

Aus dem
Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
der Universität Tübingen
Leiter: Professor Dr. F. W. Schmahl

Zytotoxische Effekte
von Platin(IV)chlorid
auf Zellstämme aus Leber- und Nierengewebe

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität zu Tübingen

vorgelegt
von
Martin Lenz
aus
Sindelfingen

2006

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Dartsch
2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Chemische Eigenschaften, Vorkommen	1
1.2. Verwendung von Platin	2
1.2.1. Verwendung in der Industrie	2
1.2.2. Verwendung in der Medizin	2
1.3. Umweltrelevante Aspekte	3
1.4. Platinkinetik	4
1.5. Wirkung von Platin	5
1.5.1. Akute Toxizität	5
1.5.2. Chronische Toxizität	5
1.5.3. Mutagenität	6
1.5.4. Kanzerogenität	6
1.6. Thematik der vorliegenden Arbeit	7

2. Material und Methoden

2.1. Platin(IV)chlorid	9
2.2. Zelllinien und Kulturbedingungen	9
2.3. Kinetik der Platinaufnahme	11
2.4. Akute Toxizitätstests	11
2.4.1. Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer	12
2.4.2. Neutralrot-Test	12
2.4.3. MTT-Test	13
2.4.4. Zellvolumen und Zellzahl	14
2.5. Langzeittoxizitätstests	14
2.5.1. Neutralrot-Test im 72 Stunden-Versuch	14
2.5.2. MTT-Test im 72 Stunden-Versuch	15
2.5.3. Romanowsky-Giemsa-Färbung	15
2.5.4. Nachweis von Zellmigration	15
2.5.5. Klonkulturen und Klonierungseffizienz	16
2.6. Statistische Auswertung	17

3. Ergebnisse

3.1. Platin(IV)chloridaufnahme der Zellen	18
3.2. Akute Toxizitätstests	23
3.2.1. Zellzahl und Zellvolumen nach 24 Stunden	23
3.2.2. MTT-Test nach 24 Stunden	27
3.2.3. Neutralrot-Test nach 24 Stunden	29
3.3. Langzeittoxizität	32
3.3.1. MTT-Test nach 72 Stunden	33
3.3.2. Neutralrot-Test nach 72 Stunden	35
3.3.3. Zellmigrationsverhalten nach 4-tägiger Exposition	37
3.3.4. Zellklonierung	43
3.4. Zusammenfassung der ED 50	46

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Die Bewertung von Gefahrstoffen unter arbeitsmedizinischen Bedingungen	48
4.2. Neuartiges am vorliegenden Versuchsansatz	49
4.3. Platin(IV)chloridaufnahme in Zellen	50
4.4. Bewertung der akuten Toxizität	51
4.5. Bewertung der Langzeittoxizität	55
4.6. Migrationsverhalten	56
4.7. Klonierungseffizienz	57
4.8. Schlussfolgerungen	59

6. Zusammenfassung	61
---------------------------	----

Literatur	62
------------------	----

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Chemische Eigenschaften, Vorkommen

Lange Zeit waren Platingruppenmetalle (PGM) toxikologisch gegenüber anderen Schwermetallen von untergeordneter Bedeutung, was sich aber im Zuge der fortschreitenden Industrialisierung und der damit verstärkten Nutzung von PGM geändert hat. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Platin.

Die Platingruppenmetalle stehen im Periodensystem in der 8. Nebengruppe. Die Mehrzahl der PGM liegen als Verbindungen in gelöster Form mit positiver oder negativer Ladung vor (Marquardt und Schäfer, 1994).

Tabelle 1: Übersicht über die Platingruppenmetalle

Element	Chem. Symbol	Ordnungszahl	Atomgewicht
Ruthenium	Ru	44	101,07
Rhodium	Rh	45	102,91
Palladium	Pd	46	106,4
Osmium	Os	76	190,2
Iridium	Ir	77	192,22
Platin	Pt	78	195,09

PGM zählen zu den seltensten Elementen der Erdkruste; ihre durchschnittliche Häufigkeit beträgt 0,001-1,0µg/kg Erde (Lustig et al 1996)

Die Hauptabbaugebiete befinden sich im Transvaal (Südafrika), in Sudbury (Kanada) und in Russland, wobei 93% der abgebauten PGM-haltigen Erze aus dem Transvaal und von der Kola-Halbinsel in Sibirien stammen. PGM kommen grundsätzlich nur als Gemische vor. Neben elementaren Vorkommen in Eisen- und Nickelerzen liegen sie auch in Form von Sulfiden und Arseniden vor (Marquardt und Schäfer, 1994). Da Platin der bedeutendste Vertreter der PGM ist, wird auf die anderen PGM in der vorliegenden Dissertation nicht näher eingegangen.

1.2. Verwendung von Platin

1.2.1. Verwendung in der Industrie

Zu den vielfältigen technischen Verwendungsmöglichkeiten von Platin zählen neben der Verwendung in der Schmuckindustrie, die etwa 30% der Weltjahresproduktion (1996: 137 t) ausmacht, vor allem die Automobilindustrie, die seit Einführung der Katalysatortechnik für Kraftfahrzeuge einen Anteil von weiteren 30% (1996) der Jahresproduktion verarbeitet (Lustig et al. 1996). Dieser Anteil wird sich durch eine Zunahme der Kraftfahrzeuge, die mit Katalysatoren ausgerüstet sind, noch erheblich erhöhen. Wegen der Korrosionsbeständigkeit und den katalytischen Fähigkeiten wird Platin auch in der Elektro-, Glas-, Textil- und chemischen Industrie verwendet. Besondere Haltbarkeit und Beständigkeit zeichnen dieses Edelmetall aus, weshalb es zum Beispiel auch in Platinelektroden, Platinspinnspulen und als platinlegierte Zündkerzen verarbeitet wird (Rosner und Hertel, 1986).

1.2.2. Verwendung in der Medizin

Eine spezielle Anwendung, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat, ist der Einsatz von aktivierten Platinkomplexen, wie zum Beispiel cis-Dichlordiaminoplatin (II) (cis-Platin), in der medikamentösen Tumorthherapie (Marquardt und Schäfer, 1994). Anwendung finden die platinhaltigen Zytostatika bei verschiedenen soliden malignen Neoplasien, wie zum Beispiel Ovarialkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Blasenkarzinome, Prostatakarzinome und Hodentumore (Rote Liste 86 078-087, 1996). Limitierende Faktoren für die Behandlung mit platinhaltigen Zytostatika sind allerdings die starke Nephrotoxizität und Ototoxizität (Balcerzak, 1997). Weiterhin wurde festgestellt, dass Cis-Platin in Zellkulturen eine Inhibition der Syntheserate der DNA auslöst und es zu einem Austausch von Teilen des DNA-Stranges kommen kann. Auch eine Störung der Synthese von RNA und Proteinen ist in Versuchen mit Zellkulturen beschrieben (Pascoe

and Roberts, 1973). Bei einer weiteren platinhaltigen Substanz, dem Carboplatin (cis-diamin 1,1-cyclobutan dicarboxylat Platin (II)) wurden weniger nephro- und ototoxische Wirkungen beschrieben, es wurde aber eine verstärkte Myelosuppression festgestellt (Balcerzak, 1997).

1.3. Umweltrelevante Aspekte

Die Verwendung von Platinmetallen vor allem im Bereich der industriellen Fertigung zeigt, dass bis zur Einführung der Katalysatoren für Kraftfahrzeuge eine Belastung von Mensch und Umwelt nur auf Edelmetallemissionen in Produktions- und Verarbeitungsstätten beschränkt blieb. Aufgrund dieser Problematik und wegen der schlechten Nachweisbarkeit von niedrigen Platinkonzentrationen wurde der MAK-Wert für lösliche Platinsalze auf $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft festgelegt.

Platin gelangt nicht nur über Industrie- und Krankenhausabwässer in die Umwelt, sondern auch, und zwar hauptsächlich, durch den mechanischen Abrieb aus den Automobilkatalysatoren. Die geregelten Dreiwegekatalysatoren enthalten 0,8 -2 g Platin (Moldowan et al., 1999), und nach verschiedenen amerikanischen und deutschen Studien werden pro gefahrenem Kilometer zwischen 40 ng (König et al., 1991) und $0,8 \mu\text{g}$ (Hill and Mayer, 1977) Platin emittiert. Dies ist jedoch abhängig von der Betriebstemperatur des Motors, von der gefahrenen Endgeschwindigkeit und von der mechanischen Beanspruchung des Katalysators. Bis zu 10% (Moldowan et al., 1999) der ausgestoßenen Fraktion sind wasserlösliche Platinsalze, wogegen die restlichen 90% an Trägermaterial gebunden sind und sich in unmittelbarer Nähe der Straßen absetzen (Zereini et al., 1993). Vor der Einführung der Oxidationskatalysatoren in den USA wurden in Wasser-, Boden-, oder Luftproben bei einer Nachweisgrenze von $5 \times 10^{-3} \mu\text{g Pt}/\text{m}^3$ Luft landesweit keine messbaren Mengen von Platinmetallen gefunden (Rosner und Hertel, 1986).

Der wasserlösliche Anteil des emittierten Platins setzt sich ab und wird, gelöst in Regenwasser, von Pflanzen aufgenommen oder abgeschwemmt. Stark

erhöht hat sich dadurch die Belastung von Klärschlamm und von straßennahen Wasserreservoirten, aber auch in Pflanzen und aquatischen Organismen lässt sich eine erhöhte Platinfraktion nachweisen (Helmert und Mergel, 1997, Sures und Zimmermann, 2000).

1.4. Aufnahmekinetik von Platin

Über die Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Platinmetallen im menschlichen Körper gibt es bislang kaum gesicherte Aussagen. In Tierversuchen wurde aber festgestellt, dass die Aufnahme von Platinsalzen sowohl über den Gastrointestinaltrakt als auch über das respiratorische System geschieht. Die Platinaufnahme kann über die Lunge größer sein als über den Verdauungstrakt. Eine Verteilung in der Lunge erfolgt sehr langsam. Über die Verteilung innerhalb des Körpers gibt es kaum Forschungsergebnisse, jedoch wurde in Lunge, Trachea, Niere, Leber, Thymus und Knochen eine erhöhte Platinkonzentration gefunden. Im Tierversuch zeigte Moore et al. (1975), dass PtCl_4 die Plazentaschranke überwinden kann. In seinem Versuch injizierte er Ratten radioaktiv markiertes PtCl_4 und wies es danach in deren Foeten nach. Im Gehirn wurde eine deutlich niedrigere Konzentration als im Blut festgestellt, was die Vermutung nahe legt, dass die Platinsalze die Blut-Hirn-Schranke nur erschwert passieren können (Moore et al., 1975). Die Begründung, die Moore et al. (1975) dafür lieferten war, dass die Platinmoleküle an größere Transportmoleküle gebunden waren.

Innerhalb der ersten 24 Stunden werden zwischen 20% und 50% der Platinsalze renal eliminiert, danach schließt sich eine Phase der langsameren Ausscheidung an (Rossner und Hertel, 1986). Da es bei einer parenteralen Gabe von Chloroplatin auch zu einer Ausscheidung über die Faeces kommt, wird neben der renalen auch eine biliäre Elimination postuliert (Marquardt und Schäfer, 1994).

1.5. Wirkung von Platin

1.5.1 Akute Toxizität

Die Symptome einer akuten Platinintoxikation sind in Tierversuchen beschrieben worden. Platin akkumuliert hauptsächlich in den Zellen des proximalen Tubulus der Niere. Dies führt durch eine intrazelluläre Wassereinlagerung zu einer zellulären Nekrose und zu einem Verlust der Mikrovilli. Als Grund für die Hyperhydratation postulieren Kuhlmann et al. (1998) die Blockade von Membrantransportproteinen und eine Elektrolytverschiebung. Maeda et al. (2004) stellten eine Korrelation zwischen Toxizität und einer erhöhten Glutathionkonzentration innerhalb gastrischer Tumorzellen her. Auch eine Interaktion mit intrazellulären und mitochondrialen Enzymen wurde beschrieben (Kuhlmann et al., 1998).

Weiterhin wurden von Erbrechen, blutigen Durchfällen, und für einige organische Platinverbindungen wie Cis-Platin und Carboplatin über eine Wirkung auf das Zentralnervensystem mit epileptischen Anfällen berichtet (Rossner und Hertel, 1986).

1.5.2. Chronische Toxizität

Bei der chronischen Toxizität steht die "Platinose" im Vordergrund, bei der es sich um einen Krankheitskomplex mit asthmaähnlicher Atemnot, Ekzemen und Dermatitis handelt. Dieser Symptomkomplex wurde erstmals von Karasek und Karasek (1911) beschrieben. Sie zeigten diese Problematik an Arbeitern in einem Photolabor, die mit hexachloroplatinhaltigem Photopapier zu tun hatten. Ähnliche Befunde wurden von anderen Autoren beschrieben (Rossner und Hertel, 1986; Marquardt und Schäfer, 1994). Alle Autoren berichteten, dass die Symptome sowohl bei Hautkontakt als auch bei der Inhalation von Chloroplatinsäure oder deren Salzen auftraten (Roberts, 1951). Bei niedriger Konzentration der Platinsalze im Bereich von 0,9 - 3,2 µg/m³ Luft ließ sich ein geringes Allergisierungspotenzial von Platinsalzen mit leichten Symptomen wie

Naselaufen und Niesen feststellen. Die volle Ausprägung zeigte sich in Asthma bronchiale, Kontaktdermatitis und Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock. Diese Symptome treten aber erst bei weitaus höheren Platinkonzentrationen auf (Rossner und Hertel, 1986).

1.5.3. Mutagenität

Über die Mutagenität von Platinkomplexen steht nur sehr wenig Datenmaterial zur Verfügung. Bei Salmonellen und E. coli- Bakterien zeigte sich im Ames-Test für eine Reihe von Platin-Chlor-Amin-Komplexen eine mutagene Wirkung (Beck and Brubaker, 1975). Weitere Testsysteme zum Nachweis von Punktmutationen erbrachten ebenfalls einen Hinweis auf die mutagene Wirkung von Platin(IV) Verbindungen (Gebhard, 1984).

Vermutlich läuft der Wirkungsmechanismus so ab, dass Platinionen in mitochondriale Redoxreaktionen eingreifen. Auch lysosomale Enzyme sind betroffen. Der Einfluss auf das Glutathion-System, die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Glutathion (Maeda et al., 2004) und dessen irreversible Bindung an S-H-Gruppen führt zu einer erhöhten Menge an freien Radikalen (Kuhlmann et al., 1997)

Weiterhin wird angenommen, dass sich die biologisch aktiven Platinkomplexe an die DNA binden und diese in ihrer Struktur verändern, indem sie den DNA-Strang aufspalten (Liu et al., 1996), oder die Aminbindungen inhibieren, oder die Liganden in der DNA Synthese den Einbau von Aminen blockieren (Mansuri-Thorshizi et al., 2001)

1.5.4. Karzinogenität

Hinweise auf ein erhöhtes Krebsrisiko bei Menschen in platinverarbeitenden Betrieben liegen nicht vor. Es gibt aber auch bisher keine epidemiologischen Studien über die Krebshäufigkeit bei berufsbedingt exponierten Personen.

Im Tierversuch wurde jedoch eine kanzerogene Wirkung von cis-Platin nachgewiesen. Bei Mäusen wurde eine signifikant erhöhte Rate von

Lungenadenomen und Hautpapillomen beobachtet. Bei Ratten entwickelten sich nach subkutaner Injektion von cis-Platin-analogen Verbindungen vor allem Sarkome an der Einstichstelle. Aufgrund dieser Befunde besteht ein gewisses Risiko zur Bildung sekundärer Tumore nach einer Behandlung mit platinhaltigen Zytostatika (Leopold et al., 1979). Erwiesen ist, dass bei Patienten nach einer Behandlung mit Cisplatin und Carboplatin mit erhöhter Wahrscheinlichkeit Leukämie auftritt (Travis et al., 1999). Wegen fehlender Untersuchungsergebnisse kann für andere Platinverbindungen keine Aussage über eine erhöhte Tumorinzidenz gemacht werden.

1.6. Thematik der vorliegenden Arbeit

1.6.1. Hintergrund

Es gibt verschiedene Studien zur akuten und chronischen Toxizität von aktivierten Platinkomplexen. Nicht untersucht wurde aber bis jetzt die akute und chronische Zytotoxizität von wasserlöslichen Platinsalzen.

Ziel dieser Arbeit war es, mit in-vitro Testsystemen die Toxizität von Platin auf Zellen von Leber und Niere zu bewerten.

Bei den meisten arbeitsmedizinischen Untersuchungen liegt der Schwerpunkt auf der Überprüfung und dem Nachweis der Kanzerogenität bestimmter Stoffe. Daher wird in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt bewusst auf die akute und chronische Toxizität von PtCl_4 gelegt. Ein Grund für weiteren Forschungsbedarf sind die steigenden Umweltkonzentrationen durch Platinemissionen aus Abgaskatalysatoren und eine zunehmende Akkumulation von PtCl_4 in biologischen Materialien (Helmerts et al., 1994). Auch die Studie von Sures und Zimmermann (2000) beschäftigt sich mit der Akkumulation von Platingruppenelementen in aquatischen Organismen unter der Fragestellung einer erhöhten Bioverfügbarkeit der Kraftfahrzeug-bürtigen PGEs.

Verschiedene Forschungsarbeiten zeigen, dass innerhalb des letzten Jahrzehnts die Menge an emittiertem Platin um mehrere Zehnerpotenzen zugenommen hat. Lustig et al., (1997) nimmt an, dass es um den Faktor 100-

1000 über dem geogenen Untergrundwert liegt. Eine weitere Studie zeigt, dass Konzentrationen bis 87 µg/kg Straßenstaub in Deutschland gemessen wurden (Zereini et al., 1993). Dies und die Annahme von weiterhin steigenden Platinkonzentrationen macht die umweltmedizinische Relevanz dieser Arbeit deutlich.

1.6.2. Thematik

Neuartig ist bei den hier vorliegenden Untersuchungen, dass die verwendeten Testsysteme einen direkten Vergleich der Zelllinien untereinander erlauben. Auch ein direkter Vergleich zwischen den PtCl₄-Konzentrationen und der Abnahme der Zellvitalität ist durch diese Untersuchungen möglich.

Aufgrund der Ausscheidung und Metabolisierung von Platinsalzen sowohl über die Niere als auch über die Leber, wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils zwei etablierte Nierenepithelzelllinien und zwei Leberepithelzelllinien verwendet. Als Parameter zur Bewertung der toxischen Wirkung wurden Zellvitalität, Zellvolumen, Zellproliferation und Zellwanderung herangezogen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen sowohl als Ergänzung zu vorangegangenen Arbeiten als auch als Bestätigung der bisher veröffentlichten Studien gesehen werden. Weiterhin wird eine selektive Beurteilung von Zielzellen möglich. Die Ergebnisse der Tests könnten als Ausgangsbasis für weiterführende Untersuchungen von molekularen und ionalen Mechanismen der Zellen herangezogen werden. Zu beachten ist jedoch die Problematik, dass eine der Nierenzelllinien vom Opossum, einem Beuteltier, stammt. Deswegen sind Vergleiche zum Verhalten menschlicher Zellen nur eingeschränkt möglich.

2. Material und Methoden

2.1. Platin(IV)chlorid

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit Platin(IV)chlorid, (CAS-Nr. 13454-96-1, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) durchgeführt. Dabei wurde das Platin(IV)chlorid in PBS in der Konzentration 10 mmol/l (33,69 mg PtCl₄ in 10 ml PBS), pH 7,5 (Gibco, Life Technologies, Eggenstein) gelöst und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm Filter, Sartorius, Heidelberg). Aus dem Filtrat wurden verdünnte Stammlösungen mit den Konzentrationen 1 mmol/l und 0,1 mmol/l hergestellt.

2.2. Zelllinien und Kulturbedingungen

Das verwendete Zellmaterial bestand aus den vier nachfolgenden etablierten Zelllinien:

- Opossum Kidney Cells (OK-Zellen): Nierenepithelzellen aus dem proximalen Tubulus des Opossums (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Murer, Physiologisches Institut der Universität Zürich, Schweiz)
- Human Kidney Carcinoma Cells (A-498): Nierenepithelzellen des Menschen DSM ACC 55 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig)
- Human Chang Liver Cells (Chang Liver): Leberepithelzellen des Menschen 88021102 (European Collection of Cell Cultures for applied Microbiology and Research (ECACC), Salisbury, UK)
- Human Hepatocyte Carcinoma Cells (Hep. G2): Leberepithelzellen des Menschen ATCC CRL 10741 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA)

Routinemäßig wurden die vier genannten Zelllinien als Massenkulturen mit einer Zelldichte von 30.000-50.000 Zellen/cm² in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Greiner, Frickenhausen) ausgesät. Nach vier bis

fünf Tagen, abhängig von der Wachstumsrate der verschiedenen Zellkulturen, bildeten die Zellen einen optisch dichten (konfluenten) Zellrasen und wurden durch einen Transfer umgesetzt.

