Anzahl Mikrokerne		n.a.					n.a.				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.000	10	0	0	0	2.000	13	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.000	33	1	0	0	2.000	23	1	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	27	0	0	0	2.000	41	1	0	0
Substanz 1 µM	130 µl	2.000	10	0	0	0	2.000	11	2	0	0
Substanz 25 µM	130 µl	2.000	15	0	0	0	2.000	13	1	0	0
Substanz 100 µM	130 µl	2.000	19	0	0	0	2.000	12	0	0	0

Tab. 5.67: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 1

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
Anzahl Mikrokerne		n.a.					n.a.				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 1%	130 µl	2.000	21	0	0	0	2.000	22	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.000	59	0	1	0	2.000	25	1	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	59	1	0	0	2.000	92	5	1	0
Substanz 1 µM	130 µl	2.000	16	0	0	0	2.000	21	0	0	0
Substanz 25 µM	130 µl	2.000	22	0	0	0	2.000	22	0	0	0
Substanz 50 µM	130 µl	2.000	21	0	0	0	2.000	26	0	0	0
Substanz 400 µM	130 µl	2.000	29	0	0	0	2.000	34	1	0	0

Tab. 5.68: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse aus Versuch 2

5.9.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

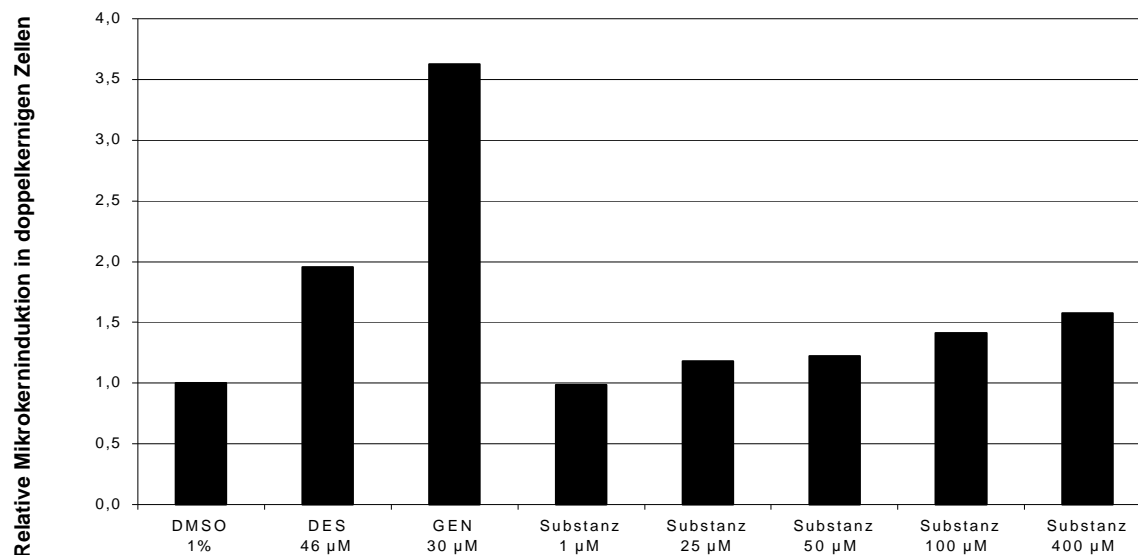


Abb. 5.45: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.9.3. Erläuterungen und Testergebnisse

Cyanidin-Chlorid wurde in den Konzentrationen von 1 µM bis 400 µM in zwei unabhängigen Versuchen untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die arithmetischen Mittelwerte aus beiden Einzelversuchen, nachdem zuvor für jeden Versuch einzeln die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) berechnet wurden. Die Konzentrationen 50, 100 und 400 µM wurden jeweils nur in einem Versuch untersucht und stellen deshalb keine Mittelwerte dar. Als Kontrollsubstanzen dienten Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.61 – 5.68) kommen jeweils separat die absoluten Messergebnisse für jeden der durchgeführten Einzelversuche.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

In den **Toxizitätstests** konnte für Cyanidin-Chlorid bis zu der Konzentration von 400 µM und nach 20-stündiger Recovery-Zeit weder im Proliferations-Experiment (Abb. 5.41) noch bei der Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.42) oder des Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.43) ein deutlicher zytotoxischer Effekt der Testsubstanz im Vergleich zur Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) detektiert werden.

Die **Gentoxizitätstests** zeigte mögliches gentoxisches Potential von Cyanidin-Chlorid. So wurde bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.44) und bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.45) eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz auf das 1,5-fache der Lösemittelkontrolle bei Erreichen einer Konzentration von 400 µM und nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert. Bei niedrigeren Konzentrationen zeigte sich keine Mikrokerninduktion.

5.10. Antocyane im direkten Vergleich

5.10.1. Toxisches Potential von Antocyanen

5.10.1.1. Proliferationsexperiment

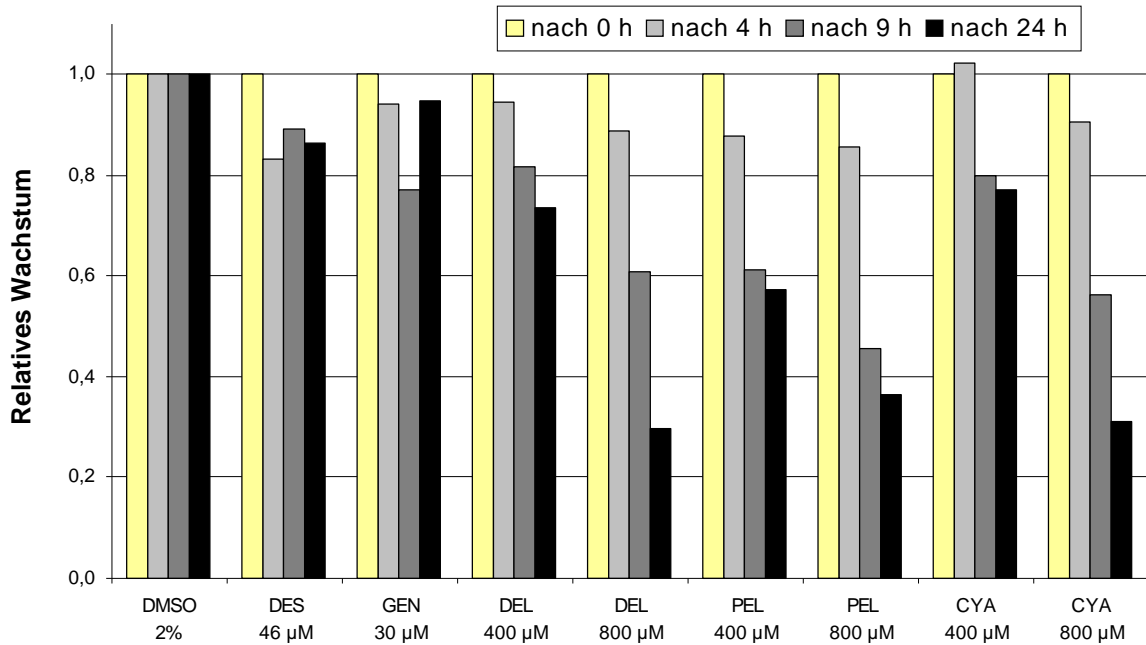


Abb. 5.46: Graphische Darstellung der relativen Proliferation von L5178Y

Art der Messung	Feststellung	DMSO 2%	DES 46 µM	GEN 30 µM	DEL 400 µM	DEL 800 µM	PEL 400 µM	PEL 800 µM	CYA 400 µM	CYA 800 µM
		ohne Cytochalin B *)								
Zelllichtmessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,4	2,0	2,3	2,3	2,2	2,1	2,1	2,5	2,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,8	2,5	2,2	2,3	1,7	1,7	1,3	2,2	1,6
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	7,3	6,3	6,9	5,4	2,2	4,2	2,6	5,6	2,3
		mit Cytochalin B *)								
Zelllichtmessung	nach 0 h	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1. Wachstumsmessung	nach 4 h	2,4	2,0	2,3	2,3	2,2	2,1	2,1	2,5	2,2
Wachstumsmessung nach 5 h Recovery Time	nach 9 h	2,0	1,6	1,7	1,9	1,6	1,4	1,1	1,7	1,3
Wachstumsmessung nach 20 h Recovery Time	nach 24 h	2,2	1,8	1,9	1,9	1,7	1,5	1,2	1,9	2,4

*) Angaben in 10E5 Zellen pro Milliliter (Z/ml)

Tab. 5.69: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.10.1.2. Vitalitätsfärbung

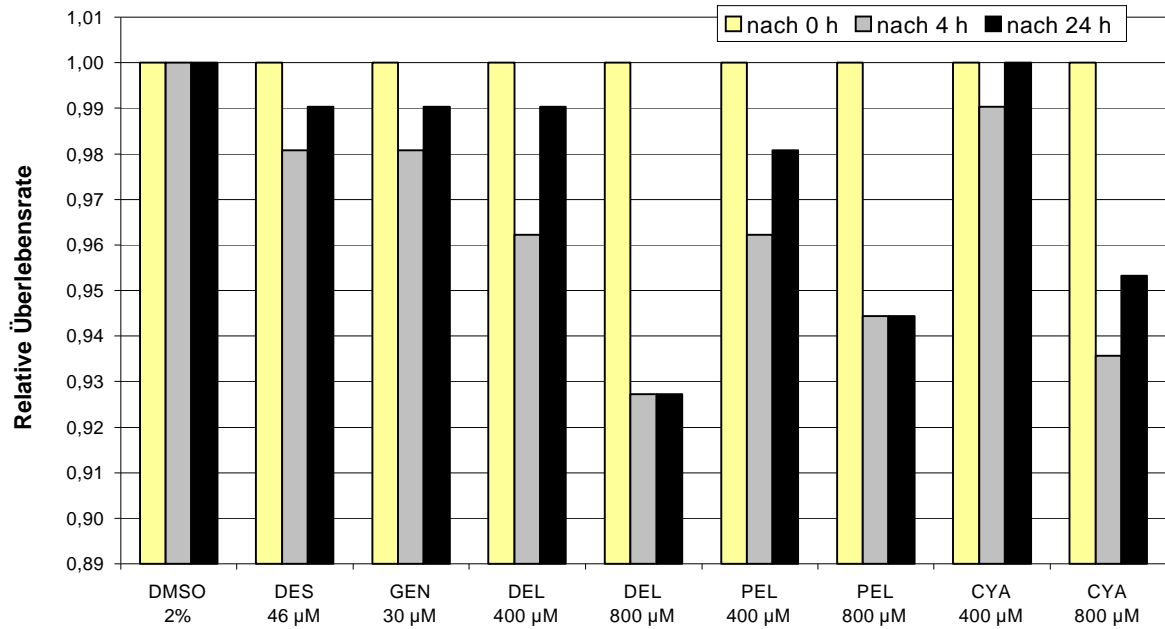


Abb. 5.47: Graphische Darstellung der relativen Zellüberlebensrate von L5178Y

Feststellung		lebend / tot	DMSO 2%	DES 46 µM	GEN 30 µM	DEL 400 µM	DEL 800 µM	PEL 400 µM	PEL 800 µM	CYA 400 µM	CYA 800 µM
ohne Cytochalasin B											
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		0	0	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		2	4	4	6	10	6	8	3	9
nach 24 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		2	3	3	3	10	4	8	2	7
mit Cytochalasin B											
nach 0 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		0	0	0	0	0	0	0	0	0
nach 4 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		2	4	4	6	10	6	8	3	9
nach 24 h	lebend		100	100	100	100	100	100	100	100	100
	tot		4	4	4	6	12	5	11	5	10

Tab. 5.70: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.10.1.3. Anteil mehrkerniger Zellen

