

Aus der Abteilung Allgemeine Hygiene und Umweltmedizin  
(Prof. Dr. med. H. Dunkelberg)  
Im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umweltmedizin und Dermatologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Zur Gentoxizität von Nitromoschus  
im Schwesterchromatidaustausch-Test und im Mikrokern-Test

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
ANTONIA KOMISCHKE, geb. Zaulig  
aus Osterode

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Dunkelberg
- II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Hallier
- III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Nitromoschus</b>	<b>1</b>
1.1.1. Moschus Xylol	5
1.1.2. Moschus Ambrette	6
1.1.3. Moschus Keton	7
1.1.4. Moschus Mosken	8
1.1.5. Moschus Tibeten	9
<b>1.2. Gentoxizitätsprüfung</b>	<b>10</b>
1.2.1. Der Schwesterchromatidaustausch-Test	10
1.2.2. Der Mikrokern-Test	13
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Materialien</b>	<b>16</b>
2.1.1. Zellen	16
2.1.2. Zellkulturmedien	18
2.1.3. Lösungen und Substanzen mit Bezugsquellen	19
2.1.4. Geräte	23
<b>2.2. Methoden</b>	<b>25</b>
2.2.1. Schwesterchromatidaustausch-Test mit Humanlymphozyten (aus Vollblut)	25
2.2.2. Lymphozytenisolierung aus Vollblut	26
2.2.3. Mikrokern-Test mit isolierten Humanlymphozyten	28
2.2.4. Methoden zur Zellkulturhaltung	30
2.2.5. Mikrokern-Test mit HepG2-Zellen	31
2.2.6. Mikroskopische Auswertung	33
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>55</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>66</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

**1.**

# 1. Einleitung

## 1.1. Nitromoschus

Seit dem Altertum sind Duftstoffe wichtige Begleiter der Menschheit, um ein Wohlbefinden zu erlangen. Zu den Duftstoffen gehören ätherische Öle, die aus natürlichen Substanzen bestehen. Eine Duftnuance ist der Moschus. Der natürliche Moschus ist ein Drüsensekret des männlichen Moschustieres (*Moschus moschiferus*), welches im asiatischen Hochland beheimatet ist. Schon seit Jahrtausenden ist Moschus als Heilmittel bekannt und wird als Duftstoff in der Parfumindustrie eingesetzt (RÖMPP CHEMIE LEXIKON (1991)).

Da der natürliche Moschus nur schwer synthetisch herzustellen ist und die natürliche Gewinnung eine Bedrohung für das Moschustier bedeutet, werden seit dem 18. Jahrhundert synthetische Moschusduftstoffe produziert (BEDOUKIAN 1986). Eine Gruppe dieser synthetischen Moschusduftstoffe sind die Nitromoschussubstanzen, die nicht natürlichen Ursprungs sind. In der Gruppe der Nitromoschussubstanzen sind die strukturell verwandten Verbindungen Moschus Xylol, Moschus Ambrette, Moschus Keton, Moschus Mosken und Moschus Tibeten zusammengefasst. Diese mehrfach substituierten Nitromoschussubstanzen, chemisch handelt es sich um dinitro- und trinitrosubstituierte Benzolderivate, haben den Vorteil, dass sie einfach und kostengünstig zu synthetisieren sind, und aus diesem Grund in großen Mengen in der Industrie eingesetzt werden können. Außerdem haftet der Duft länger und leichter an Haut und Textilien (TAS ET AL. (1997)). Die Produktion der Nitromoschussubstanzen, die am Anfang des 20. Jahrhunderts begann, lag zu Beginn der 1990er Jahre weltweit bei mehr als 1000 t pro Jahr. Davon wurden 1991 67% Moschus Xylol, 21% Moschus Keton und 12% Moschus Ambrette hergestellt. Der größte Produzent weltweit ist China mit beispielsweise einem Ertrag von 942 t im Jahre 1991 (IPPEN 1994). Im Jahr 2000 lag der Verbrauch bei etwa 100 t an Nitromoschusverbindungen (TAS ET AL. (1997)).