Beim Transfer der konfluenten Massenkulturen wurde folgendermaßen vorgegangen: Die konfluenten Kulturen wurden mit steriler PBS gespült und die dann noch adhären Zellen mit einer sterilen Enzymlösung aus Trypsin/EDTA, pH 7,2 (0,5%/0,02%) (Gibco Life Technologies, Eggenstein) vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellzahl wurde anschließend in einer Zählkammer (nach Neubauer) bestimmt und die Zellen in der jeweils gewünschten Zahl in neue Kulturgefäße ausgesät.

Für die unterschiedlichen Zellstämme wurden spezifische Kulturmedien verwendet. Basismedien und Zusatzstoffe stammten, soweit nicht anders beschrieben, von der Firma Gibco Life Technologies, Eggenstein.

- Hep G2: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und F 12 (Nutrient Mixture Ham's F 12) im Verhältnis 1/1 (v/v). Diesen Grundmedien wurde 10% FCS zugegeben, um den Zellen die zum Wachstum nötigen Hormone, Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, anorganischen Salze und Spurenelemente zuzuführen. Zur Vorbeugung einer bakteriellen Kontamination wurden 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugefügt. Zusätzlich wurde das Kulturmedium noch mit 1 µmol/l L-Glutamin versetzt.
- Chang Liver und A-498: Beide Zelllinien benötigen dasselbe Kulturmedium mit den gleichen Zusatzstoffen: Earle's MEM (Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen) wurde mit 10% FCS supplementiert und 1% NEAA, 1 µmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.
- OK: DMEM und F 12 wurden im Mischungsverhältnis 1/1 (v/v) mit 10% FCS supplementiert, 2% HEPES (1M) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim), 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Inkubiert wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank in einer wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einer Begasung mit 94% Luft und 6%

CO₂. Damit wurde durch das CO₂/HCO₃⁻ Puffersystem das pH konstant im Bereich 7,2-7,4 eingestellt.

2.3. Kinetik der Platinaufnahme

Es wurden jeweils 600.000 Zellen in 5 ml 10% FCS-haltigem Medium in einer Zellkulturschale (Greiner, Frickenhausen) mit einer Wachstumsfläche von 21 cm² ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium erneuert und PtCl₄ in der Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Dieser Wert leitet sich aus der Dosis-Wirkungskurve (s. 2.4.) ab. Die Zellen wurden unter kräftigem Spülen nach 0 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden mit 2 ml sterilem Trypsin abgelöst (10-15 Minuten bei 37°C), und in der Zählkammer ausgezählt.

Das Medium aus der Zellkulturschale wurde zur Analyse der Platinmenge mit einem Atom-Absorptions-Spektrometer (Spectra AA 300, Varian Analytical Instruments, München) untersucht. Dafür wurden die Proben mit 3% HCL (Ultrex[®] Ultrapur, JT Baker, Philipsburg, USA) 1/10 (v/v) verdünnt und gegen eine Standardlösung (100 ng/ml Platin in 3% HCL, Mallinckrodt-Baker, Deventer, Holland) gemessen.

Die Messwerte entstanden mit Deuterium-Untergrundkompensation und Graphitrohrtechnik, mit der Einstellung auf Absorption und der Messart Peakhöhe. Die Platinlampe (Hohlkathodenlampe, Varian, München) hatte einen Lampenstrom von 7 mA, eine Spaltbreite von 0,2 nm und die Wellenlänge von 265,9 nm. Die Probenzugabe erfolgte über einen automatischen Probengeber, die Messzeit betrug eine Sekunde und es wurden zwei Wiederholungsmessungen durchgeführt. Als Trägergas wurde Argon eingesetzt. Das Temperaturprogramm setzte sich folgendermaßen zusammen: Die Proben wurden im beschichteten Graphitrohr bei 750°C verascht und bei 2700°C atomisiert.

2.4. Akute Toxizitätstests

Um die akute zytotoxische Wirkung von PtCl_4 zu bestimmen, wurden Chang Liver-Zellen, Hep G2-Zellen, A-498-Zellen und OK-Zellen aus den Massenkulturen in einer Dichte von 5.000 Zellen/ cm^2 in 6-Loch-Platten mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm^2 pro Vertiefung (Greiner, Frickenhausen), wie unter 2.2. beschrieben, ausgesät.

Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen erneut adhären und den durch die Trypsinbehandlung unterbrochenen Zellstoffwechsel wieder normalisieren. Nach den 24 Stunden hatte sich wieder ein dem Wachstum förderliches Milieu gebildet. Anschließend wurde PtCl_4 in Konzentrationen von 1-200 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt und weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.4.1. Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer

Nach der entsprechenden Inkubationszeit mit PtCl_4 wurde für die Auswertung der Zellzahl das Kulturmedium abgesaugt und die toten und flottierenden Zellen und Zellfragmente durch eine Spülung mit sterilem PBS entfernt. Das Ablösen der adhären und damit vitalen Zellen mit sterilem Trypsin/EDTA, pH 7,2 (0,025%) (Gibco, Life Technologies, Eggenstein) über 5 Minuten erwies sich, wie von Waters et al.,(1975) beschrieben, als äußerst schwierig. Die Adhäsionskräfte an den Boden der Kulturgefäße und ein Verklumpen der Zellen wurden durch das PtCl_4 verstärkt. Daher konnte nur in Einzelfällen der Zellrasen abgelöst werden.

2.4.2. Neutralrot-Test

Bei diesem Versuch wurden die vitalen Zellen nicht direkt, sondern über die Aufnahme des Neutralrot-Farbstoffs in die Lysosomen nachgewiesen. Das NR diffundiert unabhängig von Ionenkanälen durch die Zellmembran und akkumuliert in den Lysosomen (Borenfreund and Puerner , 1985).

Die Durchführung des Versuchs erfolgte nach der in 2.2. beschriebenen Aussaat. Bei diesem Versuch wurden statt der 6-Loch-Platten 12-Loch-Platten mit 4 cm² Wachstumsfläche pro Vertiefung (Integra Bioscience, Fernwald) benutzt. Die Kontrolle wurde nur mit Kulturmedium gefüllt. Danach wurde PtCl₄ zugegeben. Die Auswertung geschah mittels Biochrom-Gammakit (Biochrom, Seromed[®], Berlin): 24 Stunden nach der Gefahrstoffzugabe wurde in jede Vertiefung 1 ml Neutralrotlösung (0,33% Neutralrotlösung in PBS) pipettiert und die Platten 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und die Vertiefungen zweimal mit jeweils 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurde 1 ml Ethanol/Eisessig (1% Eisessig zu 50% Ethanol) pro Vertiefung zupipettiert, um den Farbstoff wieder aus den Zellen herauszulösen, und ca. 10 Minuten unter häufigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Zur photometrischen Auswertung wurden die Lösungen in Halbmikroküvetten (Sarsted, Nümbrecht) überführt und die optische Dichte bei 540 nm im Photometer (Unicam UV 4, Unicam analytische Systeme, Kassel) bestimmt.

2.4.3. MTT-Test

Der MTT-Test (Sigma-Aldrich, Steinheim) ist wie der in 2.4.2. beschriebene Versuch ein Test zum Nachweis von vitalen Zellen. Das Tetrazolium-Salz MTT ist ein hellgelbes Substrat, das in Mitochondrien von lebenden Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem dunkelblauen Formazan-Produkt reagiert (Mosmann, 1983).

Es wurden zwei 12-Loch-Platten mit jeweils 5.000 Zellen/cm² ausgesät, wobei die Kontrolle nur mit Kulturmedium aufgefüllt wurde. Nach einer Ruhephase von 24 Stunden zur erneuten Adhäsion und der Gefahrstoffzugabe von PtCl₄ in den Konzentrationen 1-200 µg/ml wurden die Zellen weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Zur Auswertung wurden pro Vertiefung 100 µl MTT-Lösung (5 mg MTT/ml PBS⁺) zugegeben und die Zellen für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden 1 ml MTT-Solubilisations-Lösung (90 ml 2-

Propanol, 5 ml 1 N HCl, 10 g Triton X-100, (Merck, Darmstadt) zugegeben und nach starkem Durchmischen das Substrat in Halbmikroküvetten überführt.

Die Messung der optischen Dichte erfolgte am Photometer bei 570 nm und 690 nm, wobei das Ergebnis der Messung bei 690 nm von dem Ergebnis bei 570 nm subtrahiert wurde.

2.4.4. Zellvolumen und Zellzahl

Bei diesem Versuch wurde von den vier Zelllinien jeweils 10.000 Zellen/cm² in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde PtCl₄ in den Konzentrationen 1-200 µg/ml zugegeben und weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Zur Auswertung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit steriler PBS gespült. Die Ablösung des Zelllayers erfolgte mit sterilem Trypsin/EDTA, wobei eine Einwirkzeit von 20 Minuten und starkes Durchmischen erforderlich war, um die Zellschicht vom Untergrund zu lösen und die Zellklumpen aufzulösen. Danach wurde die Zellsuspension 1:96 (v/v) mit einer isotonischen Messlösung (CASYton, Schärfe System, Reutlingen) verdünnt damit das Zählsystem (Zellcounter CASY 1, Schärfe System, Reutlingen) nicht überlastet wurde. Bei den Zellreihen Chang Liver und A-498 musste zusätzlich noch 1:2 (v/v) mit isotonischer Messlösung nachverdünnt werden.

Die Auswertung erfolgte über das mediane Zellvolumen. Dieses liefert einen Querschnitt über die Zellgrößenverteilung der zu untersuchenden Zellen, und lässt somit Rückschlüsse auf die Veränderung der Gesamtpopulation zu.

Das Zellzählsystem lieferte die Zellzahl (Zellgröße: 11-40 µm). Die durch mechanische Beanspruchung beim Durchmischen und durch die verlängerte Einwirkzeit des Trypsins entstandenen Zellfragmente (bis zur Größe von 11 µm) wurden vom Zählsystem zwar erfasst, jedoch nicht berücksichtigt.

2.5. Langzeittoxizitätstests

2.5.1 Neutralrot-Test im 72 Stunden-Versuch

Zur Untersuchung der Langzeittoxizität wurde der Neutralrot-Test wie in 2.4.3. durchgeführt, wobei die Versuchsparameter, bis auf eine Verlängerung der Einwirkzeit des PtCl₄ auf 72 Stunden und der Reduzierung der ausgesäten Zellzahl auf 20.000 Zellen pro Vertiefung in 12-Loch-Platten mit 1 ml Medium, nicht verändert wurden.

2.5.2 MTT-Test im 72 Stunden-Versuch

Die Untersuchung der Zellvitalität der vier Zellreihen mittels MTT-Test nach 72 Stunden erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise wie unter 2.4.4. beschrieben. Außer der verlängerten Einwirkzeit des PtCl₄ von 72 Stunden und einer verminderten Menge von ausgesäten Zellen von 20.000 Zellen pro Vertiefung in 12-Loch-Platten mit 1 ml Medium wurde keiner der oben genannten Parameter verändert.

2.5.3. Romanowsky-Giemsa-Färbung

Zur Beurteilung der Migration und zur Auswertung der Klonierung wurden die Zellen fixiert und mit der Romanowsky-Giemsa-Färbung nach Wittekind bei Raumtemperatur gefärbt.

Für die Fixierung wurde eine Stammlösung (nach Wittekind) aus 15 ml Methanol p.a. + 500 µl Azur B SCN⁻ + 500 µl Eosin Y-Farblösung hergestellt. Diese wurde auf die Zellen gegeben und zur Fixierung drei Minuten dort belassen. Danach wurde die Fixierlösung vorsichtig abgespült.

Zur Färbung wurden 50 ml 0,03 M HEPES-Puffer, pH 6,5 (1 Teil HEPES (1 mol/l, Serva, Heidelberg) zu 32 Teilen Aqua dest.) mit 500 µl Azur B SCN⁻ und 500 µl Eosin Y-Farblösung gemischt und für 30 Minuten auf die Zellen

gegossen. Nach mikroskopischer Kontrolle der Färbung wurden die Vertiefungen vorsichtig gespült und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

2.5.4. Nachweis der Zellmigration

Aufgrund von Kontaktinhibierung bilden Epithelzellen nur eine einzige Zellschicht (Monolayer). Durch das FCS-reduzierte Kulturmedium hatten die Zellen eine stark eingeschränkte mitotische Aktivität und auch Stoffwechselaktivität. Durch Zellteilung und aktive Fortbewegung der Zellen wuchsen diese in den zellfreien Raum ein. Die Einschränkung der Migrationsstrecke und Anzahl der ausgewanderten Zellen war unter anderem ein guter Anhaltspunkt zur Bestimmung der Zellschädigung.

Für den Versuch zur Untersuchung der Zellmigration wurden die Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und kultiviert, bis sich ein optisch konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Daraufhin wurde eine sterile Rasierklinge auf den Zellrasen gesetzt und die Zellen auf einer Seite mit einem sterilen Watteträger entfernt. Ein zellfreier Raum mit glatter Schnittkante (sog. künstliche Wunde) wurde geschaffen, damit die Zellen bei weitgehend unterdrückter Proliferation ungehindert immigrieren konnten.

Das Routinemedium wurde dann durch 1% FCS-haltiges Medium ersetzt und PtCl_4 in den Konzentrationen 10-200 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen 72 Stunden im Brutschrank inkubiert und nach einer mikroskopischen Kontrolle nach Romanowsky-Giemsa fixiert und gefärbt (siehe 2.5.1.).

Ausgewertet wurde der Versuch im Mikroskop (Nikon Optiphot, Nikon, Düsseldorf) mit in den Strahlengang eingesetztem Zeichentubus im Hellfeld-Verfahren, bei dem, je nach zelltypischem Wanderungsverhalten, entweder die Migrationsfront (OK) oder die Einzelzellen (A-498, Chang Liver) herausgezeichnet wurden. Anschließend wurde die Zahl der ausgewanderten Zellen bestimmt, die Wegstrecke ausgemessen und die mittlere Wanderungsgeschwindigkeit der Einzelzellen berechnet. Bei den Hep. G2-Zellen war eine Auswertung der Migrationsfähigkeit nicht möglich, da sich die Zellen aus unbekannter Ursache vom Boden der Kulturschale ablösten und

selbst an den noch verbliebenen Resten der „künstlichen Wunde“ keinerlei migratorische Aktivitäten feststellbar waren.

2.5.5 Klonkulturen und Klonierungseffizienz

Ein Zellklon ist eine Zellpopulation, die durch Zellteilung aus einer Einzelzelle entstanden ist. Da die Klonform, die Wachstumsgeschwindigkeit und die Klonmorphologie sowohl zwischen den einzelnen Zellarten als auch innerhalb einer Zelllinie sehr unterschiedlich sein können, kann allein über die Klonstruktur keine eindeutige Aussage zur Zellveränderung bei Exposition mit der Testsubstanz gemacht werden.

Bei diesem Versuch wurde eine besonders geringe Anzahl von Zellen (500, 1.000 und 2.000 Zellen) in Kulturschalen mit 58 cm² Wachstumsfläche (Greiner, Frickenhausen) ausgesät. Dadurch war die Ausbildung definierter Zellklone möglich, da sich die Zellen vereinzelt am Boden der Kulturschale festsetzen konnten. Nach 48-stündiger Ruhephase im Brutschrank, während der sich der Zellstoffwechsel wieder normalisieren konnte, wurden die Klonkulturen mit PtCl₄ in den Konzentrationen 10-200 µmol/l behandelt und für weitere 10 Tage im Brutschrank inkubiert. Gefärbt wurden die Kulturen nach Romanowsky-Giemsa. Die Quantifizierung der Klonzahl erfolgte durch Auszählung der Klone. Nicht berücksichtigt wurden Klone mit einer Größe < 1 mm (Zellzahl < 50 Einzelzellen). Die Klonierungseffizienz (KE) wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Klonierungseffizienz (KE)} = \frac{\text{Anzahl der Klone}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen}} [\%] \times 100 \quad (1)$$

2.6. Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurde jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Die Signifikanzbestimmung der Messergebnisse erfolgte nach dem Student's t -Test bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

Die Entscheidung, den Student's t -Test zu benutzen, erfolgte aufgrund seiner Robustheit and der Möglichkeit, selbst kleine und ungleiche Anzahlen von Versuchszahlen miteinander vergleichen zu können.

3. Ergebnisse

3.1. PtCl₄-aufnahme der Zellen

Die vier Zelllinien Chang-Liver, Hep G2, OK und A-498 wurden jeweils wie unter 2.3. beschrieben ausgesät und die Zellzahl sofort, nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bestimmt. Die Konzentration des Gefahrstoffes PtCl₄ blieb konstant bei 50 µmol/l. Die Zellzahl der jeweils unbehandelten Kontrollgruppe wurde mit den Zellzahlen der Versuchsgruppe verglichen. Den Verlauf kann man der Abb. 1 für die beiden Leberzelllinien entnehmen. Bei den Chang-Liver-Zellen verdoppelte sich die Zahl der Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe ungefähr alle 24 Stunden von 500.000 Zellen zum Zeitpunkt t = 0h auf 3.640.000 zum Zeitpunkt t = 72h. Bei der Versuchsgruppe war die Zunahme der Zellzahl von 537.000 Zellen (0^h) auf 2.038.000 deutlich geringer. Bei der zweiten Leberzelllinie Hep G2 war der Verlauf uneinheitlich. Vom Zeitpunkt 0^h bis 48^h verdreifachte sich die Kontrollgruppe pro 24 Stunden, um dann am Zeitpunkt 72^h um ein Drittel abzunehmen. In der Versuchsgruppe war die Zellzahl zum Zeitpunkt 0^h auffällig hoch (847.000). Zum Zeitpunkt 24^h gab es kaum eine Zunahme an Zellen, erst nach 48^h stieg die Zellzahl um 2/3 und nach 72^h zeigte sich eine Verdoppelung. Die großen Abweichungen der Zellzahlen waren Ausdruck der schon unter 2.4.1 angesprochenen Problematik der gestörten Zellablösung unter Platineinfluss.

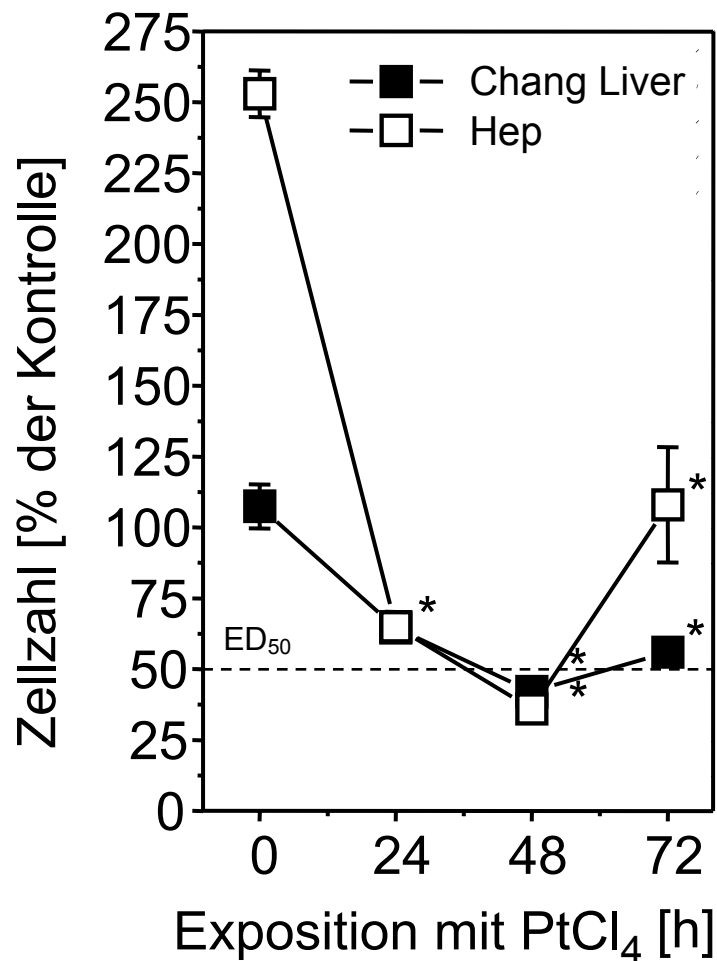


Abb. 1: Gesamtzellzahl nach Exposition mit PtCl₄ zwischen 0 und 72 h; Ergebnis für Leberzelllinien; Beachte die zeitabhängige Reduktion der Zellzahl bis 48 Stunden; (Mittelwert ± S.E.M.; $p \leq 0,05$; $n = 3$)

Bei den Nierenepithelzellen ergab sich, wie aus Abb. 2 erkennbar, ein uneinheitliches Bild. Die Kontrollgruppen zeigten sowohl bei den OK-Zellen mit einer starken Steigerung von 515.000 Zellen bei $t = 0h$ auf $10,1 \times 10^6$ Zellen beim Zeitpunkt $t = 72h$ als auch bei den A-498-Zellen mit einer geringeren Steigerung von 340.000 bei $t = 0h$ auf 2.060.000 Zellen bei $t = 72h$ ein ausgeprägtes Wachstum. Auch bei den Versuchsgruppen setzte sich die starke Wachstumstendenz fort. Sie fiel mit einer Steigerung von 462.000 Zellen (Zeitpunkt $t = 0h$) auf $8,1 \times 10^6$ Zellen (Zeitpunkt $t = 72h$) bei den OK-Zellen nur

unwesentlich geringer aus. Auch die A-498-Zellen wiesen die gleiche Tendenz auf, wobei eine kontinuierliche Steigerung vom Zeitpunkt $t = 0\text{h}$ mit 340.000 Zellen auf 1.567.000 Zellen beim Zeitpunkt $t = 72\text{h}$ zu beobachten war.