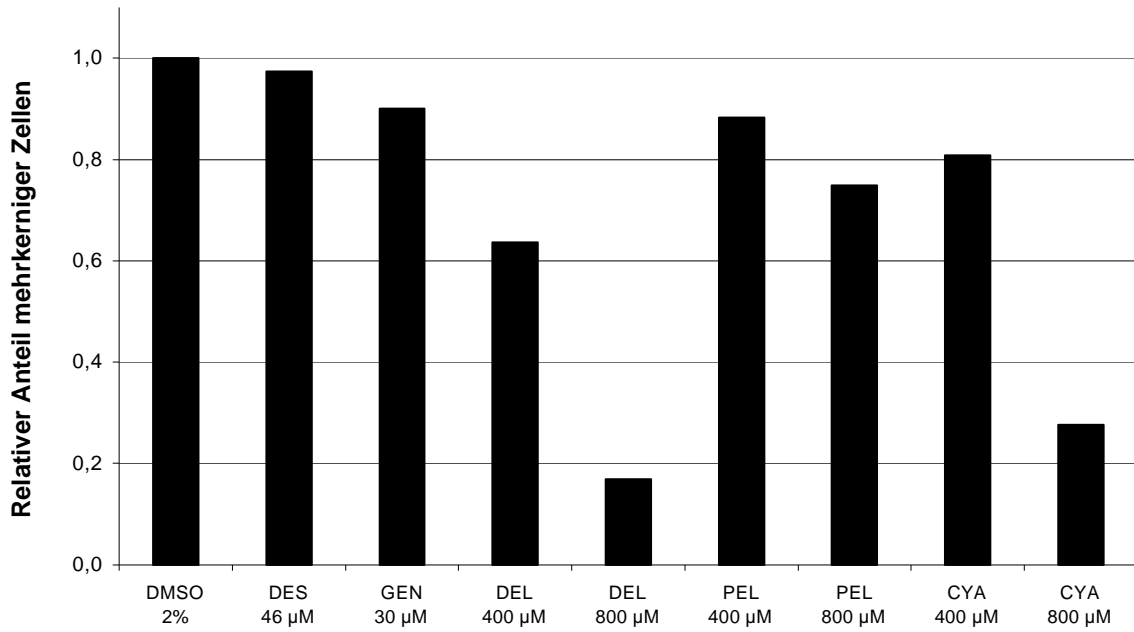


Abb.5.48: Graphische Darstellung des relativen Anteils mehrkerniger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	mit Cytochalasin B						
		Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time						
Anzahl Mikrokerne		1 Kern	2 Kerne				3 Kerne und mehr	
			0	1	2	3	4	
DMSO 2%	130 µl	157	1.755	49	1	0	0	111
DES 46 µM	130 µl	221	1.652	67	1	0	0	258
GEN 30 µM	130 µl	377	1.479	264	47	15	6	57
DEL 400 µM	130 µl	833	1.131	28	0	0	0	29
DEL 800 µM	130 µl	1.465	266	4	0	0	0	0
PEL 400 µM	130 µl	378	1.566	45	0	0	0	59
PEL 800 µM	130 µl	362	794	16	0	0	0	5
CYA 400 µM	130 µl	515	1.445	38	0	0	0	35
CYA 800 µM	130 µl	960	315	12	0	0	0	2

Tab. 5.71: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.10.2. Gentoxisches Potential von Antocyanen

5.10.2.1. Anteil mikrokernhaltiger Zellen

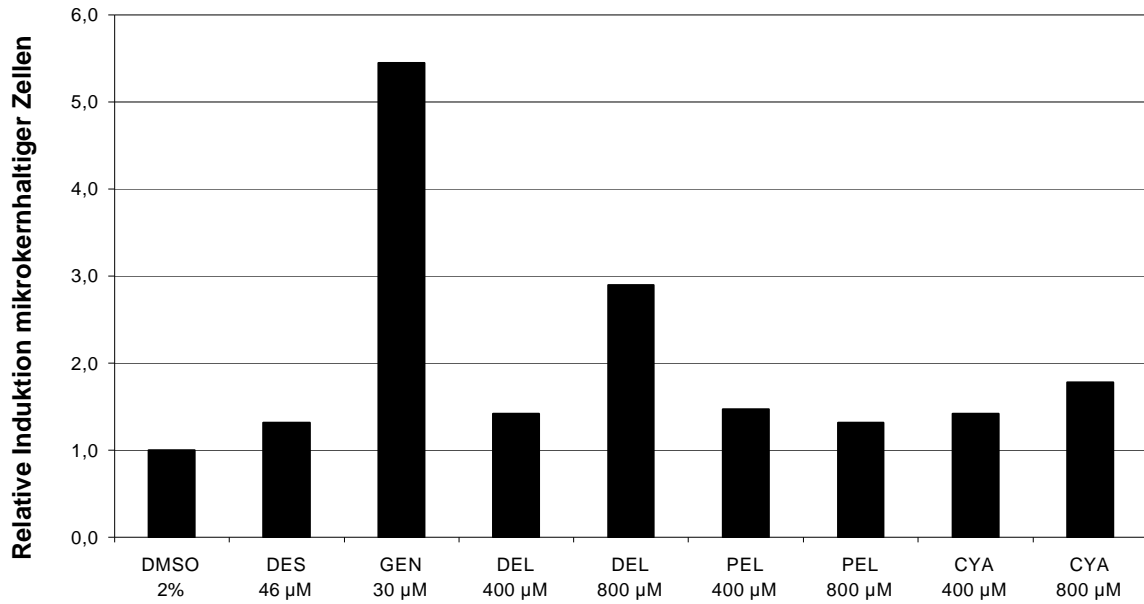


Abb. 5.49: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger L5178Y

Substanz	Fixations Volumen	ohne Cytochalasin B									
		Mikrokerne nach 5 Stunden Recovery Time					Mikrokerne nach 20 Stunden Recovery Time				
		n.a.					n.a.				
Anzahl Mikrokerne →		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
DMSO 2%	130 µl	2.000	18	0	0	0	2.000	19	0	0	0
DES 46 µM	130 µl	2.000	37	0	0	0	2.000	25	0	0	0
GEN 30 µM	130 µl	2.000	47	2	0	0	2.000	104	3	1	0
DEL 400 µM	130 µl	2.000	14	0	0	0	2.000	27	0	0	0
DEL 800 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	50	5	1	0
PEL 400 µM	130 µl	2.000	13	0	0	0	2.000	28	0	0	0
PEL 800 µM	130 µl	2.000	12	0	0	0	2.000	25	0	0	0
CYA 400 µM	130 µl	2.000	17	0	0	0	2.000	27	0	0	0
CYA 800 µM	130 µl	2.000	11	0	0	0	2.000	34	0	0	0

Tab. 5.72: Tabellarische Darstellung der Messergebnisse

5.10.2.2. Anteil mikrokernhaltiger doppelkerniger Zellen

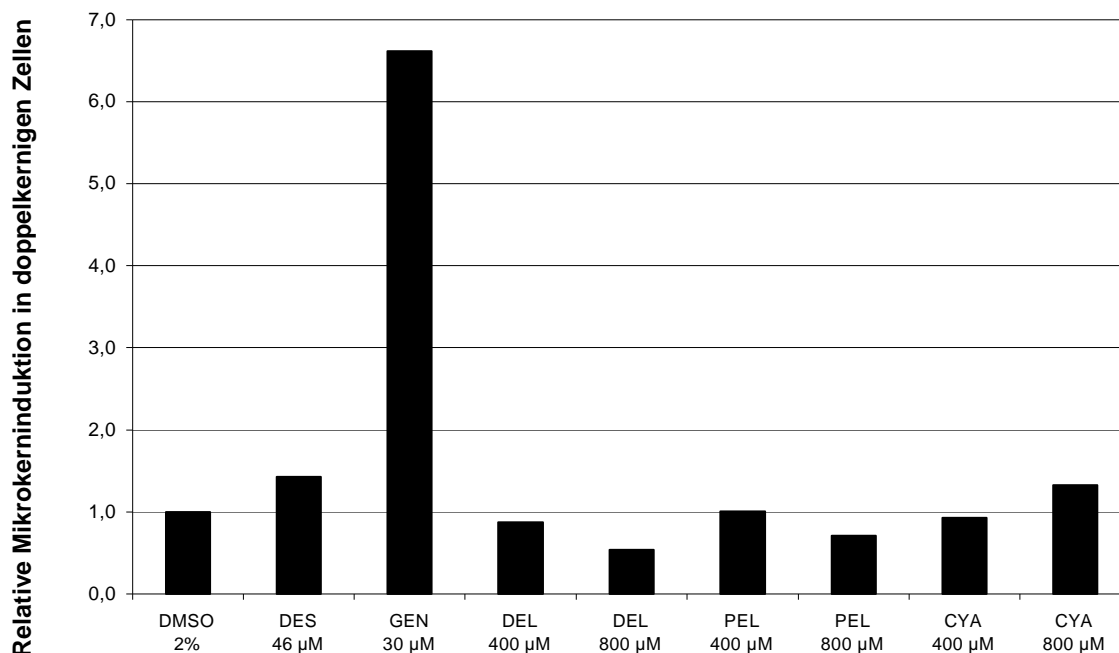


Abb. 5.50: Graphische Darstellung des relativen Anteils mikrokernhaltiger doppelkerniger L5178Y

5.10.3. Erläuterungen und Testergebnisse

Delphinidin- (DEL), Pelargonidin- (PEL) und Cyanidin-Chlorid (CYA) wurden jeweils in den hohen Konzentrationen von 400 µM und 800 µM im direkten Vergleich untersucht. Die **graphischen Darstellungen** zeigen jeweils die Relativwerte in Bezug auf die Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Als Kontrollsubstanzen dienen Diethylstilbestrol (DES) und Genistein (GEN). Zur **tabellarischen Darstellung** (Tab. 5.69 – 5.72) kommen die absoluten Messergebnisse aus dem zur Testsubstanz durchgeführten Versuch.

Die Ergebnisse lassen sich anhand der graphischen Darstellungen zusammengefasst wie folgt kommentieren:

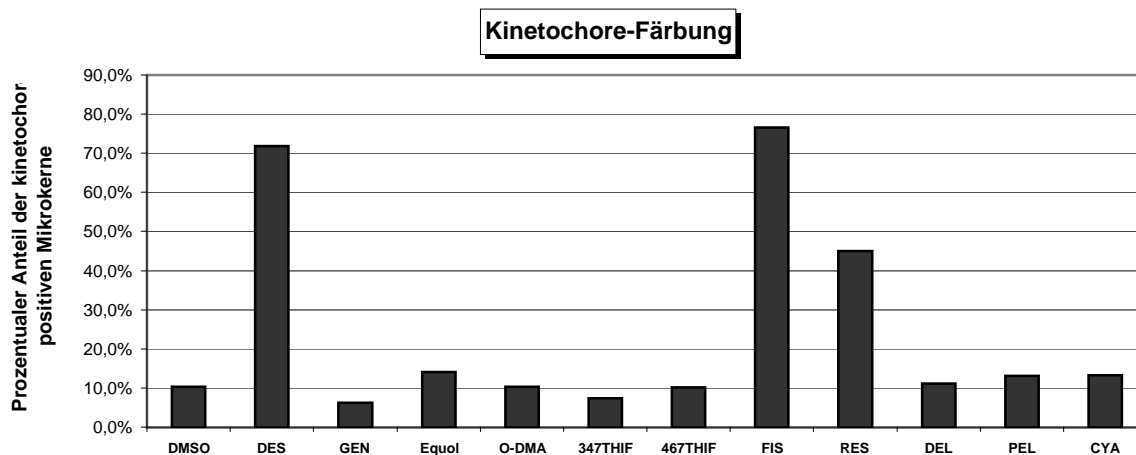
In den **Toxizitätstests** konnte für die Antocyane bei hohen Konzentrationen von 800 µM und nach 20-stündiger Recovery-Zeit im Proliferations-Experiment (Abb. 5.46) eine generelle relative Wachstumsinhibition um mehr als 60% im Vergleich zur Lösemittelkontrolle detektiert werden. Bei der Bestimmung der Zellvitalität (Abb. 5.47) konnte auch in den Hochdosisbereichen kein nennenswerter relativer zytotoxischer Effekt der Testsubstanzen festgestellt werden. Die Bestimmung des relativen Anteils mehrkerniger Zellen (Abb. 5.48)

zeigte bei den hohen Konzentrationen von 800 μM deutliche relative Einschränkungen der Teilungsaktivität für Delphinidin- und Cyanidin-Chlorid auf Werte um unter 30% im Vergleich zur Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Pelargonidin-Chlorid verursachte bei 800 μM nur geringere Inhibition auf Werte um 80%.

Die **Gentoxizitätstests** zeigten bei hohen Konzentrationen von 800 μM mögliches gentoxisches Potential der Antocyane. Bei der Bestimmung des relativen Anteils mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 5.49) wurde generell eine relative Erhöhung der Mikrokernfrequenz gefunden. Diese Befunde waren für Delphinidin- und Cyanidin-Chlorid deutlich stärker ausgeprägt als für Pelargonidin-Chlorid. Bei der Bestimmung der relativen Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen (Abb. 5.50) konnte möglicherweise durch die Überlagerung durch zytotoxische Effekte bei einer Konzentration von 800 μM generell keine klare relative Mikrokerninduktion in Bezug auf die Lösemittelkontrolle nach 20-stündiger Recovery-Time detektiert werden.

5.11. Immunfluoreszenzdetektion von Kinetochoren

5.11.1. Graphischer Überblick



Bestimmung des **Prozentanteils Kinetochore-positiver Mikrokerne**. Zur Auswertung werden nach Doppelfärbung der fixierten Präparate mit Crest-Serum/FITC-konjugiertem Human-IgG und Bisbenzimid versuchsübergreifend nur Konzentrationen zur Auswertung herangezogen, die Mikrokerninduktion zeigen. DMSO, DES und GEN dienen als Kontrollsubstanzen.

DES und Fisetin zeigen aneugenes Wirkprofil (>70% Kinetochore-positiv Mikrokerne), Resveratrol zeigt deutlich aneugenes Potential und die anderen Substanzen sind klastogen.

5.11.2. Wertetabelle

Substanz / Metabolit		Konzentration in µM	Mikrokerne			
			Gesamt	negativ	positiv	positiv in %
Andruck in Diagramm			davon →			
Dimethylsulfoxid	DMSO	1%	213	191	22	10,3%
Diethylstilbestrol	DES	46	227	64	163	71,8%
Genistein	GEN	30	257	241	16	6,2%
Equol	Equol	50	51	45	6	14,0%
		75	29	24	5	
		100	127	109	18	
O-Desmethylangolensin	O-DMA	0,1	1	0	1	10,3%
		1	19	18	1	
		10	188	168	20	
		20	54	49	5	
3,4,7-Trihydroxyisoflavone	347THIF	10	20	17	3	7,3%
		50	31	28	3	
		75	23	23	0	
		100	144	134	10	
4,6,7-Trihydroxyisoflavone	467THIF	75	4	4	0	10,2%
		100	231	207	24	
Fisetin	FIS	10	31	7	24	76,6%
		20	87	23	64	
		40	52	11	41	
		50	35	7	28	
Resveratrol	RES	Einzel-Meßergebnisse liegen nicht vor				45,0%
Delphinidin	DEL	400	206	183	23	11,2%
Pelargonidin	PEL	100	11	9	2	13,2%
		400	194	169	25	
Cyanidin	CYA	400	203	176	27	13,3%

VI. Diskussion

6.1. Testsysteme

Zur Prüfung von Phytohormonen mit östrogenem Potential stehen verschiedene in-vitro und in-vivo Methoden zur Verfügung. Diese sind unterschiedlich aufwendig und besitzen verschiedene Empfindlichkeiten und Aussagekraft. Zwar lassen sich erst mit Kenndaten aus der in-vivo Forschung genaue Risikovorhersagen treffen, aber zur Durchführung eines Screenings oder für die Aufschlüsselung von Wirkmechanismen ist die in-vitro Forschung das Mittel der Wahl. Da letzteres die Aufgabe dieser Arbeit war wurde die Überprüfung des toxischen und genotoxischen Potentials von Phytohormonen oder deren Metaboliten ausschließlich mit in-vitro Untersuchungen an Mauslymphomzellen (Typ: L5178Y) durchgeführt.

Die Mauslymphomzellen eigneten sich durch leichte Kultivierung und gute Handhabung bei der Auswertung ausgezeichnet für die durchgeführten Untersuchungen. Es wurde aber eine gewisse Schwankung in der natürlichen Proliferationsrate festgestellt, was zum Beispiel auf eine endogene Wachstumsperiodik oder auf die Exposition mit eventuell stattgefundenen klimatischen Veränderungen während der Verarbeitung erklärt werden könnte. Die unter diesen Bedingungen möglicherweise fehlende Sensitivität der Genotoxizitätstests, deren unabdingbare Voraussetzung die Zellteilung ist, wurde durch Versuche mit Cytochalasin B umgangen. Außerdem konnte eine Fehldeutung des schlechten Wachstums als Zeichen von Toxizität durch Vergleich mit den Kontrollen verhindert werden.

Die Mauslymphomzellen wurden in einem Phenolrot-haltigen Medium kultiviert. Diese Substanz wird dem Medium zur Überprüfung des pH-Wertes zugesetzt und besitzt selbst östrogene Wirkung (Berthois et al., 1986). Durch diese Substanz kann in estrogenrezeptorpositiven Zellen ein Proliferationsreiz gesetzt werden, der ihr selbst ein potentiell genotoxisches Potential durch Erhöhung der Zellteilungsaktivität und damit verknüpfter genomischer Instabilität verleiht. So konnte zum Beispiel in einer Arbeit von Fischer et al. (2001) gezeigt werden, daß ein Proliferationsstimulus durch natürliches Östrogen zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Mikrokerffrequenz in humanen Brusttumorzellen (MCF-7) führt. Diese Befunde konnten auch an anderen Zelllinien wie zum Beispiel der Ovarialtumorzelllinie BG-1 reproduziert werden. Da diese Effekte jedoch hormonrezeptorvermittelt sind und die in dieser Arbeit verwendeten Mauslymphomzellen diesen Rezeptor nicht exprimieren konnte kein phytohormoninduzierter Proliferationsreiz festgestellt werden und gewonnene Daten von genotoxischer Aktivität der

untersuchten Substanzen auch mit hinreichender Sicherheit auf diese ursächlich zurückgeführt werden.

Die verwendeten Testsysteme können heute, wie eine Vielzahl von Veröffentlichungen belegen, als Standardmethoden auf dem Gebiet des Screenings von Substanzen bezüglich Toxizität und Gentoxizität bezeichnet werden. So stellt der hier verwendete Mikrokerntest ein sensitives Verfahren dar, mit dem relativ leicht ein Nachweis von genomischer Schädigung erbracht werden kann, wobei die Mikrokerninduktion als gentoxischer Endpunkt genutzt wird (Stopper und Müller, 1997). Ein weiterer Vorteil dieses Testsystems zum Beispiel gegenüber dem Ames-Test, der auf dem in-vitro Nachweis von Genmutationen in Bakterien beruht, liegt darin, daß auch aneugene und klastogene DNA-Schädigungen, sowie generelle Funktionschäden im Mitosezyklus, die zur Bildung von Mikrokernen führen, nachgewiesen werden können. Die Kenntnis des Inhaltes von Mikrokernen ist ein entscheidender Schritt auf dem Weg der Entschlüsselung der Entstehung von Mikrokernen. Die Erfassung der relativen Größe eines Mikrokernes bezüglich der Kerngröße ist abhängig von der chromosomalen Verteilung, der Phase des Zellzyklusses während der Analyse und besonders davon, ob ganze Chromosomen oder nur Fragmente enthalten sind (Nüsse et al., 1992; Högstädt und Karlsson, 1985). So führen, entsprechend dem Schädigungsmechanismus und der daraus resultierenden Größe der anfallenden Chromatinfragmente, stabilitätsmindernde (z.B. alkylierende) Substanzen zu kleinen, Topoisomerase II-Inhibitoren zu mittelgroßen und Spindelgifte (z.B. Vinblastin) zu großen Mikrokernen. Allerdings kann die Bildung von vielen kleinen Chromatinfragmenten im Hochdosisbereich zu Mikrokerngrößen führen, die nicht mit dem Mechanismus der Schädigung übereinstimmen müssen, wenn mehrere Fragmente in einem Mikrokern enthalten sind. Deshalb wurden zur Unterscheidung von aneugenen und klastogenem Potential in dieser Arbeit eine Kinetochorfärbung durchgeführt, die aufgrund immunfluoreszierender Signale erkennen läßt, ob Zentromerbereiche, die Kinetochorproteine an der Spindelanheftungsstelle aufweisen, aufgrund der Dislokation eines ganzen Chromosoms/Chromatide oder der zentromerischen Region nach DNA-Bruch im Mikrokern vorhanden ist. Eine hohe Anzahl positiver Signale (70-90%) läßt auf aneugene Wirkung schließen (Antoccia et al., 1991). Die Immunfärbung der Kinetochore mit humanen Crest-Serum konnte nach anfänglichen Schwierigkeiten durch Optimierung der Testbedingungen auch an den Mauslymphomzellen durchgeführt werden. Obwohl das Serum ursprünglich für den Gebrauch an menschlichen Zellen gedacht war konnte es, aufgrund der hoch konservierten und weitgehend übereinstimmenden Sequenz dieses Proteins, auch zur Analyse der Mikrokernkerne in den in

dieser Arbeit verwendeten Mauszellen herangezogen werden.

Um die gewonnenen Daten miteinander vergleichen zu können und zur Überprüfung eines regelhaften Versuchsverlaufes wurden bei jeder Versuchsreihe Ansätze mitgezogen, die mit Kontrollsubstanzen inkubiert wurden. Bei diesen Kontrollsubstanzen wurde auf die Substanzen Dimethylsulfoxid zur „Leerwertbestimmung“ und auf die Substanzen Diethylstilböstrol und Genistein als „Positivkontrollen“ zurückgegriffen. Genistein zeigte sehr starke Induktion von Mikrokernen, was Literaturbefunden entspricht (Kulling und Metzler, 1997; Boos und Stopper, 2000). Ergänzend sei hier noch vermerkt, daß das Isoflavon Genistein aufgrund seiner Vielzahl an zellulären Effekten, wie zum Beispiel Hemmung der Topoisomerase II (Boos und Stopper, 2000) oder der Induktion des für die DNA-Reparatur und Apoptose entscheidenden Gens p53, derzeit vielfach Gegenstand intensiver Forschung ist.

6.2. Testsubstanzen und Ergebnisse

Aus der Gruppe der Isoflavone wurden neben dem Genistein, welches als Positiv-Kontrollsubstanz verwendet wurde, Metaboliten der Substanzen Daidzein und Glycetein (Hauptisoflavone der Sojapflanze) untersucht, um eine verbesserte Bewertung des Risikos des Menschen gegenüber der Inkorporation von Isoflavonen zu ermöglichen. Daidzein wird in der Literatur als nicht gentoxische Substanz beschrieben (Metzler et al., 1998; Kulling et al., 2002; Kulling et al., 1999; Pool-Zobel et al., 2000; Boos und Stopper, 2000), wie zum Beispiel auch Versuche in V79 Hamster Fibroblasten Zellen belegen (Metzler et al., 1998). Für Glycetein lassen erste Versuche bezüglich einer möglichen gentoxischen Wirkung ebenfalls fehlende Mikrokerninduktion bis hin zur Löslichkeitsgrenze erkennen (Stopper et al., 2002). Die unterschiedliche Wirkung dieser Substanzen im Vergleich zum Genistein läßt vermuten, daß der Hydroxyfunktion in 5-Position des Genistein einen entscheidenden Faktor für das gentoxische Potential darstellen könnte und vermutlich auch der Grund für die im Vergleich zu Daidzein schnellere Umwandlung durch Bakterien im Gastrointestinaltrakt ist (De Boever et al., 2000). In dieser Arbeit wurden nun die isolierten reduktiven Daidzein-Metaboliten Equol und O-Desmethylangolensin (reduktive Metabolisierung des Daidzeins) auf ihr gentoxisches Potential im in-vitro Mikrokernstest in Mauslymphomzellen L5178Y getestet. Die Metaboliten wurden bis zur Löslichkeitsgrenze (Equol 100µM) und Zytotoxizität (O-DMA 25µM) eingesetzt und hier zeigten beide Metaboliten im Gegensatz zu den Ausgangssubstanzen eine Induktion von Mikrokernen. Equol bewirkte im höchsten Konzentrationsbereich eine Verdopplung der

Mikrokernrate gegenüber der Lösungsmittelkontrolle, was zwar als signifikant aber als schwache genotoxische Wirkung beurteilt werden muß, weil der Metabolit O-DMA eine erheblich höhere Induktion von Mikrokernen sogar bei niedrigeren eingesetzten Konzentrationen zeigte. Zusammenfassend muß das genotoxische Potential von O-DMA als schwächer als das von Genistein, aber um ein vielfaches stärker als das von Equol erachtet werden. Die für Genistein und O-DMA gemeinsame Struktur mit der Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe in 5-Position und der Carbonylfunktion der C3-Einheit und der daraus resultierenden Aktivierung des aromatischen Ringsystems für oxidative Prozesse bzw. die ähnliche Struktur des O-DMA zu den genotoxisch aktiven Stilbenderivaten Resveratrol und Diethylstilböstrol stellen mögliche strukturelle und mechanistische Erklärungen der beobachteten Genotoxizität dar (McGregor und Jurd, 1978; Epe et al., 1986). Bei den bis zur zytotoxischen Grenze untersuchten Metaboliten 4,6,7- und 3,4,7-Trihydroxyisoflavon (oxidativer Metabolismus des Daidzins), konnte ebenfalls eine starke Induktion von Mikrokernen festgestellt werden. Es lässt sich also feststellen, daß die Aufnahme von Sojaprodukten in-vivo zur Bildung von potentiell genotoxischen Substanzen führt. Die geschätzte Plasmakonzentration von Equol und O-DMA von bis zu 1µM und möglicher stärkerer Anreicherung in bestimmten Geweben (Watanabe et al., 1998) lässt erkennen, dass der Unterschied zwischen erreichbarer in-vivo Konzentration im Körper und bereits genotoxischer in-vitro Konzentration nur den Faktor 10 oder weniger beträgt. Trotzdem ist es unwahrscheinlich, dass die freien Metaboliten im Körper nach Aufnahme von Sojaprodukten eine so hohe Konzentration erreichen, dass mit adversen Effekten gerechnet werden muß, da sie im Körper normalerweise sehr rasch an Glucuronsäure oder Sulfat gekoppelt werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Isoflavone zeigten bei Analyse der Mikrokern in der Crest-Färbung keine Chromosomendislokation, was auf einen klastogenen Wirkmechanismus bei der DNA-Schädigung schließen läßt.