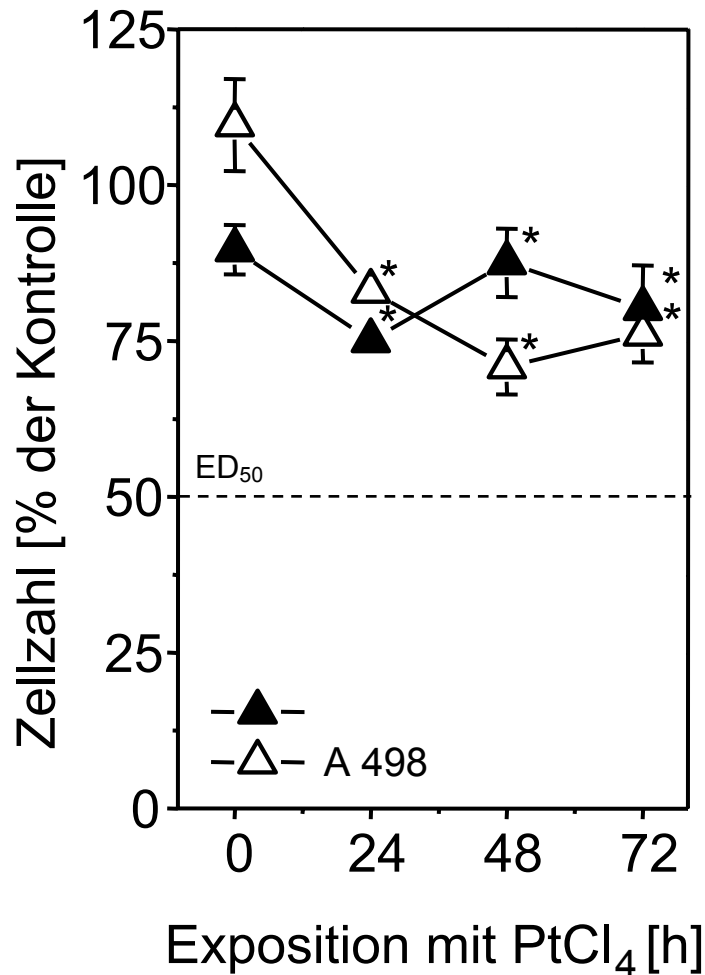


Abb. 2: Gesamtzellzahl nach Exposition mit PtCl₄ zwischen 0 und 72 Stunden; Ergebnis für Nierenzelllinien; Beachte die schwache Reduktion der Zellzahl innerhalb von 72 Stunden; (Mittelwert \pm S.E.M.; * $p \leq 0,05$; $n=3$)

Die Abbildungen 3 und 4 der einzelnen Zelllinien stellen die aufgenommene Menge PtCl₄ pro 1×10^6 Zellen nach 0h, 24h, 48h und 72h dar. Die Vorgehensweise ist unter 2.3. ausführlich beschrieben worden. Auch hier war die starke Varianz der Standardabweichung mit dem Problem der Platinmessung im Atom Absorptions Spektrometer verbunden, da die von den Zellen aufgenommene Menge im untersten Bestimmungsbereich lag.

Bei allen 4 Zelllinien zeigte sich, dass die Platinkonzentration in den Zellen direkt nach Gefahrstoffzugabe nicht messbar war. Eine weitere Tendenz war, dass der intrazelluläre Gehalt von PtCl_4 bei allen 4 Zelllinien nach 24h am größten war. Die Chang Liver-Zellen zeigten eine Konzentration von $754 \text{ ng PtCl}_4/10^6$ Zellen nach 24h, welche nach 48 h auf $235 \text{ ng}/10^6$ Zellen und danach bei 72h auf $186 \text{ ng}/10^6$ Zellen zurückging. Bei den Hep G2-Zellen war die Aufnahme mit $388 \text{ ng}/10^6$ Zellen beim Zeitpunkt 24h geringer. Auch die Abnahme auf $301,3 \text{ ng}/10^6$ Zellen nach 48 h bzw. $294 \text{ ng}/10^6$ Zellen nach 72h fiel deutlich schwächer aus.

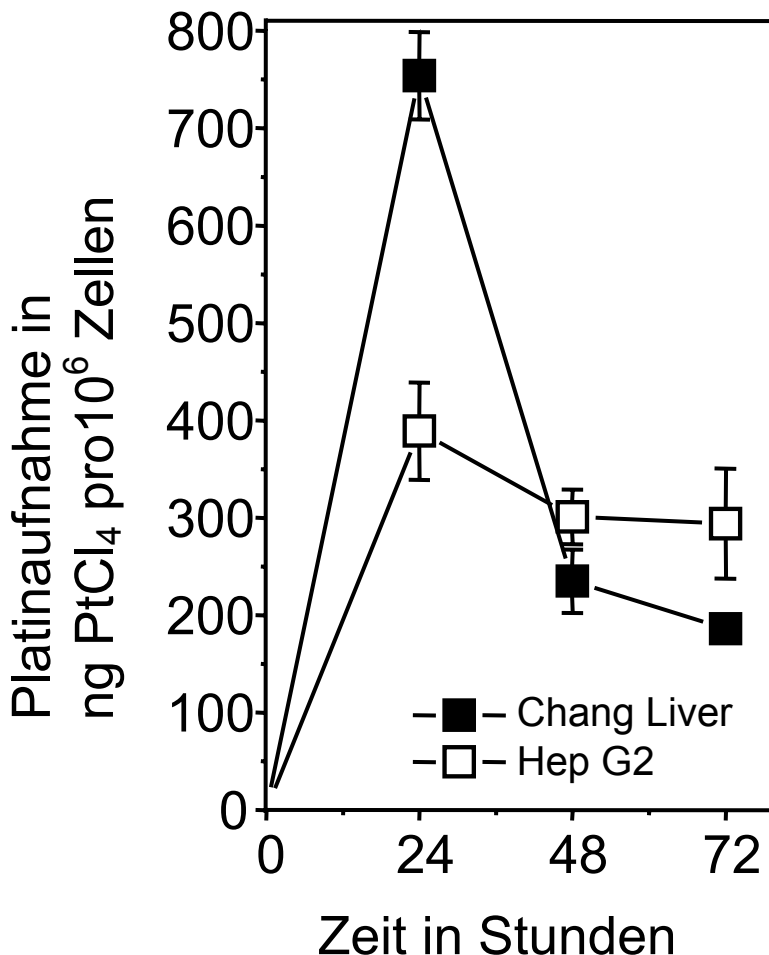


Abb. 3: Gesamtmenge von PtCl_4 pro 10^6 Zellen in ng zwischen 0 und 72 Stunden; Ergebnis für Leberzelllinien; Beachte die zeitabhängige Reduktion der PtCl_4 -Aufnahme; (Mittelwert \pm S.E.M.; * $p \leq 0,05$; $n = 3$)

Die Nierenepithelzelllinie A-498 zeigte Ergebnisse, die denen der Leberzelllinien sehr ähnlich waren. Auch hier sah man die Reduktion der Aufnahme des Gefahrstoffs PtCl₄ von 362,3 ng/10⁶ Zellen nach 24h auf 282,3 ng/10⁶ Zellen nach 48h. Nach 72h war die in den Zellen nachgewiesene Menge von PtCl₄ nur noch 182,7 ng/10⁶ Zellen. Bei den OK-Zellen war die Gesamtaufnahme mit 133 ng/10⁶ Zellen nach 24h eher gering. Auch die Abnahme nach 48h auf 49,7 ng/10⁶ Zellen und die nach 72h wiederum erfolgte Zunahme auf 82,3 ng/10⁶ Zellen war untypisch..

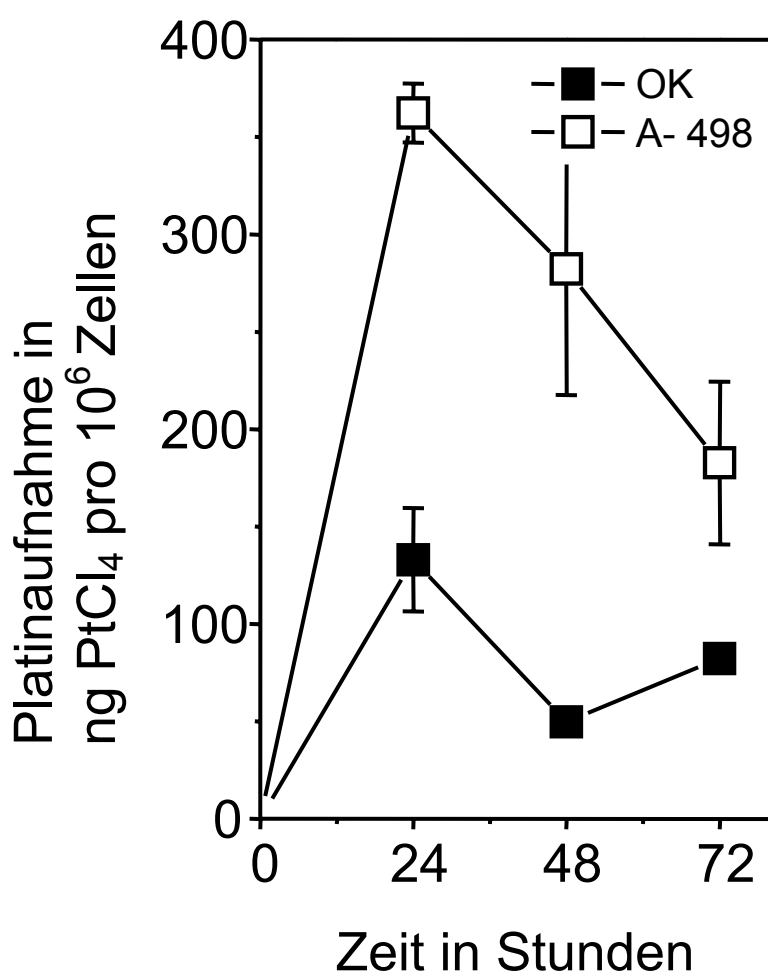


Abb. 4: Gesamtmenge von PtCl₄ pro 10⁶ Zellen in ng zwischen 0 und 72 Stunden; Ergebnis für Nierenzelllinien; Beachte die Steigerung der PtCl₄-Aufnahme nach 24 Stunden; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

3.2. Akute Toxizitätstests

Zur Bestimmung der akuten Toxizität wurden als Untersuchungskriterien die Anzahl der vitalen Zellen pro cm^2 und das durchschnittliche Zellvolumen herangezogen. Der MTT-Test und der NR-Test wurden zur Bestimmung der Enzymaktivität und damit der Menge an noch adhärenen und vitalen Zellen durchgeführt.

Um einen Vergleich der unterschiedlichen Versuche miteinander zu haben, wurde für jeden Versuch die ED_{50} bestimmt, wobei die ED_{50} die effektive Konzentration des Gefahrstoffs ist, bei der es zu einem Vitalitätsverlust von 50% der Zellen kommt.

3.2.1. Zellzahl und Zellvolumen nach 24 Stunden

Alle vier untersuchten Zelllinien wurden für jeweils 24h mit dem Gefahrstoff PtCl_4 inkubiert. Dies erfolgte in den Konzentrationen von 1-100 $\mu\text{mol/l}$. Die erhaltene Zellzahl und das Zellvolumen der Kontrollgruppe wurde jeweils 100% gleichgesetzt und die erhaltenen Werte der Proben als Prozentzahlen der Kontrolle dargestellt. Dies geschah unter anderem um die Ergebnisse der einzelnen Versuche besser miteinander vergleichen zu können.

Wie aus Abbildung 5 zu entnehmen ist, war das Ergebnis bei den Chang Liver-Zellen schon bei geringen Konzentrationen des PtCl_4 auffällig. Bei einer Gefahrstoffkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ war ein Vitalitätsverlust von 28% erreicht, bei den Konzentrationen von 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ waren nur noch 50% bzw. 45% der Zellen vital. Dies ist ein signifikanter Vitalitätsverlust und es zeigte sich eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die Toxizität bei den Hep G2-Zellen war ähnlich der der Chang Liver-Zellen. Auch bei ihnen wurde die ED_{50} bei den Konzentrationen von 50- und 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht bzw. überschritten. Bei 50 $\mu\text{mol/l}$ lag eine signifikante Zellzahlreduktion von 53% vor, bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Gefahrstoff fand sich ein ebenfalls signifikanter Vitalitätsverlust von genau 50%. Auch bei den Hep G2-Zellen zeigte sich (Abb.5) eine Dosis-Wirkungs-

Beziehung. Aus dem Ergebnis für die beiden Leberzelllinien ließ sich eine deutliche Hepatotoxizität ablesen.

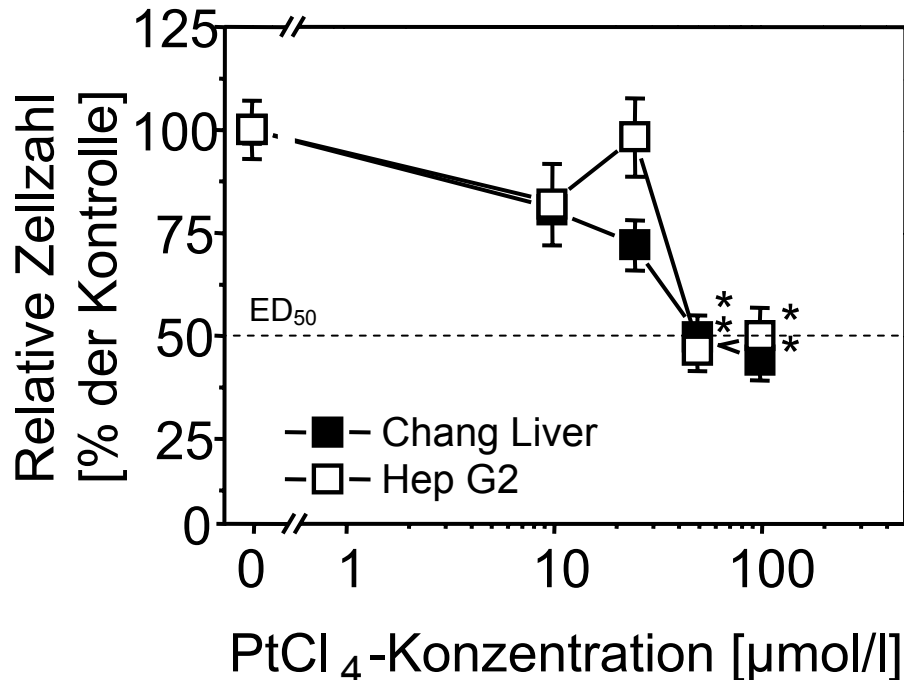


Abb. 5: Zellzahl nach 24-stündiger Exposition mit PtCl₄; die unbehandelte Kontrolle entspricht 100%; Der Graph zeigt das Ergebnis der Leberzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 2)

Die Nierenzelllinien OK und A-498 zeigten ähnliche Ergebnisse (Abb. 6). Auch bei ihnen war ein Vitalitätsverlust bei den Konzentrationen von 50-und 100 µmol/l deutlich, wobei man eine Signifikanz nur für die Zelllinie A-498 feststellen konnte, weil die S.E.M. bei der Kontrolle der OK-Zellen mit ca. 17% zu groß war. Die A-498-Zellen waren bei einer Gefahrstoffkonzentration von 50 µmol/l noch zu 2/3 adhärent und vital, bei 100 µmol/l waren es noch 50%.

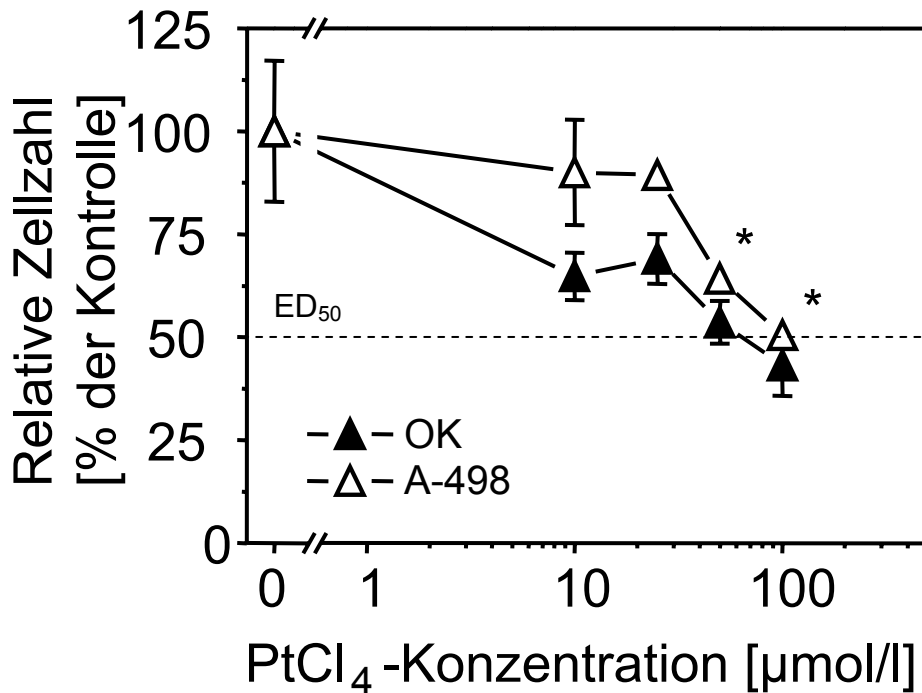


Abb. 6: Zellzahl nach 24-stündiger Exposition mit PtCl₄; die unbehandelte Kontrolle entspricht 100%; Der Graph zeigt das Ergebnis der Leberzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 2)

Die Methode zur Messung des Zellvolumens wurde ausführlich in 2.4.4. beschrieben. In diesem Versuch wurde die Kontrolle 100% gleichgesetzt, und danach die Ergebnisse der mit PtCl₄ behandelten Zellen in Prozentzahlen mit der Kontrolle verglichen. Das Absolutvolumen der Zellen der Kontrolle lag bei den vier Zelllinien bei ~140fl mittleres Volumen.

Die Ergebnisse zeigten, dass der Gefahrstoff PtCl₄ bei den Zelllinien des Leberepithels zu einer dosisabhängige Volumenzunahme führte. Aus der Abb. 7 ist ersichtlich, dass die Volumenzunahme bei den Chang Liver-Zellen mit 126,69% bei der PtCl₄-Konzentration 100 µmol/l deutlich stärker hervortrat, als bei den Hep G2-Zellen. Diese zeigten bei der Konzentration 50 µmol/l eine Volumenzunahme auf 112,6% und bei der Konzentration 100 µmol/l eine geringere Volumenzunahme auf 107,11%.

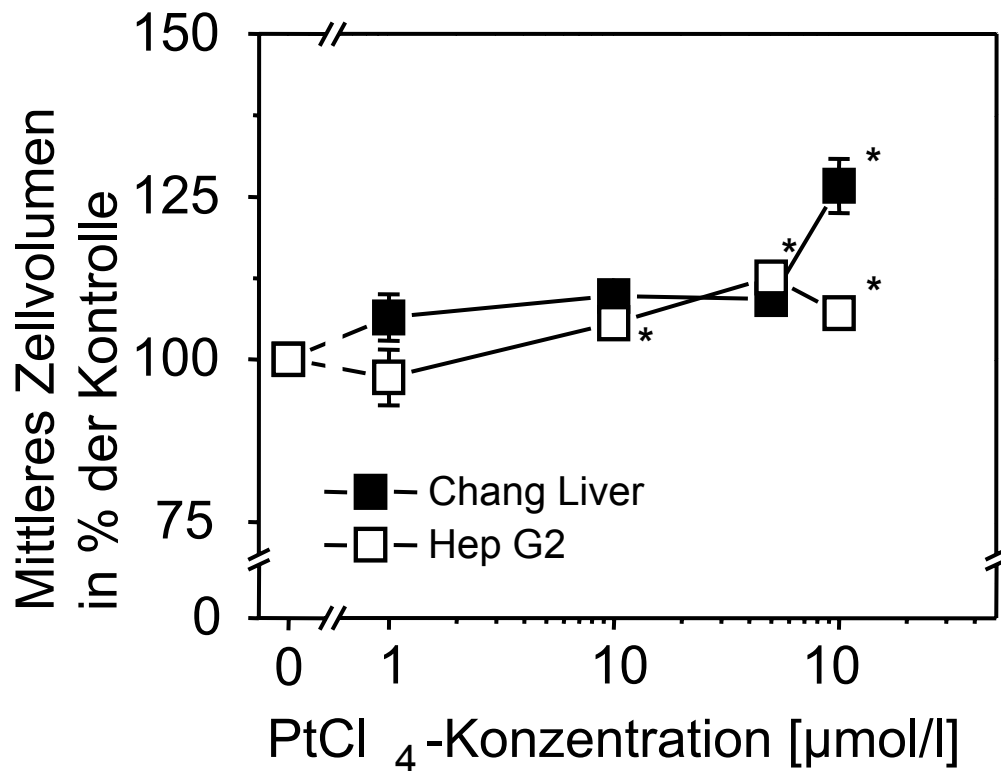


Abb. 7: Prozentuales mittleres Zellvolumen nach 24-stündiger Exposition mit PtCl₄; die unbehandelte Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnisse für Leberzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 2)

Die Nierenepithelzellreihen zeigten eine stärkere Reaktion des Zellvolumens auf die PtCl₄-Behandlung. Das Ergebnis ist aus der Abb.8 ersichtlich. Das mittlere Volumen der OK-Zellen stieg bei der Gefahrstoffkonzentration von 50 μmol/l auf 113,67% und bei 100 μmol/l auf 127,49% an. Noch stärker war die Reaktion der A-498-Zellen. Bei ihnen ergab sich bei 50 μmol/l PtCl₄ eine Volumenzunahme auf 129,3% und bei 100 μmol/l auf 142,1%. Bei beiden Nierenepithelzellreihen waren die Werte für 50- und 100 μmol/l PtCl₄ signifikant und es war eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung feststellbar..