Klastogene Entstehung von Mikrokernen kann zum Beispiel durch Inhibierung der Topoisomeras II erfolgen. Hierbei handelt es sich um ein Enzym von größter Wichtigkeit für eine Vielzahl zelluläre Prozesse, die eine Modulierung der DNA erfordern, wie zum Beispiel Transkription, Replikation oder Mitose. Dabei ist dieses Enzym für den geordneten Doppelstrangbruch mit anschließender korrekter Versiegelung bei der Relaxation der „DNA-Supercoil“ verantwortlich (Osheroff et al., 1991; Hsieh, 1992; Nitiss, 1994; Wang, 1996). Topoisomerase II-Hemmer sind aus diesem Grund eine wichtige Grundlage bei der Entwicklung neuer Chemotherapiestrategien bei der Bekämpfung von Krebs (Belani et al., 1994;

Hande, 1998). Möglicherweise wird die Kondensation des Chromatins in der G2-Phase oder die Chromatidenseparation in der Anaphase gestört, was zur Ausbildung von DNA-Brücken führen kann (Downes et al., 1991, Gaulden, 1987). Diese Brücken führen während der Mitose zu Aberrationen und Fragmenten, die ein Grund für die Entstehung von Mikrokernen sein können. Effekte nach derartiger Schädigung treten schon bei der ersten Mitose nach Exposition auf (Kirchner et al., 1995; Müller et al., 1996; Stopper et al., 1993). Festzustellen ist also neben einer antiproliferativen Wirkung bei mitosenreichen Prozessen, wie Krebs, die durch diesen Mechanismus unter anderem auch für Isoflavone (Genistein) vorgeschlagen wurde (Barnes et al., 1995; Stoll, 1997), eine eigenständige genotoxische Aktivität, die nach vollzogener Chemotherapie eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Sekundärtumoren sein kann (Sandoval et al., 1993; Smith et al., 1994). Bei Substanzen, die die DNA direkt schädigen dauert die Entwicklung von klastogenen Effekten länger, da die DNA-Modifikation und – Fragmentation, welche zur Bildung von Mikrokernen führen, abhängig von gewissen zellulären Aktivitäten ist und deshalb einige Zellzyklusphasen in Anspruch nehmen kann (Fenech und Neville, 1992; Preston und Gooch, 1981). Die Häufigkeit und die Latenzzeit des Auftretens von Mikrokernen wird wie Versuche mit der Inhibierung von Reparaturenzymen belegen auf komplexe Weise von diesen beeinflusst (Fenech und Neville, 1992; Weirich-Schwaiger et al., 1994). Aneugenes Entstehen von Mikrokernen, wie es in dieser Arbeit für Diethylstilböstrol bestätigt und für das Flavon Fisetin gefunden wurde, läßt sich auf eine Störung eines Teils der „Mitosemaschinerie“ also letztlich des Spindelapparates zurückführen. Verschiedene Östrogen derivative sind für das Auftreten von kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen an das Spindelprotein Tubulin bekannt (Epe et al., 1990). Dies könnte zu einer gestörten Tubulinaggregation und zu Spindelapparatdysfunktion führen. Enthalten Mikrokerne ganze Chromosomen, so könnte dies auf diesen Mechanismus zurückgeführt werden (Stopper et al., 1994). Eine Dysfunktion des Kinetochor-Proteinkomplexes kann ebenso zu aneugenem Effekten führen. Solche Chromosomen können bei der Immunfärbung zu schwachen oder fehlenden Signalen in Mikrokernen führen (Hando et al., 1994), was eventuell zu einer Unschärfe in der Testauswertung führen kann.

Ergänzend sei erwähnt, daß die Bildung von Mikrokernen nicht generell als nachteilig für den betroffenen Organismus bewertet werden darf. So existieren Studien, die in ihrer Entstehung auch eine Möglichkeit für die Zelle sehen, genetischen Schaden zu entfernen (Von-Hoff et al., 1992).

Aus der Gruppe der Flavone wurde die Substanz Fisetin untersucht. Es gilt als belegt, daß Flavone keine potenten gentoxischen Substanzen (Carver et al., 1983; Van de Hoeven et al., 1984; Rueff et al., 1986; Popp und Schimmer, 1991), keine potenten Karzinogene (Pamukcu et al., 1980; Saito et al., 1980; morino et al., 1982) sind und im Gegenteil sogar für einige Substanzen antimutagene, antipromovierende und antikarzinogene Wirkung gefunden wurde (Huang et al., 1983; Nishino et al., 1983; Nixon et al., 1984). Dem chemoprotektiven Charakter des Fisetin könnte eine transkriptionale Induktion von bestimmten detoxifizierenden Phase II-Enzymen (z.B. Oxidoreduktasen) zugrundeliegen, welche Mutagenese und Tumorbildung verhindern (Hou et al., 2001). Die Beeinflussung von Enzymaktivitäten durch Flavone mag in ihrer Wirkung als Tyrosinaseinhibitoren, die auf der Fähigkeit der Ausbildung von Chelatbindungen mit Kupfer bei freier 3-Hydroxylgruppe beruht, ihre Begründung finden (Kubo et al., 2000). In den Befunden dieser Arbeit wurde in Konzentrationen bis über die zytotoxische Grenze (40-50 µM) hinaus für Fisetin keine signifikante Induktion von Mikrokerneln gefunden. Die Immunfärbung zeigte ähnlich dem Diethylstilböstrol ein aneuges Verteilungsbild, was seine Erklärung möglicherweise in einer Unterdrückung der spontanen Mikrokernelnbildung durch Fisetin finden kann. Die untersuchten Mikrokerne wären somit auf eine genetische Schädigung zurückzuführen, ohne daß sich die Mikrokernelnrate an sich erhöht. Möglicherweise entsteht der beobachtete Befund auch aus einem veränderten Spektrum spontaner Mikrokernelnbildung. Wie bereits oben erwähnt, würde eine Zelle ohne spontane Mikrokernelnbildung der Möglichkeit beraubt sein, genetischen Schaden zu eliminieren. Tatsächlich wird einigen Substanzen aus der Gruppe der Flavone in der Literatur ein gentoxisches Potential zugesprochen. Es wurde eine Abhängigkeit der gentoxischen Potenz von Faktoren, wie pH-Wert, der Anwesenheit von Antioxidantien oder der metabolischen Situation festgestellt. Als potentiell gentoxisch werden hierbei Substanzen beschrieben, die im leicht alkalischen Milieu, wie es zum Beispiel im Darmtrakt zu finden ist, einer Autooxidation unterliegen können. Dies sind Flavone, die eine freie Hydroxylgruppe an Position 3 des C-Rings, eine freie Hydroxylgruppe an Position 7 des A- oder des B-Ringes haben oder eine Catechol- oder Pyrogallol-Struktur (primär oder nach metabolischer Umwandlung) besitzen (Silva et al., 2000). Unter Berücksichtigung dieser Ausführungen scheint es erforderlich, den Mechanismus und die Bedingungen der biologischen Effekte von Flavonen weiter zu untersuchen, bevor man ihren Einsatz als therapeutische Substanzen erwägt.

Aus der Gruppe der Stilbene wurde das Phytoalexin und Pflanzenpigment Resveratrol untersucht. Viel Interesse erweckte diese Substanz, weil sie als Bestandteil im Wein aufgrund ihrer

antioxidativen Wirkung den Begriff des „French Paradoxon“ prägte (Wang et al., 1997; Turner et al., 1999; El Attar et al., 1999). Resveratrol zeigt in Proliferationsversuchen an humanen Zelllinien ein dosisabhängiges, biphasisches Verhalten (Mgbonyebi et al., 1998; Lu et al., 1999). Eine mögliche Ursache für die Inhibierung der Zellproliferation kann in gentoxischen Mechanismen vermutet werden, weshalb diese Substanz in dieser Arbeit der Gentoxizitätsprüfung an L5178Y-Zellen unterzogen worden ist. Eine konzentrationsabhängige Induktion von Mikrokernen konnte festgestellt werden. Da die Struktur des Resveratrol der des synthetischen Stilbenderivates Diethylstilböstrol, das in dieser Arbeit als Kontrollsubstanz Verwendung fand, sehr verwandt ist, läge die Vermutung nahe, daß auch im Mechanismus der Mikrokernentstehung Ähnlichkeit oder gar Übereinstimmung besteht. DES (>70% Kinetochor-positive Mikrokerne) wurde in dieser Arbeit konsistent zu den in der Literatur verfügbaren Daten in der Immun-Kinetochor-Färbung als aneugene Substanz eingestuft. Bei der Immun-Kinetochor-Färbung konnte in einer Arbeit von Schmitt (2000) in etwa der Hälfte der Mikrokerne ein positives Signal detektiert werden. Dies würde bedeuten, daß Resveratrol sowohl mitosestörende, aneugene Wirkung (>70% kinetochorpositive Mikrokerne) als auch chromosomenbrechende, klastogene Wirkung (<20% kinetochorpositive Mikrokerne) aufweist, was Ergebnisse aus Arbeiten von Pfeiffer et al. (1997) unterstützen. Nach bisherigen Studien werden Plasmakonzentrationen an Resveratrol, bei denen gentoxische Wirkungen bei in-vitro Versuchen auftraten in-vivo nicht erreicht. Dennoch muß die akute Aufnahme dieser Substanz in hohen Konzentrationen kritisch hinterfragt werden, da die erreichbare Plasmakonzentration dann nur um den Faktor 10 bis 100 unter den gentoxischen Konzentrationen liegt und kumulative Effekte in bestimmten Gewebetypen (Herz und Niere) beobachtet wurden (Bertelli et al., 1996).

Aufgrund ihrer weiten Verbreitung in Pflanzen und Lebensmitteln und der daraus resultierenden hohen Expositionsrate des Menschen wurden die drei Vertreter der Substanzgruppe der Anthocyane untersucht. Aufgrund eines identischen Biosyntheseweges der Anthocyane, Isoflavone und Flavone und daraus resultierenden verwandten Molekülstrukturen (Peterson und Dwyer, 1997) lag die Hypothese nahe, daß die Anthocyane ein ähnliches Wirkspektrum aufweisen. In Versuchen von Schmitt (2002) wurde für die in dieser Arbeit getesteten Substanzgruppen für die Anthocyane die größte Reduzierung der Östradiol induzierten Proliferationssteigerung erzielt. Dies ließ vermuten, daß antiöstrogene Eigenschaften bei dieser Substanz im Vordergrund stehen und es wurde die Hypothese aufgestellt, daß dies die Basis der chemoprotektive Wirkung der über die Nahrung aufgenommenen Anthocyane im Hinblick

auf hormoninduzierte Krebsarten darstellt. Ein weiterer möglicher Mechanismus der präventiven Wirkung könnte die Inhibierung der Tyrosinkinaseaktivität des Epidermal-growth-Rezeptors mit Blockierung der weiteren Signalkaskade sein. Delphinidin und Cyanidin wurden durch diesen Mechanismus als potente Hemmer des Wachstums humaner Tumorzellen in der in-vitro Forschung identifiziert (Meiers et al., 2001). Delphinidin wurde fernerhin als Hemmer von Metalloproteasen entlarvt, welche bei der Tumordinvasion in gesundes Gewebe durch Zersetzung der Basalmembranen benötigt werden, was sich möglicherweise bei der Bekämpfung des Krebsleidens günstig auswirken wird (Nagase et al., 1998). Bezüglich genotoxischer Wirkung konnte in vorliegender Arbeit keine signifikante Induktion von Mikrokerneln festgestellt werden was die in der Literatur beschriebene antikarzinogene Wirkung der Anthocyane unterstreicht.

Die bisherige Vorstellung der hormonabhängigen Kanzerogenese geht von einem Mechanismus aus, bei dem nach der Entstehung eines genotoxischen Schadens (Initiation) durch die promovierende Wirkung der Hormonstimulation die veränderte Zelle einen Wachstumsvorteil erhält (Promotion) und im Laufe der Zeit durch weitere genetische Veränderungen einen malignen Tumor bilden kann (Progression). Zellteilung (Proliferation) fördert nach bisheriger Kenntnis die Kanzerogenese, indem sie die Anfälligkeit der DNA gegenüber mutagener Einwirkung erhöht. Eine in Teilung befindliche Zelle hat ein wesentlich höheres Risiko, durch ein Mutagen (exogener oder endogener Natur) verändert zu werden, als eine nicht in Teilung befindliche (ruhende) Zelle. Daher gelten Wirkstoffe, die eine chronische Zellteilung bewirken indirekt mutagen und im allgemeinen kanzerogen (Dekant und Vamvakas, 1995; Forth et al., 1992). Die in neueren Arbeiten gewonnenen Befunde induzieren die Hypothese, daß die Proliferationsstimulation für sich allein schon zu einem genotoxischen Schaden führen kann (Fischer et al., 2001). Dies könnte durch verkürzte Zeit der DNA-Reparatur und schlechtere Funktion der Zellzyklus-Checkpoints erklärbar sein. Der initiierte Schaden würde im weiteren Verlauf über promovierende Wirkung eine Krebsentstehung (Progression) ermöglichen. Vor diesem Gesichtspunkt müßte auch die Genotoxizität von Phytohormonen oder deren Metaboliten mit östrogenem oder antiöstrogenem Potential diskutiert werden. Da nämlich in dieser Arbeit die Tests lediglich in Mauslymphomzellen erfolgten, die metabolisch träge und anders als zum Beispiel humane Zellsysteme hormoninsensitiv sind, müssen die gewonnenen Daten in weiteren Studien bezüglich der geschilderten Problematik weiter abgeklärt werden, da gefolgert werden muß, daß mitogene Substanzen in den hier verwendeten Testsystemen nicht auf ihr eigentliches genotoxisches Potential getestet werden konnten.

Abschließend ist festzustellen, daß der hemmungslose Gebrauch von Phytohormonen mit agonistischer östrogenen Wirkung ein genotoxisches Potential entwickeln können, indem sie die Proliferation hormonsensitiver Zellen fördern. Im Gegensatz dazu werden Substanzen mit antiöstrogenen Wirkung als chemoprotektiv diskutiert, da die Wirkung des endogenen 17- β -Östradiol herabgesetzt wird. Vorsicht ist fernerhin geboten, weil Daten dieser Arbeit auch Genotoxizität von Substanzen oder Metaboliten belegen, die nicht durch die hormonelle Proliferationssteigerung zu erklären sind, also eine direkte DNA-Schädigung belegen. Beachtung, gerade vor dem Hintergrund einer Extrapolation der Risikoabschätzung des Phytohormonkonsums für den Menschen, muß die Beobachtung und Analyse adverser Effekte von Substanzmetaboliten finden. So konnte am Beispiel der Isoflavone gezeigt werden, daß die Kenntnis vom Substanzmetabolismus unabdingbare Voraussetzung für eine Risikoeinstufung von Substanzen ist, und in-vitro Ergebnisse nie isoliert betrachtet, sondern immer durch Daten aus der in-vivo Forschung verifiziert werden müssen. Dringender Forschungsbedarf besteht derzeit auch vor dem Hintergrund, daß Säuglinge, die mit Sojaaustauschnahrung bei Kuhmilchunverträglichkeit ernährt werden eine 10-fach höhere Exposition mit Isoflavonen erhalten, als das für Erwachsene, die sich mit normaler Sojanahrung ernähren, der Fall ist (Zimmerli und Schlatter, 1997; Franke et al., 1998). Die Plasmakonzentrationen solcher Kinder liegen im Bereich der auftretenden genotoxischen und östrogenen Effekte. Untersuchungen an solchen Kindern bezüglich Reproduktionsstörungen und genotoxischen Effekten, wie Mikrokerninduktion in Lymphozyten, wären gute Ansatzpunkte zur Beurteilung der Wirkungen von Phytohormonen bzw. deren Metaboliten auf den humanen Organismus von Kleinkindern. Solche sind bislang aber nicht durchgeführt oder publiziert worden.

Abschließend ist festzustellen, daß der hemmungslose Gebrauch von Phytohormonen mit agonistischer östrogenen Wirkung ein genotoxisches Potential entwickeln können, indem sie die Proliferation hormonsensitiver Zellen fördern. Im Gegensatz dazu werden Substanzen mit antiöstrogenen Wirkung als chemoprotektiv diskutiert, da die Wirkung des endogenen 17- β -Östradiol herabgesetzt wird. Vorsicht ist fernerhin geboten, weil Daten dieser Arbeit auch Genotoxizität von Substanzen oder Metaboliten belegen, die nicht durch die hormonelle Proliferationssteigerung zu erklären sind, also eine direkte DNA-Schädigung belegen. Beachtung, gerade vor dem Hintergrund einer Extrapolation der Risikoabschätzung des Phytohormonkonsums für den Menschen, muß die Beobachtung und Analyse adverser Effekte von Substanzmetaboliten finden. So konnte am Beispiel der Isoflavone gezeigt werden, daß die Kenntnis vom Substanzmetabolismus unabdingbare Voraussetzung für eine Risikoeinstufung von Substanzen ist, und in-vitro Ergebnisse nie isoliert betrachtet, sondern immer durch Daten aus der in-vivo Forschung verifiziert werden müssen. Dringender Forschungsbedarf besteht derzeit auch vor dem Hintergrund, daß Säuglinge, die mit Sojaaustauschnahrung bei Kuhmilchunverträglichkeit ernährt werden eine 10-fach höhere Exposition mit Isoflavonen erhalten, als das für Erwachsene, die sich mit normaler Sojanahrung ernähren, der Fall ist (Zimmerli und Schlatter, 1997; Franke et al., 1998). Die Plasmakonzentrationen solcher Kinder liegen im Bereich der auftretenden genotoxischen und östrogenen Effekte. Untersuchungen an solchen Kindern bezüglich Reproduktionsstörungen und genotoxischen Effekten, wie Mikrokerninduktion in Lymphozyten, wären gute Ansatzpunkte zur Beurteilung der Wirkungen von Phytohormonen bzw. deren Metaboliten auf den humanen Organismus von Kleinkindern. Solche sind bislang aber nicht durchgeführt oder publiziert worden.

VII. Zusammenfassung

Die Wahrscheinlichkeit des Eintritts eines Gesundheitsschadens nach der Exposition gegen einen Stoff bezeichnet man als Risiko. Dieses ist abhängig von der aufgenommenen Dosis und der dem Stoff eigenen Wirkungsstärke. Bezogen auf die Phytohormone wurde deshalb eine gesundheitsgefährdende Wirkung aufgrund zu geringer Dosis lange Zeit ausgeschlossen. Epidemiologische Studien über Sojakonsum und reduziertes Brustkrebsrisiko (Wu et al., 1998; Zheng et al., 1999; Messina, 1999; Bouker und Hilakivi-Clarke, 2000) in asiatischen Ländern führten dazu, daß in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie Produkte auf Sojabasis vermehrt produziert wurden und auch ein deutlicher Anstieg beim Verbrauch anderer Pflanzen mit Phytoöstrogenen beobachtet werden konnte (Franke et al., 1998; Bouker und Hilakivi-Clarke, 2000). In Bezug auf die postmenopausale Hormonersatztherapie sollen Extrakte aus phytohormonhaltigen Pflanzen den Frauen auf „natürliche“ Art und Weise über Störungen und Beschwerden hinweghelfen (Schweinsberg und Rettenmeier, 2000; Gilbert, 2000; Ginsburg und Prelevic, 2000), weil in vielen Studien eine östrogene Aktivität der Phytohormone (zum Beispiel der Isoflavone) belegt wurde (Whitten und Patisaul, 2001). Obwohl die intrinsische hormonale Aktivität der Phytohormone um den Faktor 100 bis 1000 schwächer als die von körpereigenen 17β -Estradiol ist, kann bei Aufnahme großer Mengen an Phytohormonen eine durchaus wirksame Konzentration im Plasma und im Gewebe erreicht werden. Kommerziell verfügbare Sojaprodukte können deshalb einen wirksamen Ersatz bei reduzierten Plasmaspiegeln an endogenen Östrogenen bei menopausalen Frauen bieten. Als Nebeneffekt sollte zudem, wie aus epidemiologischen Studien bekannt ist, das Risiko, an hormonell abhängigen Krebs zu erkranken, reduziert werden (Adlercreutz et al., 1993; Musey et al., 1995; Washam, 2000). Obwohl die bisherige Datenlage keinen kausalen Zusammenhang zwischen Erkrankungen und hoher Aufnahme von Phytoöstrogenen beim Menschen zuläßt (Wu et al., 1998; Setchell, 1998) wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl an in-vitro als auch in-vivo Forschungsergebnissen veröffentlicht, die eindeutig mutagenes und somit kanzerogenes Potential einiger dieser Substanzen belegen. Zu beachten ist weiterhin, daß die Datenlage zur Zeit auch dahingehend noch nicht suffizient ist, was den intestinalen Metabolismus der Phytohormone angeht. So muß eine sich in der in-vitro-Forschung scheinbar inert verhaltende Substanz noch lange nicht ungefährlich sein, da man unter diesen Bedingungen das Wirkungsspektrum möglicher Metabolite nicht mit abzuklären in der Lage ist. Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß eine Nahrungszusammenstellung mit einem hohen Anteil an pflanzlicher Nahrung ein nicht zu verachtender Faktor bei der Prävention von Krebserkrankungen ist aber durchaus Vorsicht beim Gebrauch von hochdosierten Phytohormonpräparaten, zum

Beispiel in Form von Konzentraten, geboten ist.

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurden Substanzen mehrerer Gruppen von Phytohormonen mit östrogenem Potential auf ihre toxische und genotoxische Wirksamkeit überprüft. Dazu wurden in-vitro Testsysteme verwendet, die sich dadurch auszeichnen, daß man eine große Probenzahl (Screening) untersuchen kann sowie auch mechanistische Erkenntnisse erhalten kann. Sämtliche Versuche wurden mit Mauslymphomzellen des Typs L5178Y durchgeführt und jede Substanz wurde in zwei von einander unabhängigen Versuchsdurchläufen überprüft und die Auswertung erfolgte jeweils gegen die in jedem Versuchsdurchlauf als Positivkontrollen mitgeführten Substanzen DES (Diethylstilböstrol) und GEN (Genistein). Die Testsubstanzen wurden in Konzentrationen entweder bis zur Löslichkeitsgrenze oder bis zum Auftreten starker zytotoxischer Effekte bestimmt.

Die toxische Wirkung von Substanzen wurde durch drei verschiedene Testformen überprüft. Zunächst wurde im Rahmen von Proliferationsexperimenten Testsubstanzkonzentrationsabhängige Wachstumskurven der Zellen erstellt und damit überprüft, ob ein Einfluß auf die Zellreplikationsrate vorliegt. Parallel dazu wurde durch Hemmung der Zytokinese durch Zugabe von Cytochalasin B der Anteil an mehrkernigen Zellen nach Testsubstanz-konzentrationsabhängiger Inkubation und 20-stündiger Recovery-Inkubation bestimmt. Hat eine Substanz zelltoxische Wirkung, so wird sie die Proliferationsrate senken, was wiederum mit einem Abfall des Anteils mehrkerniger Zellen detektiert werden konnte. Als drittes Kriterium zur Erfassung der Toxizität wurde ein Zellvitalitätstest nach der Ethidiumbromid-Flouresceindiacetat-Methode durchgeführt. Mit seiner Hilfe konnte durch systematische Entnahme von Zellproben während der Testsubstanz-konzentrationsabhängigen Inkubation und bei der Recovery-Inkubation durch schnelles und einfaches Auswerten unter dem Floureszenzmikroskop ein zelltoxischer Effekt durch Störung der Integrität der Zellmembran oder durch Inaktivierung zellphysiologischer Enzyme sofort erkannt werden.

Die genotoxische Wirkung von Substanzen wurde durch zwei verschiedene Testformen überprüft. Zunächst wurde der gut etablierte in-vitro Mikrokerntest angewandt, der als gutes Maß zur Detektion von Genotoxizität bekannt ist und in vielen Arbeiten Anwendung findet (Stopper et al., 1993; Möller et al., 1995; Eckert und Stopper, 1996; Pfeiffer et al., 1997; Kulling und Metzler, 1997; Boos und Stopper, 2000). Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert. Nach 5- und nach 20-stündiger Recovery-Inkubation wurden jeweils Zellproben nach entsprechender Aufbereitung unter dem Floureszenzmikroskop auf die Induktion von Mikrokernen untersucht. Hierbei stellte sich das Prob-

lem, daß bei der Untersuchung von Zellen in zelltoxischen Konzentrationen diese sich nicht mehr teilen. Da für die Induktion von Mikrokernen eine regelrechte Zytokinese aber unabdingbare Voraussetzung ist, lief man in diesen Fällen Gefahr, falsch-negative Ergebnisse zu erhalten. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Mikrokerntest um die Methode mit Cytochalasin B erweitert. Durch die Inhibierung der Zytokinese und anschließender Auswertung der Mikrokernelinduktion nur in doppelkernigen, also vitalen und teilungsaktiven Zellen konnte genanntes Problem umgangen werden. Um genauere Erkenntnis über den möglichen Entstehungsmechanismus der Mikrokerne zu erlangen wurde als zweite Testform für die Genotoxizität der indirekte Immunfluoreszenznachweis von Kinetochorproteinen durchgeführt. Dazu wurden Zellpräparate, die nach 20-stündiger Recovery-Inkubation der Zellen hergestellt wurden einer Doppelfärbung mit Bisbenzimid und Antikörpern unterzogen und die Mikrokerne anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Kinetochor-Signale untersucht. Somit kann ein Hinweis auf aneugene oder klastogene Wirksamkeit der zu testenden Substanz erfolgen.