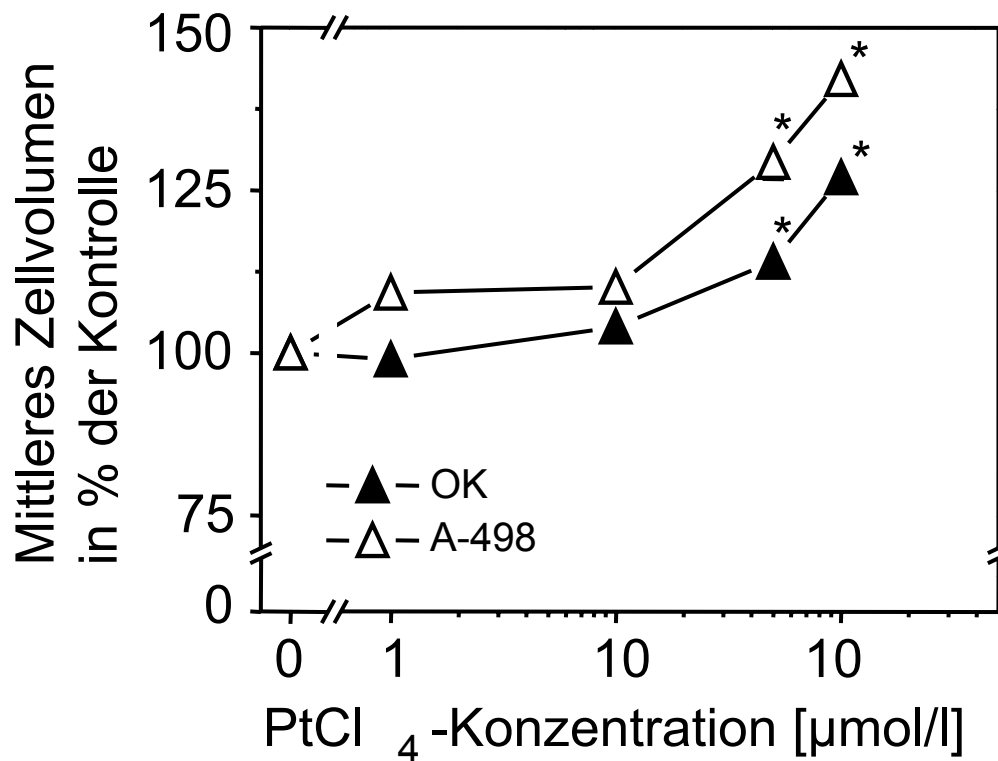


Abb. 8: Prozentuales mittleres Zellvolumen nach 24-stündlicher Exposition mit PtCl₄; die unbehandelte Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnisse für Nierenzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 2)

3.2.2. MTT-Test nach 24 Stunden

Beim MTT-Test wurde als Maß der Vitalität der vier Zelllinien der Farbumsatz der mitochondrialen Dehydrogenase verwendet. Der in 2.4.3. beschriebene Mechanismus bildet die Grundlage dafür. Die Bestimmung erfolgte über die Aktivität der Dehydrogenase bei der unbehandelten Kontrolle beziehungsweise den Proben mit verschiedenen Konzentrationen des Gefahrstoffs PtCl₄. Die Extinktionswerte der Kontrolle wurden 100% gleichgesetzt, die Versuchswerte jeweils in relativen Zahlen dazu. Dies war wichtig, um die einzelnen Ergebnisse bewerten zu können. Um die Reaktionen unterschiedlicher Zelllinien vergleichen zu können wurde zusätzlich die ED₅₀ ermittelt.

Für die beiden Leberepithelzelllinien wurden eine signifikante Reduktion der Zellaktivität, gemessen über den Substratumsatz der MTT-Lösung, ab Konzentrationen von 50 μmol/l PtCl₄ für Chang Liver-Zellen und 100 μmol/l

PtCl₄ für Hep G2-Zellen festgestellt. Die Abbildung 9 zeigt die Graphik der beiden Leberzelllinien. Die Reduktion der Zellvitalität von Chang Liver-Zellen lag nach 50 µmol/l bei 10,8%, nach 100 µmol/l bei 38,1%, nach 200 µmol/l bei 62,05% und nach 400 µmol/l bei 76,9%. Die Vitalität der Hep G2-Zellen und deren Substratumsatz lag unter der Konzentration von 100 µmol/l PtCl₄ bei 80,63% unter 200 µmol/l bei 55,45% und unter 400 µmol/l PtCl₄ nur noch bei 23,07%. Hier zeigte sich eine eindeutige Dosisabhängigkeit der Toxizität. Die ED₅₀ lag für die Chang Liver-Zellen bei 150 µmol/l PtCl₄ und für die Hep G2-Zellen bei 220 µmol/l.

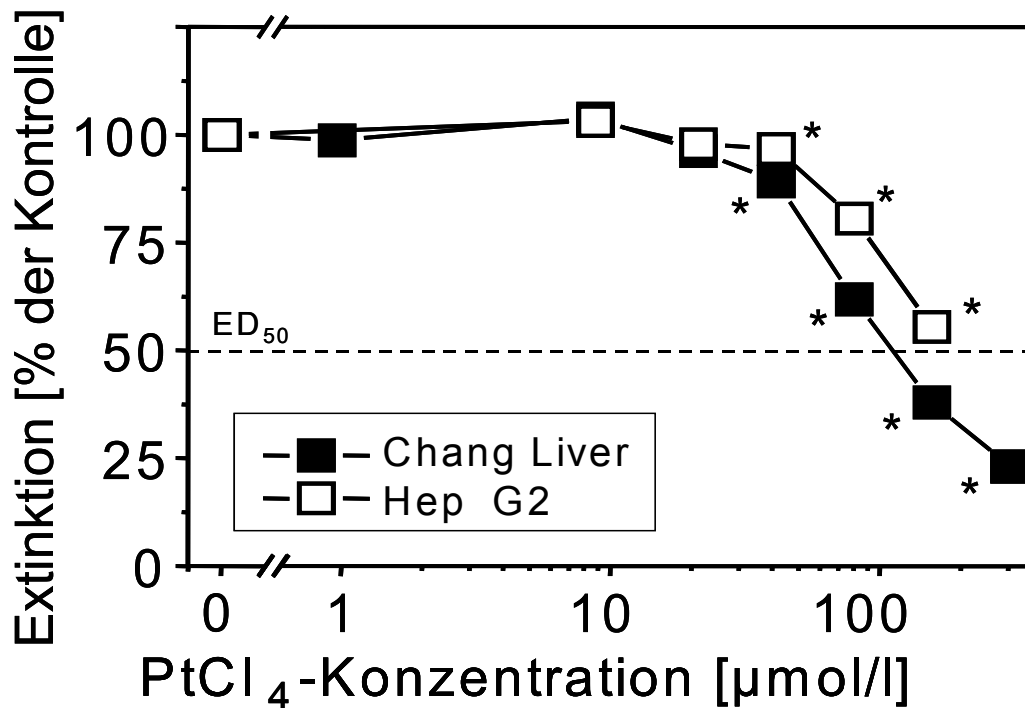


Abb. 9; MTT-Test nach 24-stündiger Exposition mit PtCl₄; die Extinktion der unbehandelten Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnis der Leberzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

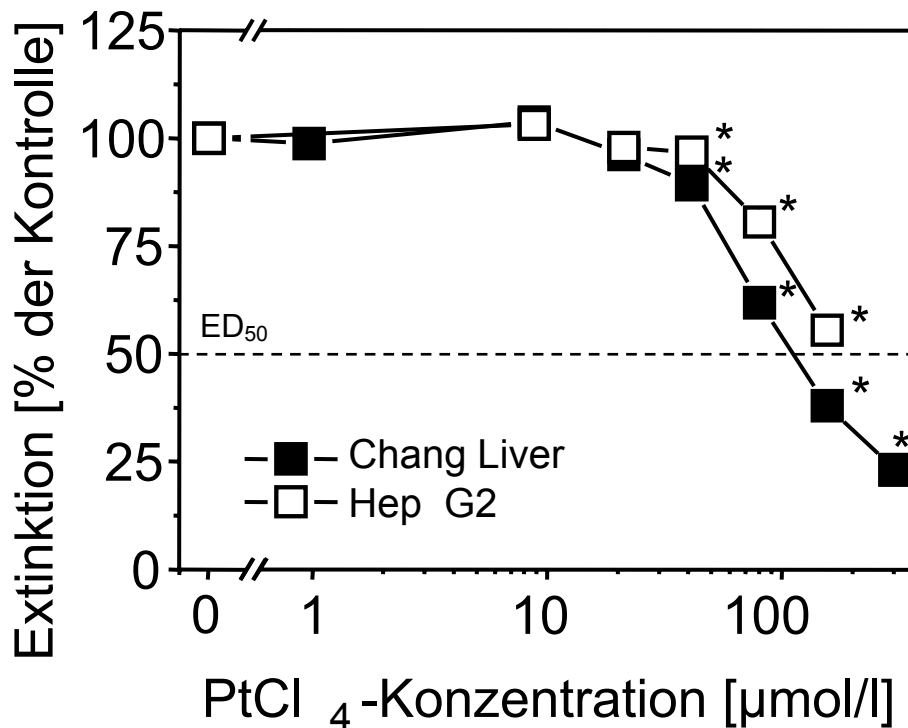


Abb. 9: MTT-Test nach 24-stündiger Exposition mit PtCl₄; die Extinction der unbehandelten Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnis der Leberzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

Die Ergebnisse der Nierenepithelzelllinien entsprachen zum größten Teil denen der Leberepithelzellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Sowohl OK-Zellen als auch A-498-Zellen zeigten eine signifikante Reduktion der vitalen adhären Zellen. Bei den OK-Zellen zeigte sich die Zellreduktion ab der Konzentration 50 µmol/l PtCl₄ auf 83,05% der Kontrolle. Bei 100 µmol/l sank die Zellüberlebensrate auf 71,29%, Bei 200 µmol auf 49,72% und bei 400 µmol/l auf 34,04%. Die ED₅₀ lag bei 200 µmol/l PtCl₄. A-498-Zellen zeigten erst bei den Konzentrationen von 200 µmol/l PtCl₄ und 400 µmol/l PtCl₄ eine signifikante Reaktion auf den Gefahrstoff. Die Reduktion der Vitalität bei 200 µmol/l entsprach 55,59% der unbehandelten Kontrolle, bei 400 µmol/l waren noch 28,09% der Zellen vital. Die ED₅₀ lag bei ca. 220 µmol/l PtCl₄.

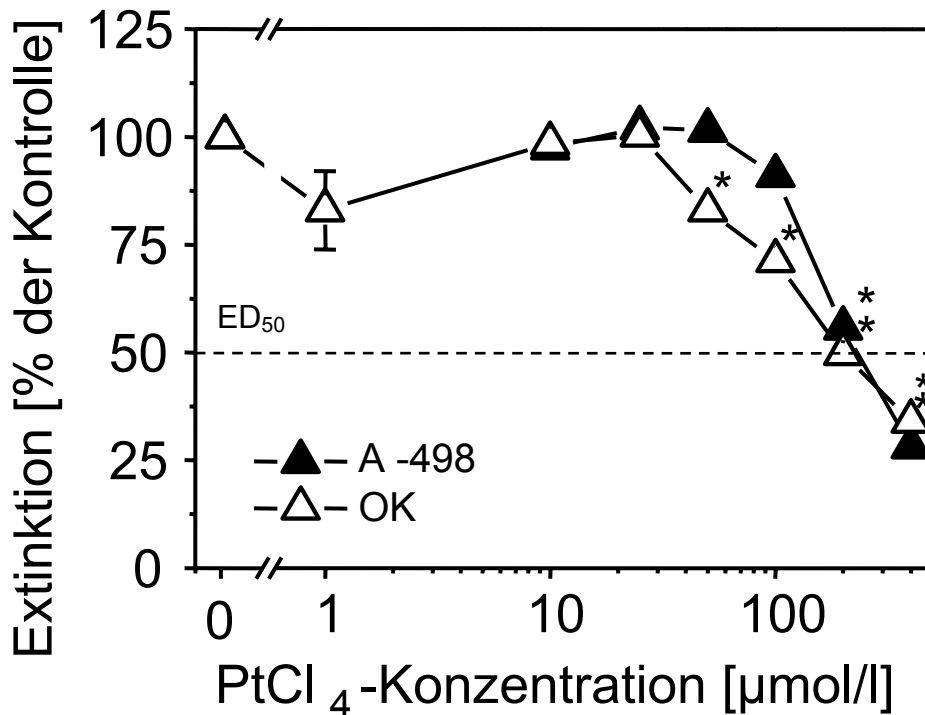


Abb. 10: MTT-Test nach 24-stündiger Exposition mit PtCl₄; die Extinktion der unbehandelten Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnis der Nierenzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

3.2.3. Neutralrot-Test nach 24 Stunden

Auch bei diesem Test wurde, ähnlich dem MTT-Test, eine enzymatische Reaktion zur Vitalitätsbestimmung der einzelnen Zelllinien herangezogen. Im Falle des NR-Tests findet der Substratumsatz jedoch innerhalb der Lysosomen statt. Der genaue Mechanismus ist unter 2.4.2. beschrieben. Die Bestimmung der Zellaktivität erfolgte auch hier in Abhängigkeit der Extinktion der unbehandelten Kontrollpopulation, welche 100% gleichgesetzt wurde. Die Ergebnisse wurden in relativen Prozentzahlen zur Kontrolle ausgerechnet und die ED₅₀ ermittelt.

Der Kurvenverlauf in Abb. 11 zeigt auf, dass die Chang Liver-Zellen schon bei einer Konzentration von 100 µmol/l PtCl₄ einen deutlichen Vitalitätsverlust erfuhren. Bei den Konzentrationen von 100 und 200 µmol/l waren jeweils nur

noch 55,31% bzw. 28% der Zellen vital und adhären. Die ED₅₀ für die Chang Liver-Zellen lag für diesen Versuch bei 110 µmol/l PtCl₄. Es war ein deutlicher Vitalitätsverlust ablesbar. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung ist aus dem Kurvenverlauf eindeutig erkennbar.

Die Kurve für die zweite Leberzelllinie Hep G2 ist ebenfalls in Abb.11 dargestellt. Auch hier gab es bei den geringen Gefahrstoffkonzentrationen keinen signifikanten Vitalitätsverlust, sondern tendenziell eher eine geringe Zunahme des Substratumsatzes. Die Platinkonzentration von 100 und 200 µmol/l führte zu einer Einschränkung der Vitalität auf 72,3% beziehungsweise 21,89%. Die ED₅₀ lag bei 150 µmol/l. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung ist aus der Abbildung ersichtlich.

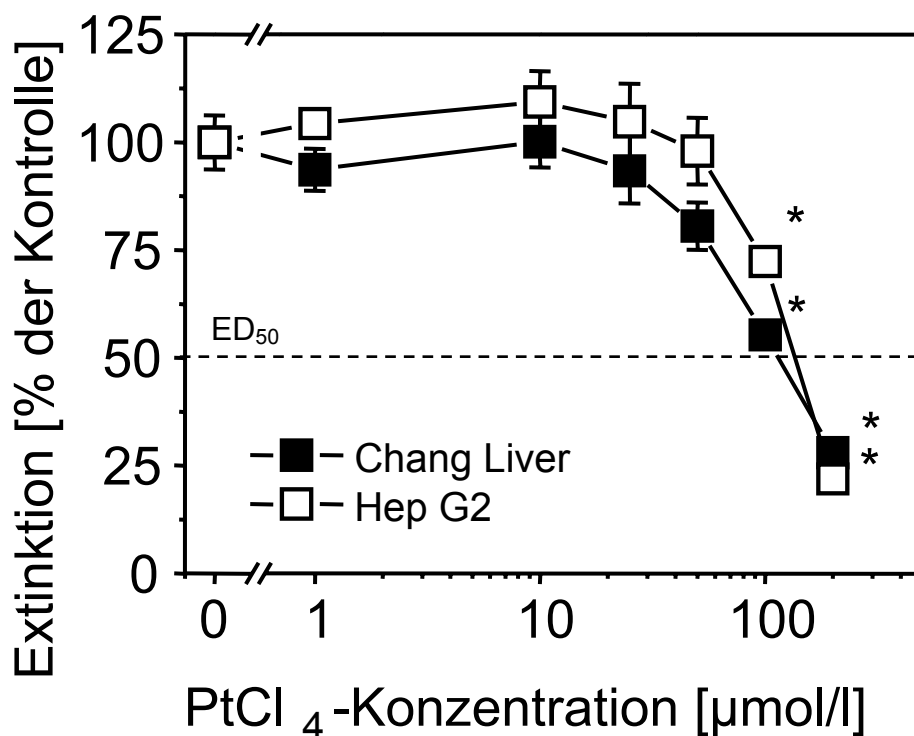


Abb. 11: Neutralrot-Test nach 24-stündiger Exposition mit PtCl₄; die Extinktion der unbehandelte Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnis der Leberzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

Die Abb. 12 stellt die Ergebnisse für die Nierenzelllinien OK und A-498 dar. Sie waren uneinheitlich. Die OK-Zellen wiesen in den Konzentrationen 1-10 µmol/l

des Gefahrstoffs keine signifikanten Unterschiede zum Ergebnis der unbehandelten Kontrolle auf. Ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 stieg der lysosomale Substratumsatz auf einen signifikanten Wert von 111,93% an. Auch bei den darauf folgenden Konzentrationen 50, 100, 200 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 war der verstärkte Substratumsatz signifikant. Er lag nach Zugabe von 50 $\mu\text{mol/l}$ bei 119,73%, nach 100 $\mu\text{mol/l}$ bei 115,6% und nach 200 $\mu\text{mol/l}$ bei 116,13%. Daraus folgt, dass bei der OK-Zelllinie keine Dosis-Wirkungs-Beziehung bestand und im Gegensatz zu allen anderen getesteten Zelllinien keine Abnahme sondern eine Zunahme der enzymatischen Aktivität vorhanden war. Die A-498-Zellreihe zeigte ab der Konzentration 50 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 einen signifikanten Aktivitätsverlust auf 56,88%. Bei 100 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 war der Substratumsatz noch 60,09%, wobei er bei der höchsten Gefahrstoffkonzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ wieder auf 85,67% anstieg. Auch hier konnte keine Dosis-Wirkungs-Beziehung postuliert werden.

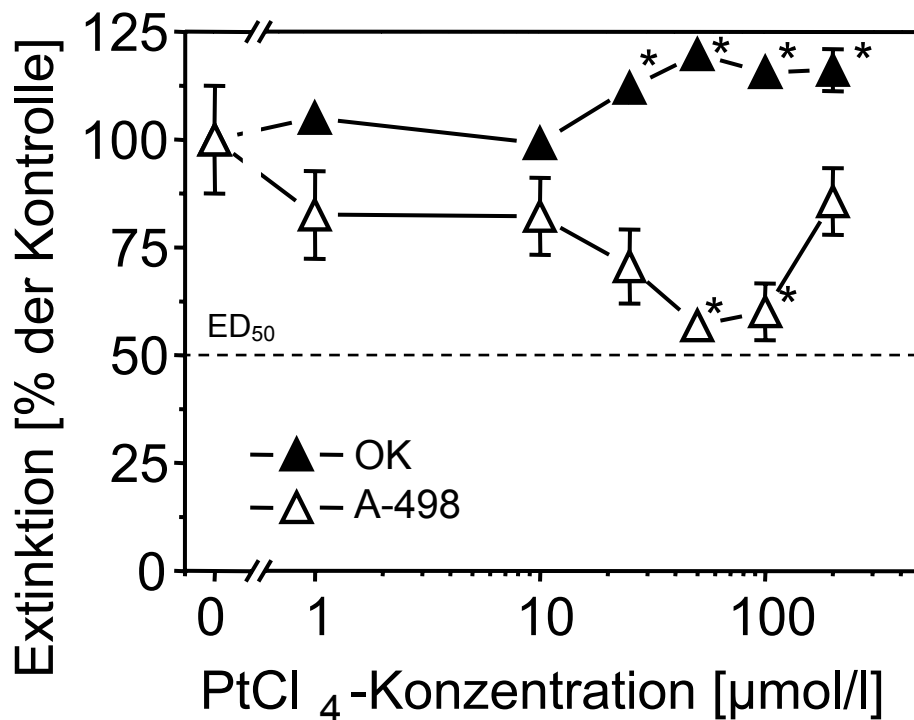


Abb. 12: Neutralrot-Test nach 24-stündiger Exposition mit PtCl_4 ; die Extinktion der unbehandelte Kontrolle wurde 100%; Ergebnis der Nierenzelllinien; (Mittelwert \pm S.E.M.; * $p \leq 0,05$; $n = 3$)

3.3. Langzeittoxizität

Um die Reaktion der Zelllinien auf eine verlängerte Expositionszeit zu testen, wurde bei gleich bleibenden Versuchsbedingungen wie unter 3.2.2. und 3.2.3. die Expositionszeit auf 72 Stunden ausgedehnt. In dieser Versuchsanordnung wurden nur MTT-Test und NR-Test durchgeführt. Auch in diesen Versuchen wurde die ED₅₀ ermittelt, um Vergleiche zwischen den einzelnen Zelllinien und zwischen den verschiedenen Expositionszeiten anstellen zu können.