Aus der Gruppe der Isoflavone, die unter den pflanzlichen östrogen aktiven Substanzen die wichtigste Gruppe darstellt, wurden die beiden reduktiven Metaboliten der Substanz Daidzein, Equol und O-Desmethylangolensin (O-DMA) sowie die oxidativen Metaboliten der Substanz Daidzein, 3,4,7- und 4,6,7-Trihydroxyisoflavon untersucht. Genistein wurde als Kontrollsubstanz bei allen Versuchsreihen mitgezogen und seine toxischen als auch genotoxischen Effekte, die bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben wurden, konnten auch in dieser Arbeit klar belegt werden. Obwohl für Daidzein in anderen Studien keine Genotoxizität nachgewiesen werden konnte, wurde in dieser Arbeit im Bereich von 10 bis 50 μM genotoxische Aktivität seiner reduktiven Metaboliten nachgewiesen, wobei O-DMA die stärkere Wirkung aufwies. Auch für die beiden oxidativen Metaboliten konnte im Gegensatz zur Ausgangssubstanz deutliche genotoxische Aktivität im Bereich von 50 bis 100 μM festgestellt werden. Die Ergebnisse der Immunfärbung deuteten auf eine klastogen induzierte genomische Instabilität als Entstehungsmechanismus der Mikrokerne für genannte Substanzen hin.

Aus der Gruppe der Flavone wurde die Substanz Fisetin untersucht. Den Flavonen wird, bestätigt durch diverse Studien, chemoprotektive, antikarzinogene und antigentoxische (für eine Auswahl an Substanzen) Eigenschaften zugesprochen (Formica und Regelson, 1995; Harborne und Williams, 2000; Ferguson, 2001; Suolinna et al., 1975; Wiltrout und Hornung, 1988; Wargovich et al., 1985). Fisetin zeigte in einer Studie von Hardigree und Epler (1978) mutagene Aktivität im Ames Test. In dieser Arbeit konnte keine Induktion von Mikrokernen durch Fisetin festgestellt werden. Erstaunlicherweise bot sich aber bei der Analyse der Mikrokerne

nach der Immunfärbung ein Bild nach aneugem Muster. Möglicherweise resultiert dieses aus einem veränderten Spektrum spontaner Mikrokernbildung. Hier besteht weiterhin Forschungsbedarf.

Aus der Gruppe der Stilbene wurde die Substanz Resveratrol untersucht. Resveratrol ist ein Phytoalexin und kommt überwiegend in Weintrauben vor. Es handelt sich strukturell gesehen um ein Polyphenol und ist unter anderem auch als Pflanzenfarbstoff für ein weites Spektrum von blau bis rot verantwortlich. In den veröffentlichten Studien wurde sich viel mit der chemopräventiven Eigenschaft dieser Substanz aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaft befaßt (Cadenas und Barja, 1999; Lin und Tsai, 1999). Bei der Analyse der Substanz in dieser Arbeit wurde Mikrokerninduktion im Konzentrationsbereich von 10 bis 100µM und aneuges Potential bei der Immunfärbung gefunden.

Aus der Gruppe der Anthocyane wurden die Substanzen Delphinidin-, Pelargonidin- und Cyanidin-Chlorid untersucht. Diese im Pflanzenreich weit verbreiteten Substanzen werden häufig von der Industrie als natürliche Farbstoffe oder als aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung als Konservierungsstoffe. Blutplasmaspiegel dieser Substanzen von 10µM sind in westlichen Ländern möglich, bei einer geschätzten täglichen Aufnahme von 0,5 bis 1g (Sriram et al., 1998). Anthocyane werden nach heutigem Stand der Forschung als mögliche antigenotoxische und antikanzerogenetische Substanzen gesehen (Heo und Sohn, 2001; Gasirowski et al., 2001; Takahashi et al., 2001). In den Untersuchungen vorliegender Arbeit wurde keine genotoxische Aktivität in Form von Mikrokerninduktion bis hin zu toxischen Konzentrationen von 400 bis 800µM gefunden. Die nähere Analyse der Mikrokerne ergab auch keinen Anhaltspunkt für die Induktion einer genomischen Instabilität.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen die Datenlage zur Phytohormonforschung und helfen, eine Datengrundlage zu schaffen, aufgrund derer zukünftig eine bessere Risikoabschätzung zur Belastung mit hormonell aktiven Substanzen möglich sein wird. Die gewonnenen Daten zur Gentoxizität deuten darauf hin, daß erste adverse Effekte im Bereich der erreichbaren Plasmakonzentrationen liegen, so daß eine übertriebene Aufnahme von Phytohormonprodukten als kritisch erachtet und weiterer Forschungsbedarf festgestellt werden muß, insbesondere weil die in-vivo Datenlage bezüglich Langzeiteffekten heute noch unzureichend ist.

VIII. Literaturverzeichnis

- Adami HO**, Persson I, Ekblom A, Wolk A, Ponten J, Trichopoulos D, (1995), The aetiology and pathogenesis of human breast cancer, *Mutation Res.*, 333, 29-35
- Adlercreutz H.**, Markkanen H., Watanabe S., (1993) Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men *Lancet*, **342**, 1209 - 1210.
- Antoccia A.**, Degrassi F., Battistoni A., Ciliutti P., Tanzarella C., (1991), In vitro micronucleus test with kinetochore staining; evaluation of test performance, *Mutagenesis*, 6, 319-324
- Auger J.**, Kunstmann JM., Czyglik F., Jouannet P., (1995) Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years *N. Engl. J. Med.*, **332**, 281 - 285.
- Bannwart C.**, Adlercreutz H., Fotsis T., Wähälä K., Hase T., Brunow G., (1984) Identification of O-desmethylangolensin, a metabolite of daidzein, and of matairesinol *Finnish Chemistry Letters*, **4**, 120 - 125.
- Barnes S.**, Peterson GT, Coward L, (1995), Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer, *J.Cell.Biochem*, 22(Suppl.), 181-187
- Barret JC**, (1993), Mechanism of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment, *Environ. Health Perspect.*, 100, 9-20
- Belani CP**, Doyle LA, Aisner J., (1994), Etoposide: current status and future perspectives in the management of malignant neoplasms, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 34(Suppl.), 118-126
- Berg C.**, Hallidin K., Brunström B., Brandt I., (1998) Methods for studying xenoestrogenic effects in birds *Toxicology Letters*, **102**, 671 - 676.
- Bertelli A.**, (2001) Mit Wein gegen Alzheimer und Parkinson *Die Winzer - Zeitschrift*, **2**, 15.
- Bertelli A.A.E.**, Giovanini L., Stradi R., Bertelli A., Tillement J-P., (1996) Plasma, Urine and Tissue Levels of Trans- and cis-resveratrol (3,4', 5'-Trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats *Int. J. Tiss. Reac.*, **18**, 67 -
- Bertelli A.A.E.**, Giovanini L., Stradi R., Tillement J-P., Urien S., Bertelli A., (1996) Kinetics of Trans- and cis-Resveratrol (3, 4', 5-Trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, **16**, 77 - 81.
- Berthois Y.**, Katzenellenbogen JA., Katzenellenbogen BS., (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture *Proc. Natl. Acad. Science USA.*, **83**, 2496 - 2500.
- Bjeldans L.F.**, Chong G.W., (1977), *Science*, 197, 577-578
- Bold H.**, (1978) Deutsche Forschungsgemeinschaft Farbstoffe für Lebensmittel, Harald Bold Verlag, Boppard ISBN 3764617063.
- Bolton JL**, Pisha E, Zhang F, Qiu S, (1998), Role of quinoids in estrogen carcinogenesis, *Chem.Res.Toxicol.*, 11(10), 1113-27
- Boos G.**, Stopper H., (2000) Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors *Toxicology Letters*, **116**, 7 - 16.
- Bouker KB.**, Hilakivi-Clarke L., (2000) Genistein: Does it prevent or promote breast cancer? *Environmental Health Persp.*, **108**, 701 - 708.
- Breinholt V.**, Larsen J. C., (1998), Detection of weak estrogenic flavanoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF-7 cell proliferation assay *Chemical Research of Toxicology*, **11**, 622 - 629.
- Burda S.**, Oleszek W., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774-2779

- Cadenas S.**, Barja G., (1999) Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃ *Free Radical Biol. Med.*, **26**, 1531 - 1537.
- Calabrese G.**, (1999) Nonalcoholic compounds of wine: the phytoestrogen resveratrol and moderate red wine consumption during menopause *Drugs Exp. Clin. Res.*, **25**, 111 - 114.
- Cantos E.**, Garcia-Viguera C., Pascual-Teresa S., Tomas-Barberan F., (2000) Effect of Postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4606 - 4612.
- Carlsen E.**, Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N., (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years *Br. Med. J.*, **305**, 609 - 613.
- Carver JH**, Carrano AV, Mac Gregor JT, (1983) Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol and galangin on Chinese hamster ovary cells in vitro, *Mutation Research*, 113, 45-60
- Celotti E.**, Ferraini R., Zironi R., Conte L., (1996) Resveratrol content of some wines obtained from dried valpolicella grapes: Recioto and Amarone *J. of Chromatography A.*, **730**, 47 - 52.
- Chun YJ**, Kim MY, Guengerich FP, (1999) Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 20 - 24.
- Ciolino HP**, Yeh GC, (1999) Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity *Mol. Pharmacology*, **56**, 784 - 790.
- Circulation**, 2002, 105: 2962-2967
- Combes RD.**, Stopper H., Caspary WJ., (1995) The use of L5178Y mouse lymphoma cells to assess the mutagenic, clastogenic and aneugenic properties of chemicals *Mutagenesis*, **10**, 403 - 408.
- Crapo L.**, (1985), Hormone, Die chemischen Boten des Körpers, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- DÄ, Deutsches Ärzteblatt**, Jg.100, Hefte 40 und 46, 2003
- De Boever P.**, Deplancke B., Verstraete W., (2000) Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soy germ powder *J. Nutrition*, **130**, 2599 - 2606.
- Dekant W.**, Vamvakas S., (1995), Toxikologie für Chemiker und Biologen, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Del Rio J.A.**, Benavente - Garcia O., Castillo J., Morin F.R., (1997) Uses and properties of citrus flavanoids *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, **45**, 4505 - 4515.
- Doerge DR.**, Chang HC., Churchwell MI., Holder CL., (2000) Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry *Drug Metabolism and Disposition*, **28**, 298 - 307.
- Eckert I.**, Stopper H., (1996) Genotoxic effects induced by beta-oestradiol in vitro *Toxicology in vitro*, **10**, 637 - 642.
- El Attar T.**, Virji A., (1999) The effects of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells *Anticancer Research*, **19**, 5407 - 5414.
- Elledge SJ**, (1996), Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis, *Science*, 274(5293), 1664-72
- Epe B.**, Harting U., Stopper H., Metzler M., (1990), Covalent binding of reactive estrogen metabolites to microtubular protein as a possible mechanism of aneuploidy induction and neoplastic cell transformation, *Environmental Health Perspectives*, 88, 123-27

- Epe B.**, Schiffmann D., Metzler M., (1986) Possible role of oxygen radicals in cell transformation by diethylstilbestrol and related compounds *Carcinogenesis*, **7**, 1329 - 1334.
- Fenech M.**, Neville S., (1992), Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **19**, 27-36
- Ferguson L.R.**, (2001), *Mutat.Res.*, **475**, 89-111
- Fischer WH.**, Keiwan A., Schmitt E., Stopper H.; (2001) Increased Formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells *Mutagenesis*, **16**, 209 - 212.
- Formica J.V.**, Regelson W., (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids *Food and Chemistry Toxicology*, **33**, 1061 - 1080.
- Forth W.**, Henschler D., Rummel W., Starke K. (hrsg), (1992) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, BI-Wissenschafts - Verlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- Franke A.**, Custer L., Tanaka Y., (1998) Isoflavones in human breast milk and other biological fluids *American Journal of Clinical Nutrition*, **68**, 1466 - 73.
- Gasirowski K.**, Brokos B., Kulma A., Ogorzalek A., Skorkowska K., (2001), *Cell Mol. Biol. Letters*, **6**, 649-675
- Gaulden M.E.**, (1987), Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerase II and peripheral proteins) to produce chromosome stickiness, *Mutagenesis*, **2**, 357-365
- Ginsburg J.**, Prelevic GM., (2000) lack of significant hormonal effects and controlled trials of phytoestrogens *Lancet*, **355**, 163 - 164.
- Hanawalt P.**, Sarasin A., (1986), Cancer-prone hereditary diseases with DNA-processing abnormalities, *Trends Genet.*, **2**, 124-129
- Hande K.R.**, (1998), Clinical applications of anti cancer drugs targeted to topoisomerase II, *Biochem. Biophys. Acta* **1400**, 173-184
- Hando JC**, Nath J, Tucker JD, (1994), Sex chromosomes, micronuclei and aging in women, *Chromosoma*, **103**, 186-192
- Harborne J.B.**, Williams C.A., (2000), *Phytochemistry*, **55**, 481-504
- Hardigree A.A.**, Epler J.L., (1978), *Mutat. Res.*, **58**, 231-239
- Hartwell LH**, Kastan MB, (1994), Cell cycle control and cancer, *Science*, **266**(5192), 1821-8
- Henderson BE**, Ross RK, Pike MC, Casagrande JT, (1982), Endogenous hormones as a major factor in human cancer, *Cancer Res.*, **42**(8), 3232-9
- Heo MY**, Sohn SJ, Au WW, (2001), *Mutat. Res.*, **488**, 135-150
- Heo MY**, Yu KS, Kim KH, Kim HP, Au WW, (1992), Anticlastogenic effect of flavonoids against mutagen-induced micronuclei in mice, *Mutation Research*, **284** (1992) 243-249
- Högstedt B.**, Karlson A., (1985), The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used, *Mutation Res.*, **156**; 229-232
- Hou DX**, Fukuda M., Johnson JA, Miyamori K., Ushikai M., Fujii m., (2001), Fisetin induces transcription of NADPH:quinone oxidoreductase gene through an antioxidant responsive element-involved activation, *Int J Oncol* **2001 Jun**;18(6):1175-9
- Hsieh T.S.**, (1992), DNA topoisomerases, *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 396-400
- Huang MT**, Wood AW, Newmark HL, Sayer JM, Yagi H, Jerina DM, Conney AH, (1983), Inhibition of the mutagenicity of bay region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant flavonoids, *Carcinogenesis*, **4**, 1631-1637

- Izumi T.**, Piskula MK., Obata A., Saito M., Kubota Y., Kikuchi M., (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans *J. of Nutrition*, **130**, 1695 - 1699.
- JAMA**, 2002; 288:321-333
- Jang M.**, Cai L., Udeani GO., Moon RC., Kinghorn AD., Pezzuto JM, (1997) Cancer Chemopreventive activity of Resveratrol, a natural product derived from grapes *Science*, **275**, 218 - 220.
- Kanner J.**, Frankel E., Granit R., German B., Kinsella J.E., (1994) Natural antioxidants in grapes and wines *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, **42**, 64 - 69.
- Key TJ**, (1995), Hormones and cancer in humans, *Mut Res.*, **333** (1-2), 59-67
- Key TJ**, (1999), Serum oestradiol and breast cancer risk, *Endocr.Relat.Cancer*, **6**(2), 175-80
- King RA.**, (1998) Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats *Am. J. Clin. Nutrition*, **68**, 1496S - 1499S.
- King RA.**, Bursill DB., (1998) Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein und genistein after a single soy meal in humans *Am. J. Clin. Nutrition*, **67**, 867 - 872.
- Kleine-Gunk B.**, (2000), Phytoöstrogene: Die sanfte Alternative während der Wechseljahre, Trias Verlag, Stuttgart.
- Kuiper G.**, Lemmen G., Carlson B., Safe S., (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β *Endocrinology*, **139**, 4252 - 4263.
- Kulling S.E.**, Honig D.M., Simat T.J., Metzler M.,(2000), Oxidative in vitro metabolism of the phytoestrogens daidzein and genistein, *J.Agric.Food Chem.*,**48**, 4963-4972
- Kulling S.E.**, Honig D.M., Metzler M.,(2001), Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in-vitro and in-vivo, *J.Agric. Food Chem.* **49**, 3024-3033
- Kulling S.E.**, Jakobs E., Pfeiffer E., Metzler M., (1998), *Mutat.Res.*, **416**, 115-124
- Kulling SE.**, Metzler M., (1997) Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol *Food. Chem. Toxicol.*, **35**, 605 - 613.
- Kulling SE.**, Lehmann L., Metzler M., (2002) Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens, *J. Chromatogr.B.Analyt.Technol. Biomed. LifeSci.***777**, 211-218
- Kulling SE.**, Rosenberg B., Jacobs E., Metzler M., (1999), The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes, *Arch.Toxicol.*, **73**, 50-54
- Kubo I.**, Kinst-Hori I., Chaudhuri SK., Kubo Y., Sanchez Y., Ogura T., (2000), Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria, *Bioorg Med Chem* 2000 Jul; **8**(7):1749-55
- Lampe JW.**, Karr SC., Hutchins AM., Slavin JL., (1998) Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **217**, 335 - 339.
- Lancet**, 2003; 363: 419-427
- Lapidot J.**, Harel S., Akiri B., Granit R., Kanner J., (1999) pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, **47**, 67 - 70.
- Lapidot T.**, Harel S., Granit R., Kanner J., (1998) Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4297 - 4302.
- Lee SK**, Mbwambo ZH, Chung H, Luyengi L, Gamez EJ, Metha RG, Kinghorn AD, Pezzuto JM, (1998) Evaluation of the antioxidant potential of natural products *Comb. Chem. High. Throughput Screen*, **1**, 35 - 46.

- Lin JK**, Tsai SH, (1999) Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol *Proc. Natl. Science Counc. Repub. China B*, **23**, 99 - 106.
- Lopez-Otin C**, Diamandis EP, (1998), Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic and biochemical features, *Endocr.Rev.*, 19(4), 365-96
- Lu R.**, Serrero G., (1999) Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits th growth of human breast cancer cells *J. Cell Physiol.*, **179**, 297 - 304.
- Lüllmann H.**, Mohr K., *Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme Verlag, 14.Auflage, 1999
- MacGregor JT.**, Jurd L., (1978) Mutagenicity of plant flavanoids: structural requirements for mutagenic activity in Salmonella typhimurium *Mutation Research*, **54**, 297 - 309.
- Macholz R.**, Lewerenz H-J.(Hrsg), (1989) *Lebensmitteltoxikologie*, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Martinez J**, Moreno JJ, (2000) Effect of Resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production *Biochemical Pharmacology*, **59**, 865 - 870.
- Matsuoka A.**, Furuta A., Ozaki M., Fukuhara K., Miyata N., (2001) Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line *Mutation Research*, **494**, 107 - 113.
- Matthews HB.**, Lucier GW., Fisher KD., (1999) Medicinal herbs in the United States: Research Needs *Environmental Health Persp.*, **107**, 773 - 778.
- Mattivi F.**, (1993) Solid phase extraction of trans - resveratrol from wines for HPLC analysis *Z. Lebensm. Untersuchung und Forschung*, **196**, 522 - 525.
- Meiers S.**, Kemeny M., Weyand U., Gastpar R., von Angerer E., Marko D., (2001) The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor, *J Agric Food Chem* 2001 Feb;49(2):958-62
- Messina M.J.**, (1999), *Am. J. Clin. Nutrition*, 70, 439S-450S
- Messina M.J.**, Persky V., Setchell K.D.R., Barnes S., (1994) Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data *Nutrition and Cancer*, **21**, 113 - 131.
- Metzler M.**, Kulling SE., Pfeiffer E., (1998) *Hormonally active agents in food*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 62 - 71.
- Metzler M.**, Vieths S., (1998) *Lebensmittelchemie: Hormonwirksame Substanzen Nachrichten Chem. Tech. Lab.*, **46**, 319 - 322.
- Mgbonyebi O.**, Russo J., Russo I., (1998) Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells *Int. J. Oncol.*, **12**, 865 - 869.
- Mitchell KA**, Markham KR, Boase MR, (1998) Pigment chemistry and colour of Pelargonium flowers *Phytochemistry*, **47**, 355 - 361.
- Mitchell SH.**, Zhu W., Young CYF., (1999) Resveratrol inhibits the Expression and function of the androgen receptor in LNCaP Prostate Cancer cells *Cancer Research*, **59**, 5892 - 5895.
- Mittelman F**, (1991), *Catalogue of chromosome aberrations in cancer*, Wiley-Liss., N.Y. 1991
- Möller M.**, Stopper H., Häring M., Schlegel Y., Epe B., Adam W., Saha-Möller CR., (1995) Genotoxicity induced by furocoumarin hydroperoxides in mammalian cells upon UVA irradiation *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, **216**, 693 - 701.
- Morino K.**, Matsukura N., Kawachi T., Ohgaki H., Sugimura T., Hirono I., (1982), Carcinogenicity test of quercetin and rutin in golden hamster by oral administration, *Carcinogenesis*, 3, 93-97

- Müller SO**, Eckert I, Lutz WK, Stopper H, (1996), Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated ?, *Mutat. Res.*, 371, 165-173
- Musey PL**, Adlercreutz H., Gould KG., Collins DC., Fotsis T., Bannwart C., Makela T., Hase T., (1995) Effect of diet on lignans and isoflavanoid phytoestrogens in chimpanzees *Life Science*, **57**, 655 - 664.
- Nishino H.**, Nagao M., Fujino H., Sugimura T., (1983), Role of flavonoids in suppressing the enhancement of phospholipid metabolism by tumor promoters, *Cancer Lett.*, 21, 1-8
- Nitiss J.L.**, (1994), Roles of DNA topoisomerases in chromosomal replication and segregation, *Adv. Pharmacol.*, 29, 103-134
- Nixon JE**, Hendricks JD, Pawlowski NE, Percera CB, Sinnhuber RO, Bailey GS, (1984), Inhibition of aflatoxin B₁ carcinogenesis in rainbow trout by flavone and indole compounds, *Carcinogenesis*, 5, 615-619
- Nowell PC**, (1976), The clonal evolution of tumor cell populations, *Science*, 194, (4260), 23-28
- Nüsse M.**, Kramer J, Miller B.M., (1992), Factors influencing the DNA content of radiation-induced micronuclei, *International Journal of Radiation Biology*, 62, 587-602
- Osheroff N.**, Zecherich EL, Gale KC, (1991), Catalytic function of DNA topoisomerase II, *BioEssays* 13, 269-275
- Osswald K.**, Becker T.W., Grimm M., Jahreis G., Pool-Zobel B.L., (2000), *Mutat.Res.*, 472, 59-70
- Pamukcu AM**, Yalciner S., Hatcher JF, Bryan GT, (1980), Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*, *Cancer Res.*, 40, 3468-3472
- Peltomaki P.**, (2001), Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer, *Hum.Mol.Genet.*, 10(7), 735-40
- Peltomaki P.**, (2001), DNA mismatch repair and cancer, *Mutat. Res.*, 488(1), 77-85
- Peterson J.**, Dwyer J., (1998) Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity *Nutrition Research*, **18**, 1995 - 2018.
- Pfeiffer E.**, Metzler M., (1997) Interference with microtubules and induction of micronuclei in vitro by various bisphenols *Mutation Research*, **390**, 21 - 31.
- Piskula MK.**, (2000) Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats *J. Nutrition*, **130**, 1766 - 1771.
- Pool-Zobel B.L.**, Adlercreutz H., Glei M., Liegibel U.M., Sittlington J., Rowland I., Wahala K., Rechkemmer G., (2000), *Toxicology Letters*, 116, 1247-1252
- Popp R.**, Schimmer O., (1991), Induction of sister chromatid exchange (SCE), polyploidy and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures, A comparative study of 19 flavonoids, *Mutation Res.*, 246, 205-213
- Preston RJ**, Gooch PC, (1981), The induction of chromosome-type aberrations in G1 by methyl methanesulphonate and 4-nitroquinoline-N-oxide and the non-requirement of an S-phase for their production, *Mutat.Res.*, 83, 395-402
- Preston-Martin S.**, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE, (1990), Increased cell division as a cause of human cancer, *Cancer Res.*, 50(23), 7415-21
- Purohit V.**, (1998) Moderate alcohol consumption and estrogen levels in postmenopausal women: a review *Journal of Alcohol Clin. Exp. Research*, **22**, 994 - 997.
- Romero - Perez A.**, Lamuela R., Waterhouse A., Torre - Boronat M., (1996) Levels of cis- and trans- Resveratrol and their glucosides in white and rose vitis vinifera wines from Spain, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2124 - 2128.