3.3.1. MTT-Test nach 72 Stunden

Die Ergebnisse der 72-Stunden-Versuche der vier Zelllinien sind in den Abbildungen 13 für die Leberepithelzellreihen und in Abbildung 14 für die Nierenepithelzellreihen dargestellt. Bei beiden Organen war für PtCl₄ eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung feststellbar. Dabei fiel auf, dass für die Leberzellen eine weit geringere Dosis des Gefahrstoffs nötig war, um die ED₅₀ zu erreichen. Dies ist ein Zeichen für eine verstärkte Hepatotoxizität. Beide Leberepithelzelllinien hatten signifikante Werte ab einer PtCl₄-Konzentration von 10 µmol/l. Die ED₅₀ wurde bei Chang –Liver Zellen bei 45 µmol/l erreicht, die für Hep G2-Zellen lag bei 70 µmol/l. Die Reduktion der Vitalität der Chang Liver-Zellen lag bei 10 µmol/l PtCl₄ noch bei 87,45%, bei 25 µmol/l bei 63,89% bei 50 µmol/l bei 46,8% bei 100 µmol/l bei 16,76% und bei 200 µmol/l nur noch bei 0,69% der unbehandelten Kontrolle.

Ein ähnliches Ergebnis fand sich bei Hep G2-Zellen. Die Vitalitätsreduktion war nicht so auffällig wie bei den Chang Liver-Zellen. Bei einer Schadstoffkonzentration von 10 µmol/l PtCl₄ war der Substratumsatz 72,22% der Kontrollgruppe, 25 µmol/l reduzierten auf 73,29%, 50 µmol/l auf 58,08%, 100 µmol/l auf 37,29% und 200 µmol/l auf 8,13%.

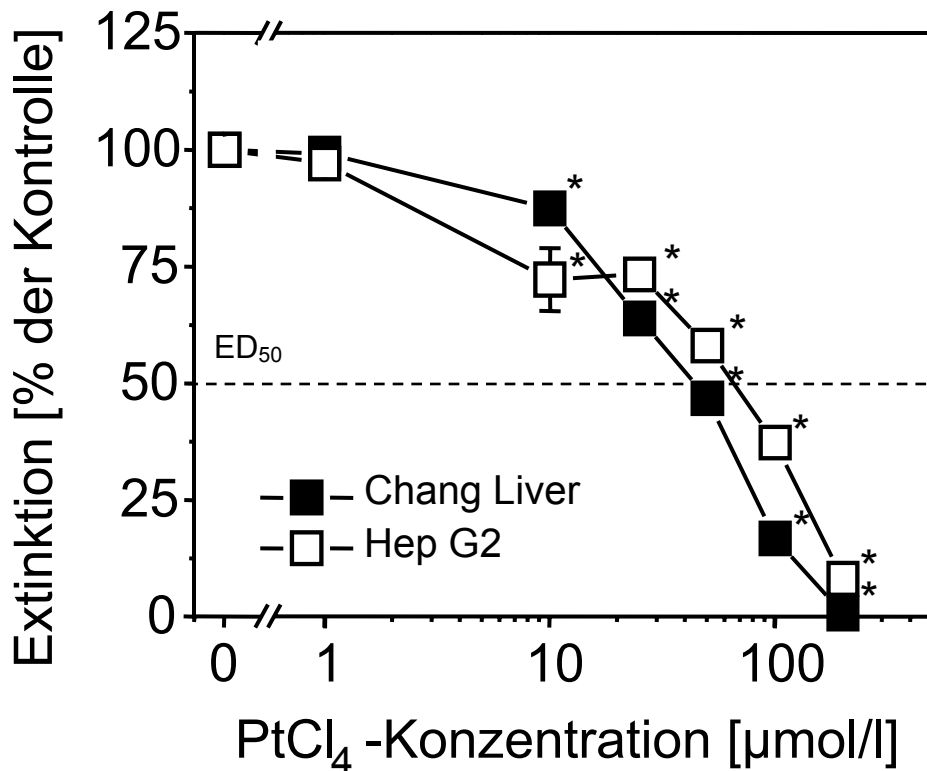


Abb. 13: MTT-Test nach 72-stündiger Exposition mit PtCl₄; die Extinktion der unbehandelten Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnis der Leberzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

Die Nierenepithelzellen zeigten (Abb. 14) ein anderes Bild, vor allem in den niedrigen PtCl₄-Konzentrationen. Erst ab 50 µmol/l gab es bei beiden Zellreihen eine signifikante Reduktion der Zellvitalität. Die OK-Zellen waren bei 50 µmol/l noch zu 2/3 vital und adhärent, 100 µmol/l ergaben eine Reduktion auf 46,97%, bei 200 µmol/ PtCl₄ waren noch 18,28% der Zellen vital. Die ED₅₀ der OK-Zellen lag bei 94 µmol/l Platin(IV)chlorid. Noch schwächer fiel die Reaktion bei den A-498-Zellen aus. 50 µmol/l PtCl₄ reduzierten die Zellpopulation um 15,7% der Kontrolle. 61% der Zellen war bei 100 µmol/l noch vital und bei 200 µmol/l sank die Zellüberlebensrate auf 33,77%. Auch die ED₅₀ lag mit 142 µmol/l PtCl₄ deutlich über der der anderen Zellreihen.

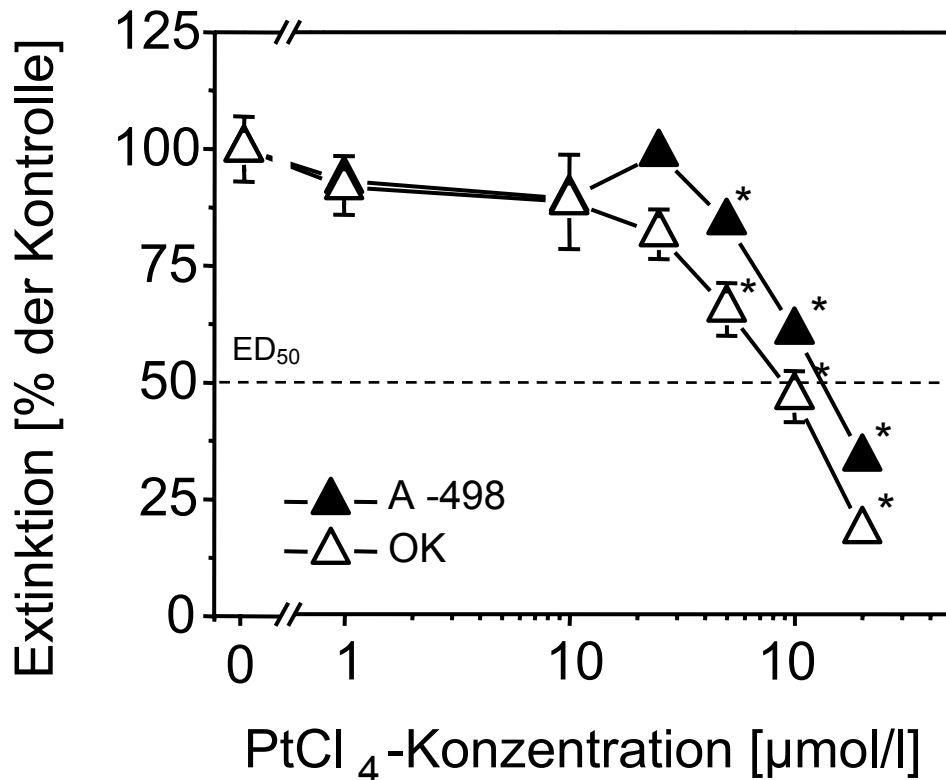


Abb. 14; MTT-Test nach 72-stündiger Exposition mit PtCl₄; die Extinktion der unbehandelten Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnis der Nierenzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

3.3.2. Neutralrot-Test nach 72 Stunden

Die Ergebnisse des 3-tägigen NR-Tests sind in Abbildung 15 und 16 jeweils für Leberzellreihen und Nierenzellreihen dargestellt. Der Ablauf des Tests wurde in 3.2.3. schon beschrieben.

Für die Leberepithelzellen (Abb.15) ergab sich ein einheitliches Bild mit einer Dosis-Wirkungs-Beziehung, einer ED₅₀ für die Chang-Liver-Zellen von 70 µmol/l PtCl₄ und einer ED₅₀ von 125 µmol/l für die Hep G2-Zellen. Signifikante Zellzahlreduktionen fanden sich ab Platinkonzentrationen von 25 µmol/l mit 79,09%, 50 µmol/l mit 60,53%, 100 µmol/l mit 32,8% und 200 µmol/l mit 11,09% der Kontrolle. Die Hep G2-Zellen reagierten erst mit einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität ab Gefahrstoffkonzentrationen von 100 µmol/l. Bei dieser Konzentration waren noch 58,76% der Zellen vital, bei 200 µmol/l noch 22,41%.

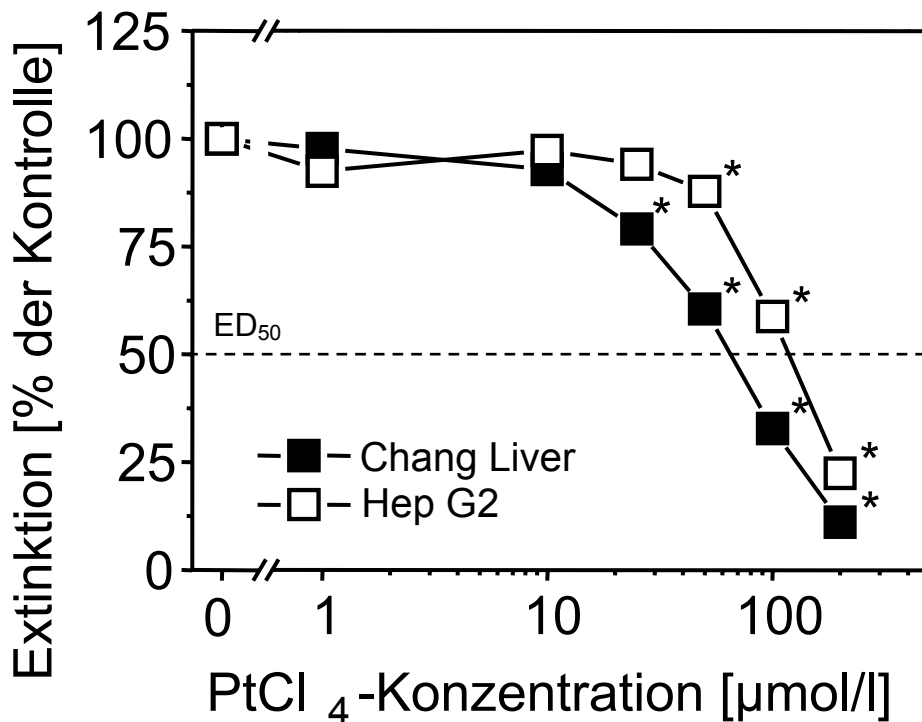


Abb. 15: Neutralrot-Test nach 72-stündiger Exposition mit PtCl₄; die Extinktion der unbehandelten Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnis der Leberzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

Ein uneinheitlicheres Bild ergab sich wie aus Abbildung 16 ersichtlich aus den Ergebnissen der Nierenepithelzelllinien. Die OK-Zellen zeigten eine signifikante Wachstumssteigerung bei einer Platin(IV)chloridkonzentration von 10 µmol/l mit einer Erhöhung der Zellvitalität auf 128,04% der Kontrolle. Danach zeigte sich eine deutliche Abnahme der Zellvitalität bei 100 µmol/l PtCl₄ auf 46,6% und bei 200 µmol/l auf 11,34% der Kontrolle. Die ED₅₀ für die OK-Zellen lag bei 95 µmol/l PtCl₄. Bei den A-498-Zellen war die Auswertung der Ergebnisse sehr schwierig. Durch den sehr hohen Standardfehler des Mittelwerts (22,94%) der Kontrolle waren kaum signifikante Ergebnisse zu erzielen. Erst bei 100 µmol/l und 200 µmol/l PtCl₄ konnte eine Signifikanz errechnet werden. Diese hatte aber im Photometer eine geringere optische Dichte als die Kontrollösung. Deshalb kam man bei den Ergebnissen zu negative Prozentzahlen, die im Schaubild als 0% angegeben wurden. Die ED₅₀ lag bei den A-498-Zellen bei 43 µmol/l.

Tendenziell konnte für beide Nierenepithelzellreihen bei den geringen Konzentrationen eine Zunahme der Zellvitalität, und erst ab höheren Konzentrationen eine starke Reduktion der Vitalität beobachtet werden.

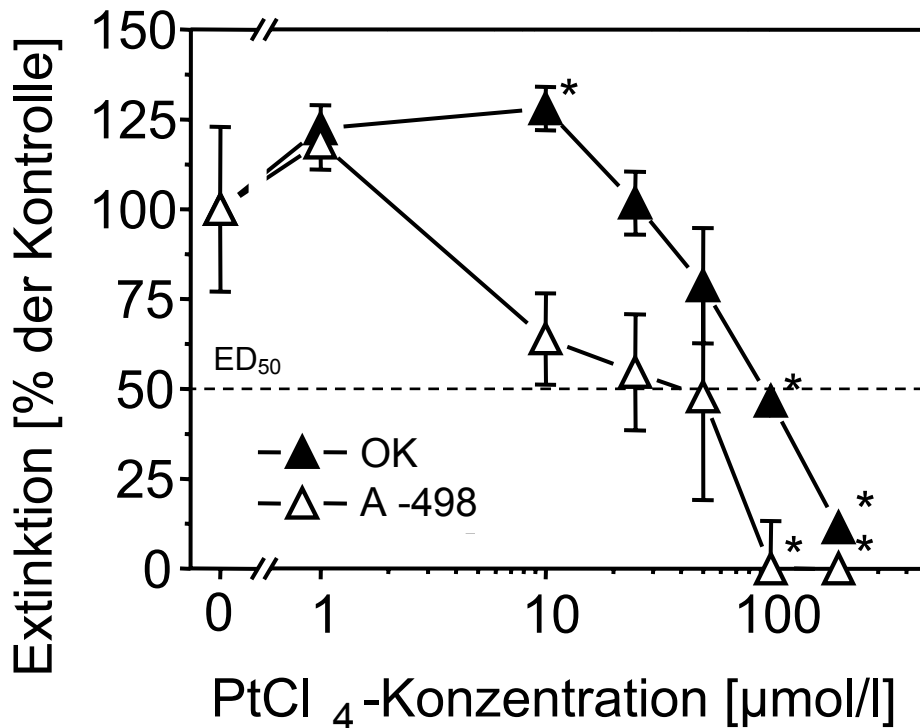


Abb. 16: Neutralrot-Test nach 72-stündiger Exposition mit PtCl₄; die Extinktion der unbehandelten Kontrolle wurde 100% gleichgesetzt; Ergebnis der Nierenzelllinien; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

3.3.3. Zellmigrationsverhalten nach 4-tägiger Exposition

Das Zellwanderungsverhalten der vier Zelllinien wurde zur Differenzierung sowohl der Organspezifität von PtCl₄, als auch der Unterscheidung zwischen den Zelllinien des gleichen Organs untersucht. Wie unter 2.5.2. beschrieben wurde eine „künstliche Wunde“ geschaffen und die in den zellfreien Raum migrierten Zellen nach Anzahl und Wanderungsstrecke bewertet. Die Beurteilung der Zellen erfolgte vier Tage nach Schaffung der Wunde. Die als Einzelzellen wandernde A-498 und Chang Liver-Zellen wurden zur Erfassung der Migrationsstrecke in Blöcke unterteilt, um die Distanz zum ursprünglichen

Wundrand zu erhalten. Die Länge eines Blockes betrug 240 μm , die Breite jeweils 480 μm .

Der Versuch zur Bewertung der Zellmigration bei den Hep G2-Zellen war nicht durchführbar, da sich die Zellen zum Großteil vom Boden des Kulturgefäßes lösten und an den noch teilweise erhaltenen Wundrändern keinerlei migratorische Aktivität der Zellen zu erkennen war.

Die Chang Liver-Zellen migrierten ausgehend von der Schnittkante der „künstlichen Wunde“ nicht als Migrationsfront sondern als Einzelzellen. Die Anzahl der jeweils pro Block (B1-B4) ausgewanderten Zellen sind in Abb. 17 dargestellt. In B1 (0-240 μm) waren es 51 Zellen, in B2 (241-480 μm) noch 37, und in B3 (481-720 μm) noch 6 Zellen. In B4 (721-960 μm) waren keine Zellen mehr sichtbar. Eine deutliche Verringerung zeigt sich schon bei der Gefahrstoffkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 (Block B1-B4). Mit 41 Zellen in B1, 24 Zellen in B2, 5 Zellen in B3 2 Zellen und in B4 war hier sowohl die Gesamtzahl, als auch in geringerem Maße die Wanderungsstrecke vermindert. Bei 25 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 setzte sich diese Tendenz fort (Block B1-B3). In B1 waren noch 21 Zellen migriert, in B2 noch 5 und in B3 noch 1 Zelle. Bei 50 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis (Block B1-B3). B1 mit 21 Zellen, B2 mit 3 Zellen, B3 mit einer Zelle. Bei einer Schadstoffkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ ging die Zahl der ausgewanderten Zellen noch einmal auf 12 Zellen in Block 1, einer Zelle in Block 2 und einer Zelle in Block 3 zurück. Bei 200 $\mu\text{mol/l}$ waren im Block 1 noch 4 Zellen eingewandert, in Block 2 noch 3 Zellen und in Block 3 noch 2 Zellen. Die Ergebnisse zeigten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der verschiedenen Dosen auf die Wanderungsstrecke und die Anzahl der pro Block migrierten Zellen.

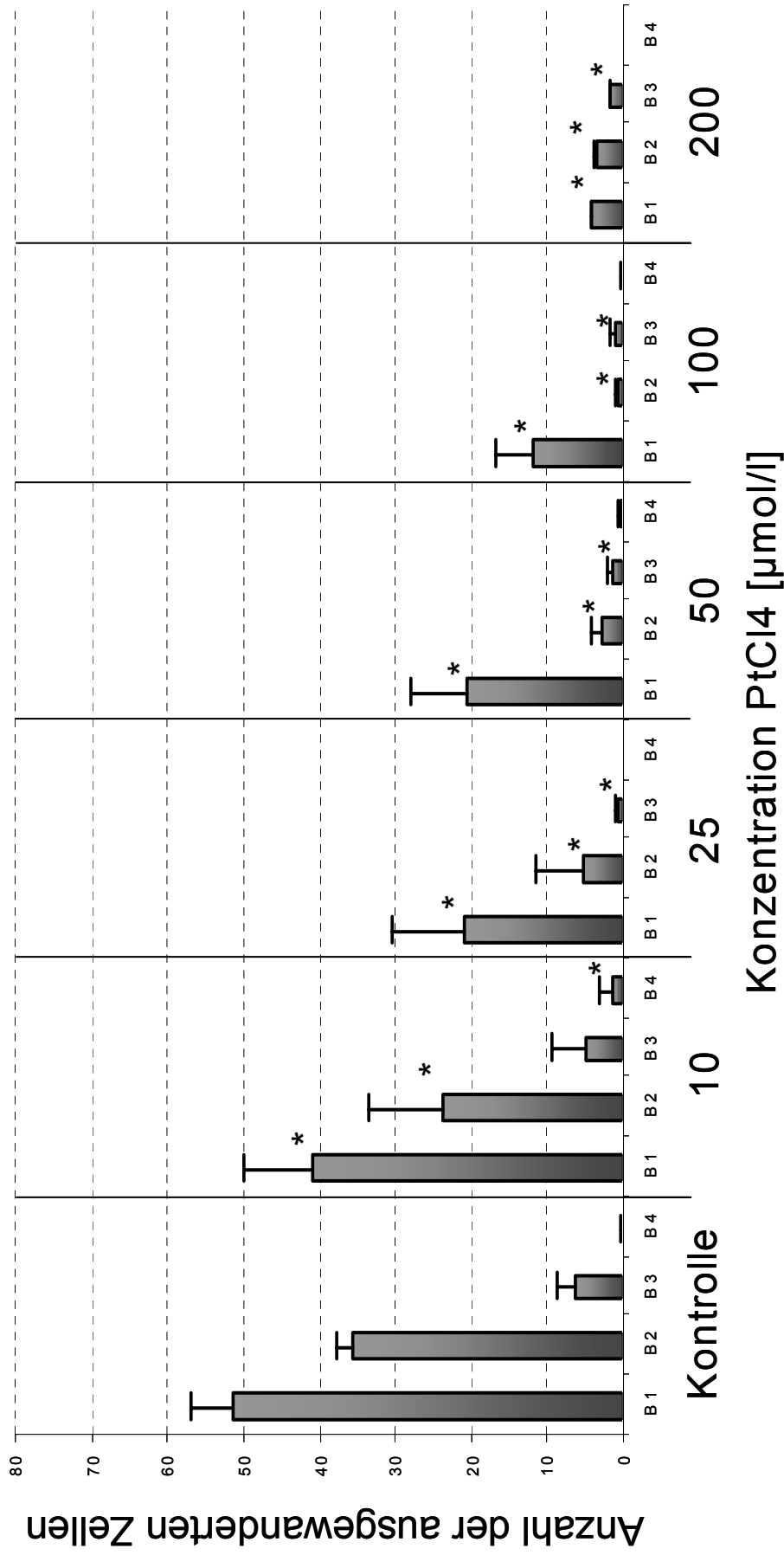


Abb. 17: Anzahl der migrierten Chang Liver Zellen nach 96-stündiger Exposition mit PtCl₄; Auf der X-Achse wurde die Konzentration von PtCl₄ aufgetragen; Auf der Y-Achse wurde die Anzahl der Zellen aufgetragen; Block 1- Block 5 (B1-B5) repräsentieren eine Fläche von jeweils 240 auf 480 μm, die vertikal gestapelt wurden, wobei in Block 1 die Zellen mit der kürzesten und in Block 5 die Zellen mit der längsten Migrationstrecke aufgetragen sind; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 2)

Die A-498-Zellen führten zu einem gänzlich anderen Bild. Obwohl auch sie als Einzelzellen migrierten, war die Anzahl der ausgewanderten Zellen und deren Wanderungsstrecke nach PtCl₄ Zugabe eindeutig erhöht (Abbildung 18, jeweils in Block B1-B5). Das Verfahren war das gleiche wie für die Chang-Liver-Zellen. Die Kontrolle zeigte im B1 (0-240 µm) die Anzahl von 28 migrierten Zellen, im B2 (241-480 µm) waren es 23 Zellen, im B3 (481-720 µm) waren es 9 und im B4 (721-960 µm) noch 2. In B5 (961-1200 µm) waren keine Zellen mehr migriert (Abb. 18).

Schon bei einer Gefahrstoffkonzentration von 10 µmol/l PtCl₄ zeigten die A-498 Zellen eine signifikant verstärkte Migrationsaktivität. Sowohl die Anzahl der migrierten Zellen als auch die Migrationsstrecke nahmen zu. Dies wird aus der Abb. 18 ersichtlich. Der gleiche Trend setzte sich auch bei zunehmender Gefahrstoffkonzentration fort. Nur bei einer Gefahrstoffkonzentration von 200 µmol/l PtCl₄ konnte eine minimale Reduktion der Zellmigration, sowohl in der Anzahl der ausgewanderten Zellen als auch in der Migrationsstrecke beobachtet werden.

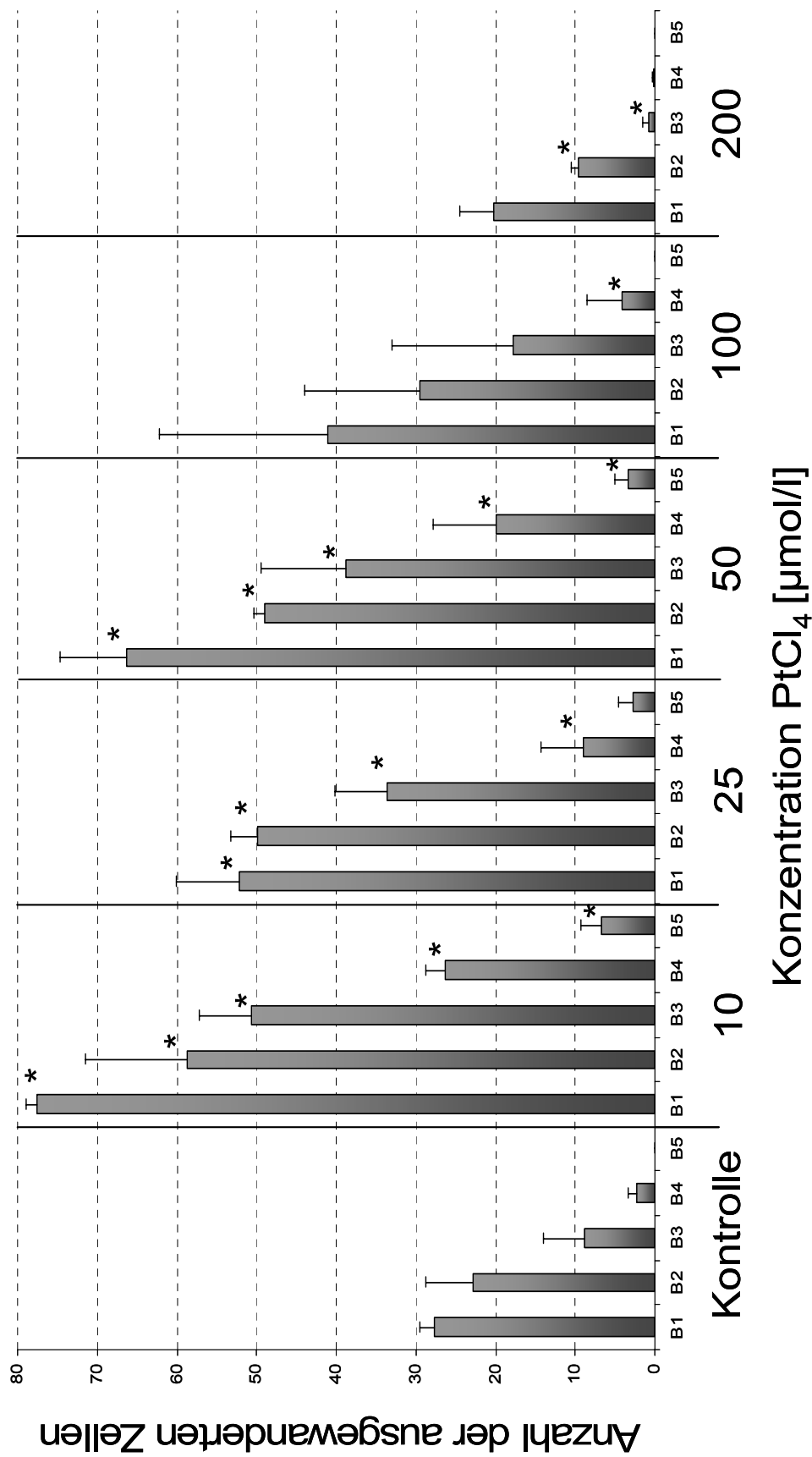


Abb. 18: Anzahl der migrierten A-498 Zellen nach 96-stündiger Exposition mit PtCl₄; Auf der X-Achse wurde die Konzentration von PtCl₄ aufgetragen; Auf der Y-Achse wurde die Anzahl der Zellen aufgetragen; Block 1- Block 5 (B1-B5) repräsentieren eine Fläche von jeweils 240 auf 480 µm, die vertikal gestapelt wurden, wobei in Block 1 die Zellen mit der kürzesten und in Block 5 die Zellen mit der längsten Migrationstrecke aufgetragen sind; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 2)

Bei den OK-Zellen, die als Zelllayer migrierten, wurde die jeweilige Wanderungsstrecke der Zellfront bestimmt. Die Gesamtzahl der migrierten Zellen konnte nicht ermittelt werden. Das Bild, das die Kurve in Abbildungen 19 ergibt ist nicht sehr aussagefähig, da die S.E.M. durch die niedrige n-Anzahl entsprechend hoch ist. Tendenziell lässt sich jedoch postulieren, dass es nur bei der höchsten Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 zu einer signifikanten Abnahme der Migrationsstrecke kommt.

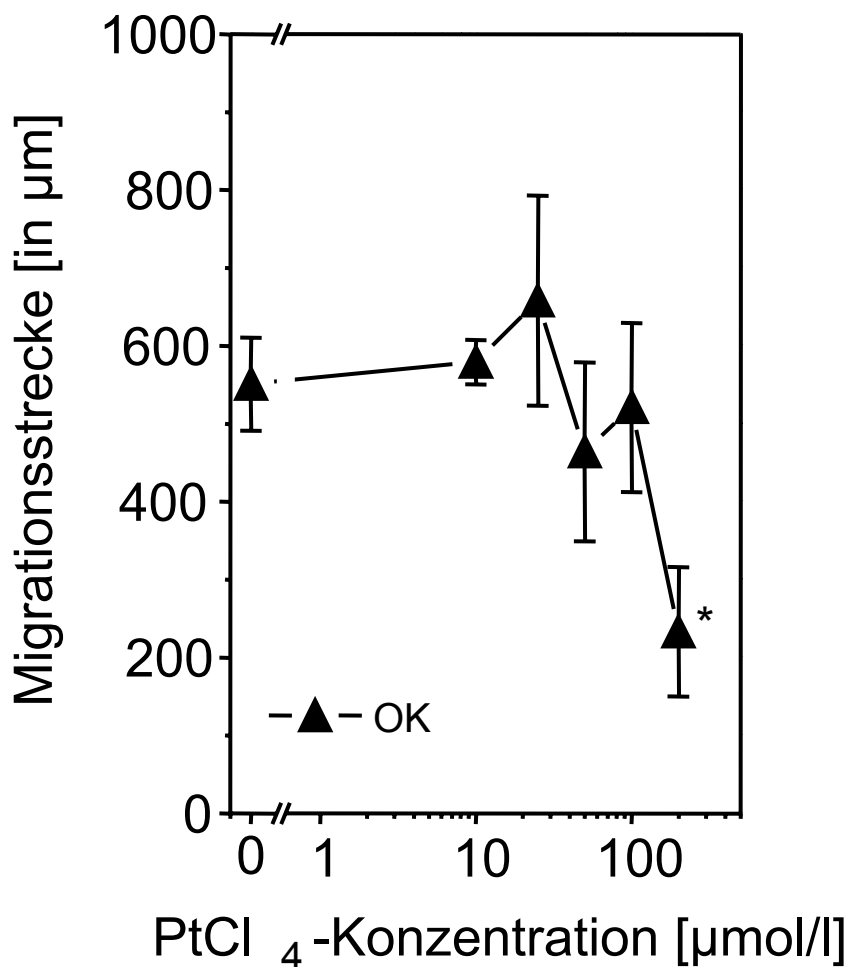


Abb.19: Gesamtmigrationsstrecke nach 96-stündiger Exposition mit PtCl_4 ; Ergebnis für OK-Zellen; (Mittelwert \pm S.E.M.; * $p \leq 0,05$; $n = 2$)

3.3.4. Zellklonierung

Die Klonierungseffizienz und das Klonierungsverhalten der vier Zelllinien wurde durchgeführt wie unter 2.5.2. beschrieben. Um ein möglichst differenziertes Ergebnis zu erhalten wurde für jede Zelllinie neben den unterschiedlichen Konzentrationen die Zahl der ausgesäten Zellen zwischen 500, 1000 und 2000 Zellen variiert. Zur Auswertung kamen nur Zellklone mit einer Größe von mehr als 1 mm Durchmesser. Dies entspricht einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen. Alle kleineren Zellklone wurden für die Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Bei den Zellen der Zelllinie A-498 ließ sich die Klonierungseffizienz und das Klonierungsverhalten nicht feststellen, da die Zellen nicht als fest umrissene Zellklone, sondern als unscharf begrenzte, ineinander übergehende Flächen wuchsen.

Die Klonierungseffizienz der drei anderen Zelllinien wurde mit der in 2.5.4. beschriebenen Formel berechnet. Eine starke Reaktion zeigten die beiden Leberzelllinien auf den Gefahrstoff PtCl_4 . Die Schaubilder (Abb.20 und 21) verdeutlichen schon ab der geringsten Platinkonzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ eine Reduktion der Klonierungseffizienz. Bei den Chang Liver-Zellen fand sich ab $10 \mu\text{mol/l}$ PtCl_4 eine signifikante Reduktion von 66,4%, bei der Kontrolle auf 43,5%. Bei $25 \mu\text{mol/l}$ PtCl_4 waren es noch 10,1%, bei $50 \mu\text{mol/l}$ PtCl_4 noch 2,28%, bei $100 \mu\text{mol/l}$ PtCl_4 noch 1,05% Klonierungseffizienz. Bei $200 \mu\text{mol/l}$ PtCl_4 war keinerlei Aktivität und Klonbildung mehr zu erkennen. Abbildung 20 zeigt diese Abnahme und die Dosis-Wirkungsbeziehung

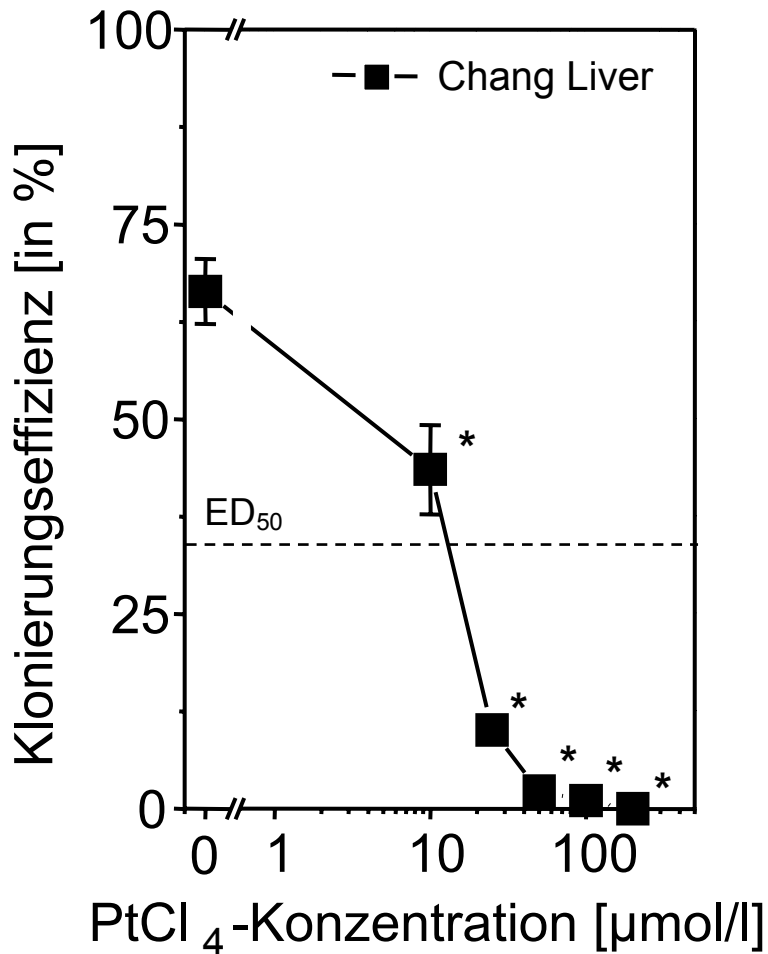


Abb. 20: Klonierungseffizienz in % nach 9-tägiger Exposition mit PtCl₄; Beachte die dosisabhängige Reduktion der Klonzahl; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

Bei den Hep G2-Zellen war bei den Kontrollzellen eine sehr hohe Klonierungseffizienz zu erkennen. Sie lag bei 253,8%. Wie schon bei den Chang Liver-Zellen kam es auch hier zu einem steilen Abfall der Kurve (Abbildung 21), wobei ein signifikanter Wert ab einer Konzentration von 25 µmol/l PtCl₄ erreicht wurde. Er lag bei 119,6%. Bei einer Gefahrstoffkonzentration von 50 µmol/l war die Klonierungseffizienz noch 20,5%. Bei den höheren Konzentrationen war keine Klonierungseffizienz mehr zu beobachten. Auch hier war in der Abbildung die Dosis-Wirkungsbeziehung ersichtlich.

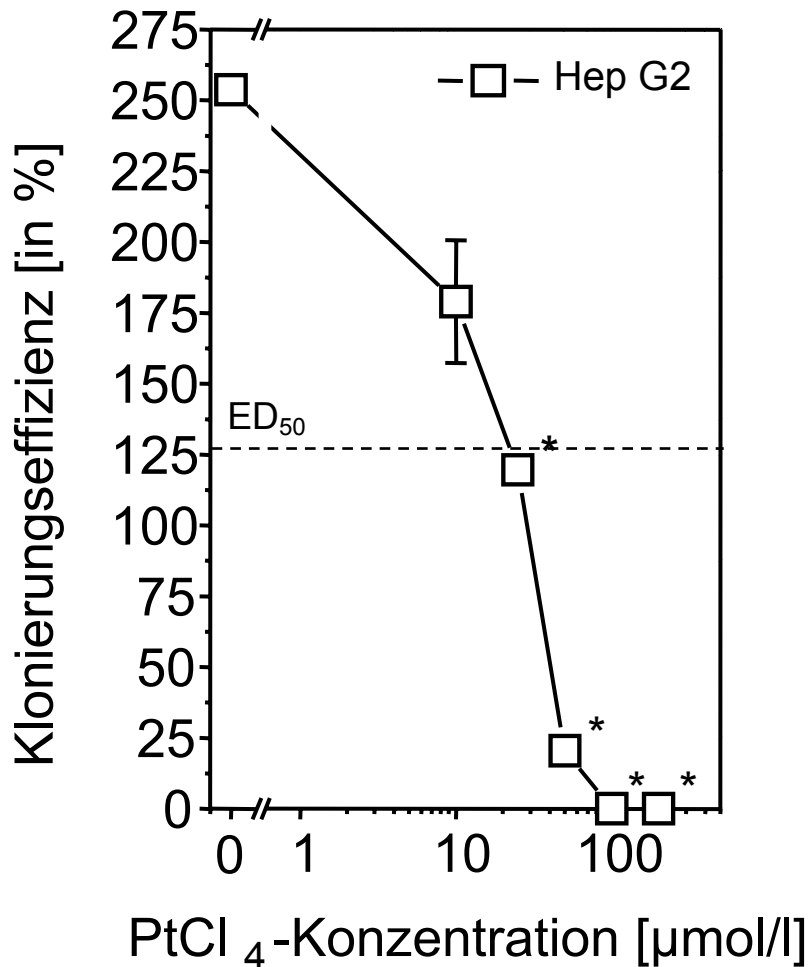


Abb. 21: Klonierungseffizienz der Hep G2 Zellen in % nach 9-tägiger Exposition mit PtCl₄; beachte die dosisabhängige Reduktion der Klonzahl und die fehlende Klonierungsfähigkeit bei 100 und 200 µmol/l PtCl₄; (Mittelwert ± S.E.M.;; *p ≤ 0,05; n = 2)

Die Ergebnisse zeigten für die Nierenzelllinie OK folgendes Resultat (Abb. 22). Die Klonierungseffizienz der Kontrolle lag bei 54,83%. Bei einer Gefahrstoffkonzentration von 10 µmol/l PtCl₄ konnte ein leichter Anstieg der Klonzahl beobachtet werden. Bei den Konzentrationen 25 und 50 µmol/l PtCl₄ fiel die Kurve steil ab, wobei eine Signifikanz der Werte erst ab einer Konzentration von 100 µmol/l erreicht wurde. Diese lag bei 19,8%. Bei 200 µmol/l PtCl₄ fand sich eine Klonierungseffizienz von nur noch 1% lag. Die Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Kurve mit dem steilen Abfall bei steigender Konzentration des Gefahrstoffes.

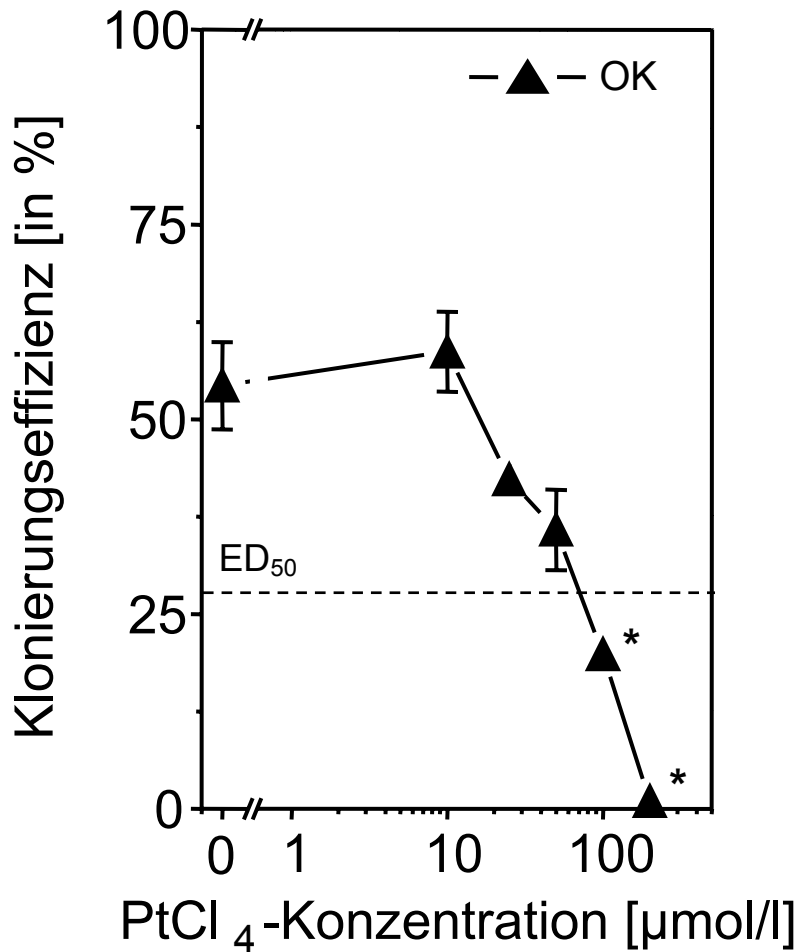


Abb. 22: Klonierungseffizienz der OK-Zellen in % nach 9-tägiger Exposition mit PtCl₄; beachte die dosisabhängige Reduktion der Klonzahl; (Mittelwert ± S.E.M.; *p ≤ 0,05; n = 3)

3.4. Zusammenfassung der ED 50

Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit und zum besseren Verständlichkeit sind die Konzentrationen, bei denen die ED 50 erreicht wurde in den Tabellen 2-5 für die einzelnen Zelllinien zusammengefasst. Bei manchen Versuchen ließ sich eine ED 50 Konzentration nicht darstellen da sie entweder nicht erreicht wurde, oder die Daten für einzelne Zelllinien nicht verfügbar waren. Alle ED 50 Werte sind Annäherungswerte.