- Romero - Perez A.**, Lamuela R., Waterhouse A., Torre - Boronat M., (1996) Direct HPLC analysis of cis- and trans - Resveratrol and piceid isomers in spanish red vitis vinifera wines, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 281 - 283.
- Rosenberg L.**, Palmer JR, Miller DR., Clarke EA., Shapiro S., (1990) A case-control study of alcoholic beverage consumption and breast cancer *American Journal of Epidemiology*, **131**, 6 - 14.
- Roy D.**, Liehr JG, (1999), Estrogen, DNA damage and mutations, *Mut. Res.*, 424(1-2), 107-15
- Royer HD**, Grinstein E, Janz M, (1999), Regulation des Zellzyklus und therapeutische Implikationen, *Onkologe*, 5, 884-90
- Rueff J.**, Laires A., Borba J., Chaveca T., Gomes MI, Halpern M., (1986), Genetic toxicology of flavonoids; the role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation, SOS functions in sister-chromatide exchanges, *Mutagenesis*, 1, 179-183
- Rueff J.**, Laires A., Gaspar J., Borda M., Rodriguez A., (1992), *Mutat. Res.*, 265, 75-81
- Saito D.**, Shirai A., Matsushima T., Sugimura T., Hirono I., (1980), Test of carcinogenicity of quercetin, a widely distributed mutagen in food, *Terratogen.Carcinogen.Mutagen.*, 1, 213-221
- Sandoval C.**, Pui CH, Bowmann LC, Heaton D, Hurwitz SC, Raimondi SC, Behm FG, Head DR, (1993), Secondary acute myeloid leucemia in children previously treated with alkylated agents, intercalating topoisomerase II inhibitors, and irradiation, *J. Clin. Oncol.*, 11, 1039-1045
- Sarma AD.**, Sharma R., (1999) Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage *Phytochemistry*, **52**, 1313 - 1318.
- Scalbert A.**, Williamson G., (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols *Journal of Nutrition*, 130, 2073S - 2085S.
- Schiebler T.H.**, Junqueira, Carneiro, Histologie, Springer Verlag, 4.Auflage, 1996
- Schlumpf M.**, Lichtensteiger W., Sinkt die Fertilität?, Verlag Kind und Umwelt Band 4, 1996, ISBN 3-9520483-2-1, Zürich, Schweiz.
- Schmitt E.**, Dekant W., Stopper H., (2000) The natural phytoalexin resveratrol presents estrogenic and genotoxic potential. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **361** (Suppl.), pp R145.
- Schmitt E.**, Dekant W., Stopper H., (2001) Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitiv tissues, *Toxicology in Vitro* 15, 433-439
- Schuler M.**, Hasegawa L., Parks R., Metzler M., Eastmond DA, (1998), Dose-response studies of the induction of hyperdiploidy and polyploidy by diethylstilbestrol and 17beta-estradiol in cultured human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization, *Environ.Mol.Mutagen.*, 31(3), 263-73
- Schweikl H.**, Schmalz G., Rackebrandt K., (1998) The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salomonella typhimurium* and V79 cells *Mutation Research*, **415**, 119 - 130.
- Schweinsberg F.**, Rettenmeier AW., (2000) Die Bedeutung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe bei der Chemoprävention von Tumoren *Umweltmed. Forsch. Prax.*, **5**, 79 - 93.
- Setchell KDR.**, (1998) Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, 1333S - 1346S.
- Shah S.**, Alexander K., (2003) Hormon replacement therapy for primary and secondary protection of heart disease, *Curr Treat Options, Cardiovasc.Med.*, 5(1), 25-33
- Sharpe RM.**, Skakkebaek NE., (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, **341**, 1392 - 1395.

- Shimizu H.**, Ross RK, Bernstein L, Pike MC, Henderson BE, (1990), Serum oestrogen levels in postmenopausal women: comparison of American whites and Japanese in Japan, *Br.J.Cancer.*, 62(3), 451-3
- Silva ID**, Gaspar J., da Costa GG., Rodrigues AS., Laires A., Rueff J., (2000) Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents, *Chem Biol Interact* 2000 Jan 3;124(1):29-51
- Smith MA**, Rubinstein L, Ungerleider RS, (1994), Therapy-related acute myeloid leukaemia following treatment with epipodophyllotoxins: estimating the risk, *Med. Pediatr. Oncol.*, 23, 86-98
- Spagna G.**, Narbagallo RN., Pifferi PG., (2000) Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against *browning* *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 4619 - 4627.
- Sriram G.**, Surendranath C., Sureshkumar G.K., (1999) Kinetics of anthocyanins extraction from fresh and dried grape waste *Separation Science and Technology*, 34, 683 - 697.
- Stavric B.**, (1984), Federation Proceedings, 43, 2454-2458
- Stoll BA**, (1997), Eating to beat breast cancer: potential role for soy supplements, *Ann. Oncol.*, 8, 223-225
- Stopper H.**, Full M., Helbig R., Speit G., (1997) Micronucleus induction by neocarzinostatin and methyl methansulfonate in ionizing radiation - sensitive chinese hamster V79 cell mutants *Mutation Research*, 383, 107 - 112.
- Stopper H.**, Kirchner S., Schiffmann D., Poot M., (1994), Cell cycle disturbance in relation to micronucleus formation induced by the carcinogenic estrogen diethylstilbestrol, *Pathobiology*, 62, 180-185
- Stopper H.**, Jonas R., Schmitt E., (2002) Genotoxicity of phytoestrogens, in: E.Dopp, H.Stopper and G.Alink(Eds), *Natural and Synthetic Estrogens: Aspects of the cellular and Molecular Activity*, pp 89-101
- Stopper H.**, Körber C., Schiffmann D., Caspary WJ., (1993) Cell-Cycle dependent micronucleus formation and mitotic disturbances induced by 5-azacytidine in mammalian cells *Mutation Research*, 300, 165 - 177.
- Stopper H.**, Müller SO., (1997) Micronuclei as a biological endpoint for Genotoxicity: A Minireview *Toxicology in Vitro*, 11, 661 - 667.
- Strauss G.H.S.**, (1991) Non-random cell killing in cryopreservation: Implication for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects *Mutat. Res.*, 252, 1 - 15.
- Suolinna E.M.**, Buchsbaum R.N., Racher E., (1975) The effect of flavanoids on aerobic glucolysis and growth of tumor cells *Cancer Research*, 35, 1865 - 1872.
- Swan SH.**, Elkin EP., Fenster L., (2000) The question of Declining Sperm Density Revisited: An analysis of 101 studies published 1934 - 1996 *Environmental health Persp.*, 108, 961 - 966.
- Takahashi E.**, Marcylo T.H., Watanabe T., Nagai S., Hayatsu H., Negishi T., (2001), *Mutat.Res.*, 480, 139-145
- Tredici G**, Miloso m, Nicolini G, Galbiati S, Cavaletti G, Bertelli A, (1999) Resveratrol, map kinase and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? *Drugs Exp. Clin. Res.*, 25, 99 - 103.
- Tsutsui T.**, Maizumi H., McLachlan JA, Barret JC, (1983), Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanism in carcinogenesis, *Cancer Res.*, 43(8), 3814-21
- Turner R.**, Evans G., Zhang M., Maran A., Sibonga J., (1999) Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology*, 140, 50 - 54.

- Vachon CM.**, Kushi LH., Cerhan JR., Kuni CC., Sellers TA., (2000) Association of diet and mammographic breast density in the minnesota breast cancer family cohort *Cancer epidemiology biomarkers & prevention*, **9**, 151 - 160.
- Van der Hoeven JCM**, Bruggemann IM, Debets FMH, (1984), Genotoxicity of quercetin in cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 136, 9-21
- Von-Hoff DD**, McGill JR, Forseth BJ, Davidson KK, Bradley TPRV-DD, Wahl GM, (1992), Elimination of extrachromosomally amplified Myc genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89, 8165-8169
- Wagener C.**, *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren*, 2. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart, N.Y., 1999
- Wamhoff H.**, Richardt G., Schneider V., Tulke A., (1998) Wein und *Gesundheit Chemie in unserer Zeit* (Suppl.), **32**, 87 - 93.
- Wang H.**, Cao G., Prior R.L., (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, **45**, 304 - 309.
- Wang JC**, (1996), DNA topoisomerases, *Ann. Rev. Biochem.*, 65, 635-692
- Wargowich M.J.**, Eng V.W., Newmark I.L., (1985), *Food and Chemical Toxicology*, 23, 47-49
- Watanabe S.**, Yamaguchi M., Sobue T., Takahashi T., Mazur W., Wähälä K., Adlerkreutz H., (1998) Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urin and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako) *J. Nutrition*, **128**, 1710 - 1715.
- Weirich-Schwaiger H.**, Weirich H.G., Gruber B., Schweiger M., Hirsch-Kaufmann M., (1994), Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes, *Mutat.Res.*, 316, 37-48
- Wheeler WJ**, Cherry LM, Downs T, Hsu TC, (1986), Mitotic inhibition and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in chinese hamster cells in vitro, *Mutat. Res.*, 171(1), 31-34
- Whitten P.L.**, Patisaul H.B., (2001) Cross-Species and Interassay Comparisons of phytoestrogen action, *Environmental Health Perspectives* 109, 5-20
- Wiltout R.H.**, Hornung R.L., (1988) Natural products as anti - tumor agents: direct versus indirect mechanisms of activity of flavanoids *Journal of the National Cancer Institut*, **80**, 220 - 222.
- Wu AH.**, Ziegler RG., Nomura AB., West DW., Kolonel LN., Horn-Ross PL., Hoover RN., Pike MC., (1998) Soy intake and risk of breast cancer in asians and asian americans *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, 1437S - 1443S.
- Xu X.**, Duncan A.M., Merz B.E., Kurzer M.S., (1998), *Cancer Epidemiol. Biomarkers Preview*, 7, 1101-1108
- Zhang Y.**, Wang GJ., Song TT., Murphy PA., Hendrich S., (1999) Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity *J. Nutrition*, 129, 957 - 962.
- Zheng W.**, Dai Q., Custer LJ., Shu XO., Wen WQ., Franke AA., (1999) Urinary excretion of isoflavanoids and the risk of breast cancer *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **8**, 35 - 40.
- Zhou BB**, Chaturvedi P, Spring K, Scott SP, Johanson RA, Mishra R, Mattern MR, Winkler JD, Khanna KK, (2000), Caffeine abolishes the mammalian G2/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity, *J.Biol.Chem.*, 275(14), 10342-8

Zimmerli B., Schlatter J., (1997) Occurrence and significance of the isoflavones daidzein and genistein in infant formulas *Mittlere Gebiete Lebensmittel Hygiene*, **88**, 219 - 232.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 01.04.01 bis 01.11.01 am Institut für Toxikologie der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. H. Stopper angefertigt, der ich für die professionelle Betreuung und für das mir entgegengebrachte Vertrauen zu großem Dank verpflichtet bin.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern des „ehemaligen 4. Stocks“ für das stets freundliche und kollegiale Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. E. Schmitt und Herrn M. Kessler, die mir bei Problemen immer fachlich kompetente Hilfestellung bieten konnten und auch sonst immer die Zeit für viele wertvolle und hilfreiche Gespräche fanden.

Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name, Vorname:	J o n a s , René
Straße:	Am Steingraben 41
PLZ / Wohnort:	97456 / Dittelbrunn
Geburtsdatum / Ort:	10.Mai 1977 / Werneck
Familienstand:	Ledig
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Eltern:	Josef Jonas; Leitender Angestellter Olga Jonas, geb. Göb; Hausfrau
Geschwister:	Verena Jonas
Schulbildung	
09/1983 – 07/1987	Grundschule in Dittelbrunn
09/1987 – 07/1996	Walther-Rathenau-Gymnasium, Schweinfurt

Zivildienst	
10/1996 – 05/1997	Kindergarten Dittelbrunn (Hausmeister und Koch)
06/1997 – 10/1997	Kreiskrankenhaus Werneck (Pflegedienst)
Studium	
04/1998 – 02/2000	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Abschluß Physikum
04/2000 – 02/2001	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg; Klinikum; Abschluß 1. Staatsexamen
04/2001 – 11/2001	Doktorarbeit am Toxikologischen Institut der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
04/2001 – 02/2003	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg; Klinikum Abschluß 2. Staatsexamen
04/2003 – 03/2004	Praktisches Jahr an Ausbildungskrankenhäusern der Julius-Maximilians-Universität Würzburg: 1. Tertial: Psychiatrie 2. Tertial: Chirurgie 3. Tertial: Innere Medizin Abschluß 3. Staatsexamen
04/2004 - heute	Zahnmedizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Praktika/Famulaturen	
09/1993 – 07/1994	Projektarbeit „Jugend forscht“
06/1997 – 10/1997	5-monatiges Pflegepraktikum am Krankenhaus Markt Werneck
08/2000 – 10/2000	2-monatige Famulatur auf der chirurgischen Abteilung am St. Josef Krankenhaus, Schweinfurt
02/2002 – 04/2002	2-monatige Famulatur an einer urologischen Praxis in Schweinfurt
07/2002 – 08/2002	14-tätige Famulatur auf der chirurgischen und visceralchirurgischen Abteilung am St. Josef Krankenhaus, Schweinfurt