Tabelle 2: Zusammenfassung der ED 50 für Chang Liver Zellen

Versuch	Zellzahl	MTT 24	NR 24	MTT 72	NR 72	Klonierung
ED 50 PtCl ₄ [μ mol/l]	50	150	110	45	70	15

Tabelle 3: Zusammenfassung der ED 50 für Hep G2 Zellen

Versuch	Zellzahl	MTT 24	NR 24	MTT 72	NR 72	Klonierung
ED 50 PtCl ₄ [μ mol/l]	45	220	150	70	125	40

Tabelle 4: Zusammenfassung der ED 50 für OK Zellen

Versuch	Zellzahl	MTT 24	NR 24	MTT 72	NR 72	Klonierung
ED 50 PtCl ₄ [μ mol/l]	70	200	--	94	95	70

Tabelle 5: Zusammenfassung der ED 50 für A-498 Zellen

Versuch	Zellzahl	MTT 24	NR 24	MTT 72	NR 72	Klonierung
ED 50 PtCl ₄ [μ mol/l]	100	220	--	142	43	--

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Neuartiges am vorliegenden Versuchsansatz

Im Gegensatz zu den meisten arbeitsmedizinischen Untersuchungen die sich mit dem Nachweis von Kanzerogenität bestimmter Stoffe beschäftigen, ist der Schwerpunkt dieser Arbeit bewusst auf die akute und chronische Toxizität von PtCl_4 gelegt worden. Die steigenden Umweltkonzentrationen durch Platinemissionen aus Abgaskatalysatoren und eine zunehmende Akkumulation von PtCl_4 in biologischen Materialien (Helmers et al., 1994) zeigen, wie wichtig die Untersuchungen über deren toxische Wirkung ist. Neuartig an den hier vorliegenden Untersuchungen ist, dass die verwendeten Testsysteme einen direkten Vergleich der Zelllinien untereinander erlaubten. Auch ein direkter Vergleich zwischen den unterschiedlichen PtCl_4 -Konzentrationen und der Abnahme der Zellvitalität war durch die Untersuchungen möglich. Durch die Verwendung von jeweils zwei Nieren- und Leberepithelzelllinien konnten organspezifische Schädigungen bewertet werden. Zu beachten ist jedoch die Problematik, dass die direkte Übertragbarkeit der hier erhaltenen Ergebnisse auf menschliche Organsysteme nicht ohne weiteres möglich ist.

4.2. Die Platin(IV)chloridaufnahme in Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass PtCl_4 aktiv in die Zellen transportiert wird und innerhalb der Zellen in Zellorganellen akkumuliert.

In der Arbeit von Waters et al. (1975) beschrieben diese für Alveolarmakrophagen und Lungenfibroblasten die Messung der Platinabnahme im Kulturmedium am AAS (Atomabsorptionsspektrometer). schlossen daraus auf eine Aufnahme von PtCl_4 in die Zellen. Die Aussagen von Waters et al. (1975) sind nur eingeschränkt verwertbar, da sich ihre Versuche am AAS darauf beschränkten, die Abnahme der PtCl_4 -Konzentration im Kulturmedium zu untersuchen. Im vorliegenden Versuch wurde dagegen die

Platinkonzentration in den Zellen selbst gemessen. Sorgfältiges Spülen der Zellen verhinderte eine unspezifische Anlagerung von PtCl_4 an die Zelloberfläche. Ausgeschlossen wurde dadurch auch eine unspezifische Bindung an Proteine im Kulturmedium.

Die großen Unterschiede in der Standardabweichung des Mittelwerts in diesen Versuchen lagen an der niedrigen PtCl_4 -Aufnahme in die Zellen und an der Tendenz der Zellen, unter Platinzugabe zu verklumpen. Das gleiche Problem beschrieben auch Waters et al. (1975) in ihrer Arbeit. Waters stellte fest, dass PtCl_4 die ATP-abhängigen Membrantransportproteine bei Alveolarmakrophagen blockiert und dies damit zu einer Einschränkung ihrer Phagozytosefähigkeit führt. Auch bei den in dieser Versuchsreihe verwendeten Zelllinien wurde eine verminderte Stoffwechselaktivität gefunden.

Für alle vier getesteten Zelllinien galt, dass nach 24 h die größte Menge PtCl_4 in den Zellen vorhanden war. Danach nahm die Menge an PtCl_4 innerhalb der Zellen kontinuierlich wieder ab. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch Transportproteine betroffen waren, da die Platinaufnahme in die Zellen sank, obwohl die Gesamtzellzahl abnahm und es dadurch zu einer erhöhten Konzentration von Platin im Kulturmedium kam. Unterschiedliche Arbeiten stellen den Transportmechanismus von Platin in die Zellen verschieden dar. Während Pascoe and Roberts (1973) einen aktiven Transport von Platin in die von ihnen untersuchten Zellen ausschlossen, sehen neuere Arbeiten (Kuhlmann et al. 1997; Montine and Bosch 1988) eine aktive Aufnahme des Platins in die Zelle durch spezielle Transportmechanismen als erwiesen an.

4.3. Bewertung der akuten Toxizität

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur akuten Toxizität (Reaktionen der Zellen nach 24h) zeigten bei den verschiedenen Tests durchaus vergleichbare Veränderungen der Zellen durch den Gefahrstoff PtCl_4 . Zu diesen Versuchen gehörten sowohl die Zellzahlbestimmung und die Bestimmung des mittleren Zellvolumens als auch Vitalitätstests mit Neutralrot und MTT.

Um die einzelnen Versuchsreihen vergleichen zu können wurde den Tests die allgemein gültige ED_{50} zugrunde gelegt. Damit können die $PtCl_4$ -Konzentrationen, bei denen 50% der Zellen zugrunde gehen, mit den einzelnen Untersuchungen und mit den unterschiedlichen Zelllinien verglichen werden. Alle Versuche wurden mit jeweils zwei Nieren- und Leberzelllinien durchgeführt. Dadurch konnten die Reaktionen von Nieren- und Leberzellen auf den Gefahrstoff $PtCl_4$ direkt verglichen werden.

Die Zellzahl nahm bei allen vier Zelllinien ab. Waters et al. (1975) stellten in ihrer Untersuchung fest, dass eine Verminderung der Zellzahl in geringerem Ausmaß stattfand als die Reduktion der Vitalität der Zellen, gemessen mittels eines Vitalitätsindex. Auch die hier vorliegenden Untersuchungen kamen zu dem gleichen Ergebnis. Die Leberzelllinien zeigten nach 72 h einen erneuten Anstieg der Zellzahl. Dies könnte ein Hinweis auf einen, den Hepatozyten eigenen, Reparaturmechanismus sein, der sich nach drei Tagen ausgebildet hatte. Auch eine Toleranzentwicklung, z.B. im Sinne eines veränderten Zellstoffwechsels, könnte eine Erklärung für den Anstieg sein.

Die Bestimmung des Zellvolumens und der Zellzahl zeigte eine signifikante Zellvolumenzunahme bei steigender Platinkonzentration. Gleichzeitig nahm die Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle ab. Die ED_{50} war für alle Zelllinien bei einer $PtCl_4$ -Konzentration von 50-100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht, wobei die Leberzelllinien im Vergleich zu den Nierenzelllinien schon bei einer geringeren Konzentration eine toxische Reaktion zeigten. Die Erklärung hierfür könnte eine höhere Stoffwechselaktivität und damit ein verstärkter Substratumsatz der Hepatozyten sein. Da die Unterschiede jedoch gering sind, erscheint ein kausaler Zusammenhang fraglich. Waters et al. (1975) bieten eine weitere Erklärung für die Reduktion der Zellzahl an. In ihrer Studie stellten sie fest, dass $PtCl_4$ den Gesamt-ATP-Umsatz unterdrückt und damit den Energiehaushalt in den Zellen verkleinert. Innerhalb der Zellwand werden die energieabhängigen Transportkanäle blockiert. Dieser Vorgang könnte über eine Verschiebung des Elektrolythaushaltes zu einer Wassereinlagerung, damit zur Zellschwellung und letztendlich durch das Platzen der Zellen zu einer Reduktion der Zellzahl führen. Zu Waters Theorie passt auch, dass das Zellvolumen ab einer

Gefahrstoffkonzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ PtCl_4 zunahm, wie sich im vorliegenden Versuchsansatz zeigte. Uno and Morita (1992) stellten in ihrer Arbeit an Bakterien fest, dass Platinkomplexe die Zellteilung hemmen ohne jedoch die Zellgröße in gleichem Ausmaß zu beeinträchtigen. Diese Aussage könnte eine Erklärung für die in dieser Untersuchung festgestellte Verminderung der Zellzahl bei gleichzeitiger Zunahme des Zellvolumens sein. Um diese Ansätze zu verifizieren, hätte man allerdings Größe und Anzahl der Zellfragmente bestimmen müssen, was jedoch den Rahmen dieses Versuchsprogramms gesprengt hätte.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht speziell untersucht, ob dieser Zelluntergang durch Apoptose oder einen nekrotischen Prozess bedingt war. Durch die initiale Zellschwellung und den darauf folgenden Zelluntergang liegt es jedoch näher, eine Zellnekrose anzunehmen. Bei Apoptose müsste dem Zelluntergang eine initiale Zellschrumpfung vorausgehen, was in den vorliegenden Versuchen nicht festgestellt werden konnte.

Bei aktivierten Platinkomplexen, wie z.B. cis-Platin, vermuteten Leibbrandt et al. (1995) unter anderem eine spezifische Schädigung der Mitochondrien. Als Mechanismen wurden von Leibbrandt et al. sowohl eine Schädigung der mitochondrialen Respiration als auch eine Veränderung des Membranpotentials angenommen. Kuhlmann et al. (1998) beschrieben eine Vakuolenbildung innerhalb der Mitochondrien. Sowohl Leibbrandt et al. als auch Kuhlmann et al. verwendeten zum Nachweis der Toxizität von cis-Platin den MTT- Test.

In der vorliegenden Arbeit wurde der MTT-Test durchgeführt, um einen Vergleich der Toxizität von PtCl_4 mit der Toxizität von cis-Platin zu erhalten. Die Verwandlung des hellgelben Substrats in ein dunkelblaues Formazansalz geschieht innerhalb der Mitochondrien. Die Menge des Substratumsatzes durch die mitochondrialen Dehydrogenasen gilt als zuverlässiger Indikator zur Bestimmung der Vitalität der Zellen und somit auch deren Schädigung. Da sich bei diesem Test vergleichbare Ergebnisse für Nieren- und Leberzellen abzeichnen (Leibbrandt et al., 1995), besteht durchaus die Gefahr, dass sich die Auswirkungen von PtCl_4 auch über deutlich längere Zeiträume hinweg ähnlich denen aktivierter Platinkomplexe verhalten. Der Mechanismus der

Zellschädigung scheint bei PtCl₄ jedoch nicht der gleiche wie bei cis-Platin zu sein, da es bei der elektronenmikroskopischen Kontrolle der hier untersuchten Zellen bei PtCl₄ nicht zu der von Kuhlmann et al.(1998) beschriebenen Vakuolenbildung kam (Pers. Mitteilung Prof. H. Wolburg, Path. Institut der Universität Tübingen). Auch andere Veränderungen der Zellen waren elektronenmikroskopisch nicht erkennbar. Deshalb muss von einem anderen Weg der mitochondrialen Schädigung ausgegangen werden. Die Schädigung könnte sowohl mitochondriale Enzyme betreffen als auch innerhalb der DNA erfolgen. Auch eine Veränderung der Proteinsynthese innerhalb der Zellen oder die Blockade der Atmungskette könnten eine Erklärung für die mitochondriale Schädigung sein. Weitere Untersuchungen, um die genauen subzellulären Schädigungsmechanismen festzustellen, bleiben nachfolgenden Arbeiten überlassen.

Leibbrandt et al.(1995) erforschten die toxische Wirkung von aktivierten Platinkomplexen auf proximale Tubuluszellen von Ratten. Die Wahl der Zellen fiel auf die Tubuluszellen, da einer der limitierenden Faktoren der klinischen Tumorthherapie mit cis-Platin die Nephrotoxizität ist. Leibbrandt et al. stellten fest, dass der Test mit cis-Platin eine mit PtCl₄ vergleichbare Reduktion der Zellvitalität ergab. Demzufolge wäre eine mit cis-Platin vergleichbare Dosis von PtCl₄ mit einer ähnlichen nephrotoxischen Wirkung verbunden. Dieser Umstand erfordert ausführliche Untersuchungen im Bereich der Toxizität von PtCl₄, um das Risiko von Nierenschädigungen bei exponierten Personen zu minimieren.

Die Aufnahme und Speicherung des NR-Farbstoffs wurde als Indikator der Vitalität beziehungsweise der Schädigung der Zellen bewertet. Die Speicherung des NR-Farbstoffs erfolgt innerhalb der Lysosomen.

Das Ergebnis der Versuche mit Leberzelllinien zeigte eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung mit einer starken Abnahme der Vitalität der Zellen. Die ED₅₀ wurde für beide Leberzelllinien bei 110-120 µmol/l PtCl₄ erreicht. Der Verlauf der Kurve zeigte eine ähnliche Reaktion der Zellen im NR-Test wie im MTT-Test auf den Gefahrstoff PtCl₄. Anders hingegen war der Verlauf für die beiden Nierenzelllinien. Die Kurve ließ keine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen, und zeigte auch bei den höheren Dosen PtCl₄ keine

Vitalitätseinschränkung, sondern eher eine Aktivitätssteigerung innerhalb der Lysosomen. Für die OK-Zellen war diese Aktivitätssteigerung ab einer PtCl₄-Konzentration von 25 µmol/l signifikant. Dies könnte daran liegen, dass die OK-Zellen einen höheren Stoffwechselumsatz aufweisen als die A-498-Zellen (pers. Mitteilung Prof. Dr. Dartsch, Institut für Arbeits- und Umweltmedizin, Universität Tübingen). Dieser erhöhte Stoffwechsel könnte den Zellen ermöglichen, das PtCl₄ verstärkt auszuscheiden und somit eine Zellschädigung zu vermeiden. Ein weiterer Denkansatz wäre eine Blockade von spezifischen Transportproteinen in der Zellmembran.

Eine geringe Konzentration des Gefahrstoffs führte zu einem erhöhten zellulären Substratumsatz innerhalb der Lysosomen bei allen Zelllinien. Eine Erklärung hierfür könnte in einer durch geringe Mengen PtCl₄ verursachten Enzyminduktion liegen. Auch eine verstärkte Produktion von Lysosomen durch Veränderungen der DNA oder RNA innerhalb des Zellkerns könnte eine mögliche Erklärung sein. Die Zunahme der zellulären Aktivität schien sich bei den gesamten 24-stündigen Tests für alle vier Zelllinien bei geringen PtCl₄-Konzentrationen abzuzeichnen, obwohl es zu keinen signifikanten Werten kam. Die Leberzelllinien wiesen im Verlauf eine ähnliche Dosis-Wirkungskurve auf wie die Nierenzellen der Studie von Leibbrandt et al. (1995). Damit zeigte sich, dass die lysosomale Aktivität der Leberzellen durch PtCl₄ stark beeinträchtigt wurde. Diese lysosomale Schädigung muss durch einen nur in den Leberzelllinien stattfindenden Mechanismus erfolgen. Da aktivierte Platinkomplexe das Oxidationssystem der Zellen, vor allem Glutathion, hemmen (Meyer and Madidas, 1994), könnte der oxidative Stress in den Leberzellen auch in dem hier vorliegenden Versuch einen verstärkten Aktivitätsverlust innerhalb der Lysosomen durch PtCl₄ hervorgerufen haben.

4.4. Bewertung der Langzeittoxizität

Um die toxischen Reaktionen der Zelllinien in einem verlängerten Zeitraum zu überprüfen, wurden ebenfalls die schon bei der Akuttoxizität beschriebenen

Vitalitätstests mit MTT und Neutralrot durchgeführt. Die Einwirkzeit wurde auf 72 h erhöht.

Die sehr starke Reaktion der Hepatozyten auf das PtCl₄ beim MTT-Test zeigte, dass diese Zellen sensitiver auf den Gefahrstoff reagieren als die Nierenzellen. Bei beiden Leberzelllinien wurde die ED₅₀ zwischen 50 und 60 µmol/l PtCl₄ erreicht. Damit hat sich die Konzentration des Gefahrstoffs, bei dem noch 50% aller Zellen in Bezug auf den 24-stündigen MTT-Test vital waren, halbiert. Das deutet auf eine Akkumulation von PtCl₄ bei verlängerter Inkubationszeit hin. Dies beschreiben auch Leibbrandt et al. (1995) in ihrer Arbeit für cis-Platin. Bei den Nierenzelllinien war die ED₅₀ bei ca. 100 µmol/l erreicht. Die geringere mitochondriale Schädigung der Nierenzellen deutet auf einen nur diesen Zellen eigenen Reparaturmechanismus oder einen anderen Schutzmechanismus hin. Auch ein abgeschwächter Substratumsatz innerhalb der Mitochondrien könnte als Erklärung dienen, wobei die hier verwendeten Nierenzelllinien als sehr stoffwechselaktiv gelten (pers. Mitteilung Prof. Dr. Dartsch).

In der Arbeit von Leibbrandt et al. (1995) wird beschrieben, dass cis-Platin zuerst die Lysosomen und die Proteinsynthese stört, bevor es zu einer Störung der mitochondrialen Funktionen kommt. Daraus müsste aber auch geschlossen werden können, dass bei der gleichen Expositionszeit der Zellen mit PtCl₄ eine verstärkte Schädigung der Lysosomen und damit eine größere Vitalitätseinschränkung der Zellen beim NR-Test bestehen sollte. Dies war aber nur bei den A-498-Zellen der Fall. Bei dieser Nierenzelllinie war bei Platinkonzentrationen von 100 und 200 µmol/l keinerlei Aktivität mehr messbar. Bei den anderen Zelllinien lag die ED₅₀ zwischen 70 und 110 µmol/l PtCl₄ und war damit mit den Ergebnissen des MTT-Tests vergleichbar. Bei der dreitägigen Inkubation mit PtCl₄ konnte festgestellt werden, dass Schädigungen der Zellen sowohl im Bereich der Lysosomen als auch im Bereich der Mitochondrien vorliegen.

Ein weiteres Problem bei der Langzeittoxizität wird aus der Arbeit von Travis et al. (1999) ersichtlich. Deutlich verlängerte Einwirkungszeiten der aktivierten Platinkomplexe führen zu einer erhöhten Inzidenz von sekundären Leukämien (Travis et al. 1999). Wenn man von einem gleichen oder ähnlichen

Wirkmechanismus der aktivierten Platinkomplexe und des PtCl₄ ausgeht, besteht durchaus Bedarf an der Überprüfung der Toxizität von PtCl₄ auf einen längeren Zeitraum, um die Möglichkeit des Auftretens von sekundären Leukämien nach PtCl₄-Exposition beobachten zu können. Des Weiteren besteht die, wenn auch geringe Gefahr, dass sich bei PtCl₄, ebenso wie bei aktivierten Platinkomplexen solide Tumore bilden. Dies wurde schon im Tierversuch von Greene (1992) für Mäuse beschrieben. Dabei traten bei Mäusen vor allem Sarkome auf.

4.5. Migrationsverhalten

Bei der Zellmigration wurde die Zahl der Einzelzellen/ Zellschicht, ausgehend von einer geraden Schnittkante (künstliche Wunde), in einen zellfreien Raum bestimmt. Die dabei zurückgelegte Migrationsstrecke und die Anzahl der ausgewanderten Zellen sind ein Indikator für deren Vitalität und Stoffwechsel. Der Mechanismus, der die Zellmigration in Gang setzt, ist bis jetzt nur teilweise erforscht. Grundsätzlich geben Zellen, die sich am Rand eines Zellschicht befinden, so genannte Chemokine, eine Untergruppe der Zytokine, ab. Durch Rezeptorbindung dieser Chemokine wird eine amöboide Bewegung der Zelle ausgelöst. Die Wanderungsrichtung wird, zumindest teilweise, durch Kontaktinhibition mit anderen Zellen bestimmt. Die Ergebnisse des Versuches weisen darauf hin, dass eine erhöhte Gefahrstoffkonzentration zu einer eingeschränkten Migration der Zellen führt. Dies kann als Zeichen eines gestörten Stoffwechsels und damit einer wahrscheinlichen Zellschädigung interpretiert werden. Die Ergebnisse des Versuchs mit Hep G2- Zellen waren nicht bewertbar, da sich nach dem Setzen der „künstlichen Wunde“ die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes ablösten. Der Grund hierfür konnte nicht gefunden werden.

Durch die unterschiedlichen Migrationseigenschaften der verschiedenen Zellen konnte bei den OK-Zellen, die sich im Zellverbund als Migrationsfront fortbewegten, nur die durchschnittliche Migrationsstrecke bestimmt werden. Bei den A-498- und Chang Liver-Zellen, die als Einzelzellen migrieren wurde sowohl

die Gesamtzahl der ausgewanderten Zellen als auch die Wanderungsstrecke, ausgehend von der Schnittkante, bestimmt. Bei den Nierenzelllinien zeigte die Untersuchung die Tendenz der Zellen, bei niedrigen PtCl₄-Konzentrationen eher verstärkt auszuwandern. Grund dafür könnte eine Stimulation der Chemokinrezeptoren oder eine verstärkte Produktion von Chemokinen durch PtCl₄ sein. Die Mechanismen sind jedoch unklar und bleiben nachfolgenden Untersuchungen überlassen. Die Chang Liver-Zellen zeigten keine solche Tendenz, so dass angenommen werden kann, dass bei ihnen entweder andere, nicht platinsensible Chemokine oder Chemokinrezeptoren eine größere Rolle spielen. Bei der höchsten PtCl₄ Konzentration zeigten alle Zelllinien einen signifikanten Rückgang der Migrationsaktivität, jedoch auch starke Zellschädigungen.

4.6. Klonierungseffizienz

Dem Versuch der Klonierung liegt die Annahme zugrunde, dass mit der langen Einwirkzeit des Gefahrstoffs PtCl₄ eine Veränderung des Zellverhaltens bei der Ausbildung von Zellklonen einhergeht. Die Auswertung der Klonkulturen der vier Zelllinien ergab Resultate, die sich zwischen den einzelnen Zelllinien, aber auch den verschiedenen Organtypen durchaus unterschieden. Über die verlängerte Inkubationszeit kam es zu einer weitaus stärkeren Reaktion der Zellen schon auf geringe Konzentrationen von PtCl₄.

Die A-498-Zellen bildeten keine definierten Zellklone, sondern, wie im Ergebnisteil beschrieben, einen konfluierenden Zellbelag am Boden der Kulturschalen. Dieses Problem könnte in der starken Zellvermehrung und der Tendenz der Zellen zu einer verstärkten Migrationsaktivität begründet sein (pers. Mitteilung Prof. Dr. Dartsch).

Die untypisch hohe Klonierungsrate der Hep G2-Zellen lag daran, dass sich beim Entstehen des Zellklons einzelne Zellen aus dem Zellverbund aktiv fortbewegten und damit die Grundlage für einen neuen Zellklon bildeten. Die Klonierungseffizienz der Kontrolle von fast 300% zeigte, dass die migratorische Aktivität der Hep G2- Zellen besonders hoch ist.

Die Arbeit von Klostergaard et al. (1992) beschreibt die Klonüberlebensrate von menschlichen Kolonzellen nach Exposition mit aktivierten Platinkomplexen. Die Ergebnisse sind aber nur bedingt vergleichbar, da in der Arbeit von Klostergaard et al. die Klonierungszeit mit 14-24 Tagen länger war als in der vorliegenden Arbeit. Auch die Kombination von verschiedenen Noxen wie Carboplatin, TNF (tumor necrose factor) und Hypothermie sowie die Verwendung von menschlichen Kolonzellen schränkt die Vergleichbarkeit der Arbeit mit den hier beschriebenen Versuchen ein. Bei einer Behandlung der Zellen mit 10 µg Carboplatin/ml waren bei Klostergaard et al. noch, je nach Zelllinie, 6-10% der Klone vital. Die Konzentration von 10 µg/ml entspricht 27 µmol/l. Daraus geht hervor, dass die Konzentrationen beider Arbeiten in ähnlichen Bereichen liegen und somit vergleichbar sind. Die Chang Liver-Zellen reagierten bei einer PtCl₄ Konzentration von 25 µmol/l mit dem Rückgang der Zellklone auf 9%. Auch die zweite Leberzelllinie Hep G2- lag bei einer PtCl₄ Konzentration von 50 µmol/l mit einer 15%igen Klonierungseffizienz in einem ähnlich niedrigen Bereich. Anders waren dagegen die Ergebnisse der Nierenzelllinie OK. Erst bei einer Konzentration von ca. 150 µmol/l PtCl₄ wurde die 10%ige Klonierungseffizienz erreicht. Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass die Nierenzellen, wie schon bei den anderen Versuchen, weniger sensitiv auf die PtCl₄-Intoxikation reagierten. Eine mögliche Erklärung für die stärkere Schädigung der Leberzelllinien könnte ein erhöhter Stoffwechsel der Leberzellen oder ein fehlender Schutzmechanismus gegenüber dem Gefahrstoff sein. Die Teilungsfähigkeit der Zellen könnte durch eine Reaktion des PtCl₄ mit der DNA gehemmt werden, wie es Uno and Morita (1992) für Bakterien beschrieben haben. Bei diesen Bakterien wiesen Uno und Morita in derselben Arbeit eine Chelatbildung durch Austausch von Chloridatomen innerhalb der DNA nach. Weitere Erklärungen für die Zellschädigung könnten, unter anderem, oxidativer Stress der Zellen, Proteinefehlbildungen oder eine Störung der Zellmembranfunktion sein. (Klostergaard et al., 1995). Genauere Mechanismen der subzellulären Veränderungen sollten in nachfolgenden Forschungsarbeiten untersucht werden.

4.7. Die Bewertung von Gefahrstoffen unter arbeitsmedizinischen Aspekten

Die Bewertung der arbeits- und umweltmedizinisch relevanten Gefahrstoffe ist von verschiedenen Messmethoden abhängig. Es werden Analysen u.a. von Umgebungsluft, Staub und Arbeitsmaterialien durchgeführt, um die von diesen Gefahrstoffen ausgehenden Belastungen des Körpers zu messen. Dadurch erhält man Informationen über die aktuelle Belastung des Körpers und die im Körper ausgelösten Reaktionen. Durch individuelle körperliche Parameter, wie z.B. das Atem-Minuten-Volumen oder den individuellen Stoffwechsel der Leber, fällt die im Körper ausgelöste Reaktion, auf z.B. Staubexposition, aber nicht bei jedem Individuum gleich aus. Dies kann zu einer Missinterpretation der Ergebnisse führen. Die Belastung des Körpers lässt sich mittels Blutproben, Urinproben, Atemluft, Speichel, Haarproben oder auch Gewebeproben ermitteln. Eine genaue Bewertung der Schädigung des jeweiligen Organs ist jedoch nicht oder nur begrenzt möglich, da auch hier wieder individuelle Parameter eine Rolle spielen und die Interaktion der verschiedenen Organsysteme im Sinne einer Toxifikation oder Detoxifikation eine selektive Bewertung erschweren bzw. unmöglich machen. Eine weitere Methode zur Bewertung von Gefahrstoffen ist die Durchführung von tierexperimentellen Untersuchungen, bei denen Aussagen hinsichtlich Toxizität, Mutagenität und Kanzerogenität gemacht werden können. Dabei ist der größte Nachteil jedoch die nur bedingte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Mit histologischen, immunologischen, hämatologischen und molekularen Meßmethoden können die Veränderungen der genetischen Strukturen und die Genotoxizität untersucht werden (Leopold et al., 1979)

Durch die Untersuchung von Zellen und deren Stoffwechselaktivitäten können bis zu einem gewissen Grad Rückschlüsse auf die Reaktion von Organen oder Organsystemen auf unterschiedliche Gefahrstoffe und deren Konzentrationen gezogen werden.

4.8. Schlussfolgerungen

Durch die verstärkte Verwendung von Platinsalzen und aktivierten Platinkomplexen akkumulieren diese vermehrt in der Umwelt. Bei den aktivierten Platinkomplexen wurde starke Zytotoxizität nachgewiesen. Auch bei der vorliegenden Arbeit stellt sich ein nicht zu vernachlässigendes Schädigungspotential von PtCl_4 auf Nieren- und Leberzellen heraus. Die subzellulären Wirkungsmechanismen scheinen teilweise denen aktivierter Platinkomplexe ähnlich zu sein. Auffällig ist die starke Hepatotoxizität, die in fast allen Versuchen aufgetreten ist. Leider existieren für aktivierte Platinkomplexe keine Studien, die sich mit einer speziellen Leberzellschädigung befassen. Festgestellt werden kann jedoch, dass PtCl_4 in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie z.B. Carboplatin toxisch auf die hier verwendeten Zellen wirkt. Um eine den aktivierten Platinkomplexen ähnliche Schädigung (Nierenschädigung, sekundäre Leukämien) bei PtCl_4 auszuschließen sind weitere Forschungen, vor allem im Bereich der intrazellulären Schädigung durch Platinaufnahme, angebracht. Auch die Langzeittoxizität bei jahrelanger Exposition sollte im Hinblick auf das Risiko von sekundären Tumoren erforscht werden. Eine differenzierte Betrachtung des zum Schutz der Umwelt eingeführten Katalysators und der möglichen Langzeitschäden durch emittiertes, wasserlösliches Platin erscheint dringend nötig.

5. Zusammenfassung

Durch zunehmende Verwendung von Katalysatoren steigt die weltweite Umweltbelastung durch PtCl_4 . Auch der verstärkte Einsatz von aktivierten Platinkomplexen in der Antitumorthherapie trägt zu diesem Problem bei. Bekannte Gesundheitsrisiken sind unter anderem das Platin-Asthma, Sekundärtumore und primäre Zellschädigung bei der Behandlung mit Platinkomplexen in der Tumorthherapie. Dringender Forschungsbedarf bestand jedoch auf dem Gebiet der wasserlöslichen Platinsalze und deren Akut- und Langzeittoxizität, weswegen diese Studie erstellt wurde.

Es wurden jeweils 2 etablierte Zellreihen aus Leber,(Chang Liver, Hep.G 2) und Nierengewebe,(OK, A-498) untersucht. Die Zellkulturen wurden über 24h und 72h kontinuierlich PtCl_4 -exponiert und die Zellvitalität daraufhin mit MTT-Test und NR-Test bestimmt. Für die Langzeittoxizität wurden zusätzlich noch die Migrationsfähigkeit und die Klonierungseffizienz bestimmt.

Die Ergebnisse der Studie zeigen bei der durch den MTT-Test ermittelten 24h Zytotoxizität eine deutliche Abnahme der Zellvitalität, jedoch keine Organspezifität. Der Neutralrot-Essay kennzeichnet dagegen eine Reduktion der Zellzahl nur bei den Leberzellreihen. Bei den Nierenzellreihen ist keine Veränderung der Zellzahl nachweisbar. Bei der 72h Exposition ist für beide Testansätze eine deutliche Organspezifität nachweisbar ($\text{ED}_{50(72h)}=60\mu\text{g/ml}$ für Leberzellen, $\text{ED}_{50(72h)}=100\mu\text{g/ml}$ für Nierenzellen). Die Migrationsfähigkeit ist gehemmt, auch die Klonierungseffizienz nimmt ab, wobei die Leberzellreihen stärker betroffen sind.

Wasserlösliche Platinverbindungen haben eine hohe in-vitro-Toxizität in Bezug auf Nieren und Leberzellen. Da ein ähnliches Wirkungsspektrum wie bei den in der Tumorthherapie verwendeten aktivierten Platinkomplexen angenommen wird, besteht ein immenser Forschungsbedarf bei anderen Organsystemen.

Verzeichnis der Abkürzungen

A-498 Zellen	Human Kidney Carcinoma Zelllinie
Carboplatin	Cis-diamin 1,1-Cyclobutan Dicarboxylat Platin
Chang Liver Zellen	Human Chang Liver Zelllinie
Cis Platin	Cis- Dichlordiaminoplatin(II)
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Earle´s MEM	Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
F 12	Nutrient Mixture Ham´s F12
FCS	Fetal calf serum
HCL	Salzsäure
Hep G2 Zellen	Human Hepatocyte Carcinoma Zelllinie
HEPES	HEPES Pufferlösung
KE	Klonierungseffizienz
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration
MEM	Minimum Essential Medium
MTT-	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
NR-	3-amino- <i>m</i> -dimethylamin-2-methyl-phenacin hydrochlorid
OK Zellen	Opossum Kidney Zelllinie
PBS	Phosphate-buffered saline
PGM	Platingruppenmetalle
PtCl ₄	Platin(IV)chlorid
RNA	Ribonukleinsäure
S-H-Gruppen	Schwefel- Wasserstoff Gruppen

Literatur

Balcerzak M.
Analytical Methods for the Determination of Platinum in Biological and Environmental Materials
Analyst, Vol. 122, 67R-74R (1997)

Borenfreund E., Puerner J. A.,
Toxicity determined in vitro by morphological alternations and neutral red absorption
Toxicology Letters 24, 119-124 (1985)

Helmerts E., Mergel N.
Platin in belasteten Gräsern
Z. Umweltchem Ökotox. 9(3),147-148 (1997)

Helmerts E., Mergel N., Barchet R.
Platin in Klärschlammasche und an Gräsern
Z. Umweltchem Ökotox. 6(3),130-134 (1994)

Hill R. F., Mayer W. J.
Radiometric determination of platinum and palladium attrition from automotive catalysts
IEEE Transact. Nucl. Sci. NS 24, 2549-2554 (1977)

Klostergaard J., Leroux E., Siddik Z. H., Khodadadian M., Tomasovic S.P.
Enhanced Sensitivity of Human Colon Tumor Cell Lines in vitro in Response to Thermochemoimmunotherapy
Cancer Research 52, 5271-5277(1992)

Kuhlmann M.K., Horsch E., Burkhardt G., Wagner M., Köhler H.
Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by bioflavonoid quercetin
Arch. Toxicol.72, 536-540 (1998)

Kuhlmann M.K., Burkhardt G., Köhler H.
Insight into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application
Nephrol Dial Transplant 12, 2478-2480 (1997).

König H. P., Hertel R. F., Koch W., Rosner G.
Determination of platinum emissions from a three-way catalyst-equipped gasoline engine
Atmospheric Environment 26A, 741-745 (1992)

Leibbrandt M. E. I., Grushenka H.I.W., Metz A. L., Oziba A. A., Haskins J. R.
Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat proximal tubule cells
Kidney Int. 48: 761- 770 (1995)

Leopold W. R., Miller E. C., Miller J. A.
Carcinogenicity of antitumor cis-platinum(II) coordination complexes in the mouse and rat
Cancer research 39, 913-918 (1979)

Liu T. Z., Lin T. F., Chiu D. T., Tsai K. J., Stern A.
Palladium or platinum exacerbates hydroxyl radical mediated DNA damage.
Free Radical Biology & Medicine, 23(1): 155-61, (1997)

Lustig S., Schierl R., Alt F., Helmers E., Kümmerer K.
Platin in Umweltkompartimenten
Deposition, Verteilung sowie Bedeutung für den Menschen und sein Nahrungsnetz
Z. Umweltchem Ökotox. 9(3),149-152 (1997)

Maeda S., Sugiura T., Saikawa Y., Kubota T., Otani Y., Kumai K., Kitajima M.
Docetaxel enhances the cytotoxicity of cisplatin to gastric cells by modification of intracellular platinum metabolism
Cancer Sci. 95 8, 679-684 (2004)

Mansuri-Thorshizi H., Ghadimy S., Akbarzadeh N.
Synthesis, Characterization, DNA Binding and Cytotoxic Studies of Platinum(II) and Palladium(II) Complexes of the 2,2'-Bipyridine and an Anion of 1,1-Cyclobutanedicarboxylic Acid
Chem. Pharm. Bull. 49(12), 1517-1520 (2001)

Marquardt H., Schäfer S. G.(Hrsg.)
Lehrbuch der Toxikologie
Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich (1994)

Meyer K. B., Madias N. E.
Cisplatin Nephrotoxicity
Miner Electrolyte. Metab. 20, 201- 213 (1994)

Moldowan M., Gomez M. M., Palacios M. A.
Determination of platinum, rhodium and palladium in car exhaust fumes
J. Anal. At. Spectrom. 14, 1163-1169 (1999)

Montine T. J., Borch R. F.
Quiescent LLC-PK₁ Cells as a Model for cis- Diaminedichloroplatinum(II)
Nephrotoxicity and Modulation by Thiol Rescue Agents
Cancer Res. 48: 6017- 6024 (1988)

Moore W., Hysell D., Hall L., Campbell K., Stara J.
Preliminary Studies on the Toxicity and Metabolism of Palladium and Platinum.
Environ. Health Perspect. 10, 63-71(1975)

Mosmann T.
Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to
Proliferation and Cytotoxicity Assays
Journal of Immunological Methods, 65, 55-63 (1983)

Rosner G., Hertel R. F.
Gefährdungspotential von Platinemissionen aus Automobil-Abgaskatalysatoren.
Staub, Reinhaltung der Luft. 46, 281-285 (1986)

Sures B., Zimmermann S.
Bioverfügbarkeit, Bioakkumulation und Toxizität der Platingruppenelemente Pt,
Pd und Rh in aquatischen Organismen
Zwischenbericht anlässlich des Staatsseminars des BWPLUS,
Forschungszentrum Karlsruhe, 1-12 (2000)

Travis L. B., Holowaty E.J., Bergfeldt K., Lynch C. F., Kohler B.A., Wiklund T.,
Curtis R.E., Hall P., Andersson M., Pukkala E., Sturgeon J., Stovall M.
Risk of leukaemia after platinum-based chemotherapy for ovarian cancer
N. Engl. J. Med., Vol. 340, Number 5, 351-357 (1999)

Uno Y., Morita M.
Mutagenic activity of some platinum and palladium complexes
Mutation Research, 298, 269-275, (1993)

Waters M. D., Owens Vaughan T., Abernethy D.J., Garland H.R., Cox C.C.,
Coffin D.L.
Toxicity of Platinum(IV) Salts for Cells of Pulmonary Origin
Environ. Health Perspect., Vol. 12, 45-56 (1975)

Zereini F., Zientek C., Urban H.
Konzentration und Verteilung von Platingruppenelementen (PGE) in Böden.
Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung
Z. Umweltchem. Ökotox. 5, 130-134 (1993)

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. P.C. Dartsch im Institut für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen durchgeführt. Für die Überlassung des Themas, das rege Interesse, die engagierte Unterstützung und Betreuung während der gesamten Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft, möchte ich mich bei ihm ganz besonders bedanken

Großen Dank schulde ich weiterhin

Herrn Professor Dr. F.W. Schmahl für die Möglichkeit, im Institut für Arbeits- und Sozialmedizin die Experimente für die vorliegende Dissertation ausführen zu können.

Herrn Professor Dr. F. Lang für die Möglichkeit, am Physiologischen Institut I der Universität Tübingen, die Versuche mikroskopisch auszuwerten

Frau M. Heilig und Frau M. Rittgarn für die ständige Hilfsbereitschaft bei technischen und organisatorischen Problemen und für die kompetente Einarbeitung in die methodische Vorgehensweise.

Herr Sven- Heiko Schönthal für die freundschaftliche Zusammenarbeit auch weit über labortechnische Zusammenhänge hinaus, sowie die große Hilfe und die zahllosen Ratschläge während der gesamten Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meiner Ehefrau Maija danken, die mich mit Rat und aufmunternden Worten großzügig unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Martin Lenz

Geburtsdatum/-ort: 5.11. 1969 in Sindelfingen

Familienstand: Verheiratet

Eltern: Dr. med. Eckart Lenz, Arzt
Dr. med. Gertraud Lenz, geb. Scharrer, Ärztin

Schulbildung: 1976-80 Grundschule Magstadt
1980-84 Gymnasium in den Pfarrwiesen,
Sindelfingen
1984-90 Goldberg-Gymnasium,
Sindelfingen
1990 Abitur

Studium: Immatrikulation für das Fach Humanmedizin
an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
Sommersemester 1993.
08.05.2001: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Paracelsiuskrankenhaus, Ruit

Tätigkeit: August 2001- Februar 2003 AiP in Frenchay
Hospital, Bristol, UK, Abteilung für Innere Medizin
Februar 2003- August 2003 Assistenzarzt in
St. Mary's Hospital, Newport, I.O.W., UK, in der
Allgemeinen Notaufnahme (A&E)
August 2003- Februar 2004 Assistenzarzt in Crawley
Hospital, Crawley, UK, Abteilung für Innere Medizin
Februar 2004- August 2005 Assistenzarzt in Maidstone
Hospital, Maidstone, UK, Abteilung für Innere Medizin und
Onkologie
Seit August 2005 Funktionsoberarzt in der allgemeinen
Notaufnahme (A&E) in Ipswich Hospital, Ipswich, UK