Nitromoschus wird als Duftstoff in Kosmetika und Waschmitteln sowie als Zusatz in Lebensmitteln und Fischködern verwendet. Der Einsatz in der Industrie ist vielfältig, so werden 25% der Duftstoffe in Detergenzien, 14% in Weichspülern, 13% in Kosmetika, 10% in Haarpflegemitteln, 10% in Waschgelen, 9% in Seifen, 5% in

Parfums und 6% in anderen Produkten verarbeitet. Ein großer Anteil der verwendeten Duftstoffe von ca. 77% kann über diese Produkte in das Abwasser gelangen (OSPAR (2004)). Es wurden von SOMMER (1993) 60 Kosmetika und 41 Waschmittel auf ihren Nitromoschusgehalt mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie untersucht. In 35 Kosmetika (Parfums, Rasierwasser, Shampoos, Seifen, Lotionen und Cremes) wurden hauptsächlich Moschus Xylol und Moschus Keton nachgewiesen. Dabei zeichnete sich ab, dass Moschus Xylol vorwiegend in Waschmitteln mit einem Gehalt von 2,5 - 250 mg/kg in 17 von 41 Proben und Moschus Keton hauptsächlich in Kosmetika mit einem Gehalt von 6,7 - 2200 mg/kg in 27 von 60 Proben gemessen wurde.

Erstmals wurde man durch eine Arbeit von YAMAGISHI ET AL. (1981), die Moschus Xylol und Moschus Keton in Süßwasserfischen im japanischen Fluß Tama nachweisen konnten, aufmerksam auf eine mögliche Gefährdung als Umweltschadstoff. Daraufhin wurden in Deutschland Untersuchungen an Fischen aus Aquakulturen (HAHN 1993; RIMKUS UND WOLF 1993B) durchgeführt. Die Untersuchungen von HAHN (1993) in Bayern zeigten, dass in 48% der untersuchten Fischproben Moschus Xylol mit einem Gehalt über dem Interventionswert von 0,01 mg/kg Frischgewicht, welcher von einer Bund - Länderbesprechung vorgeschlagen wurde, gemessen wurde. RIMKUS UND WOLF (1993B) führten in Schleswig-Holstein Untersuchungen an inländischen und ausländischen Forellenproben durch. Diese ergaben insgesamt, dass die inländischen Proben Moschus-Xylol-Gehalte unter 0,10 mg/kg Fett aufwiesen. In den ausländischen Proben erhielt man sowohl niedrige Werte unter 0,10 mg/kg Fett als auch Werte über 0,50 mg/kg Fett an Moschus Xylol. Neben Moschus Xylol konnte auch Moschus Keton mit 0,02 - 0,33 mg/kg Fett und Moschus Ambrette mit 0,01 - 0,03 mg/kg Fett nachgewiesen werden.

Weiterhin untersuchten RIMKUS UND WOLF (1993A) den Gehalt an Nitromoschus in Frauenmilch und Humanfett, um eine Akkumulation im menschlichen Organismus zu prüfen. Jede der 22 Frauenmilchproben enthielt Moschus Xylol (0,02 - 0,22 mg/kg Fett) und Moschus Keton (0,01 - 0,09 mg/kg Fett). Ebenso wurden in allen 13 Humanfettproben Moschus Xylol (0,02 - 0,19 mg/kg Fett) und Moschus Keton (0,01 - 0,09 mg/kg Fett) nachgewiesen. Die Ergebnisse von LIEBL UND EHRENSTORFER (1993) in 391 Frauenmilchproben aus Südbayern entsprachen denen aus Norddeutschland.

Der Moschus-Xylol-Gehalt schwankte sehr stark und lag deutlich höher als die Gehalte der anderen vier Nitromoschussubstanzen. Die gemessenen Werte lagen im Bereich der Konzentrationen von Organochlorverbindungen ( $\beta$ -HCH, cis-Heptachlorepoxyd (HE) und Lindan ( $\gamma$ -HCH)), die routinemäßig in der Frauenmilch bestimmt werden. Außerdem zeigte diese Studie, dass eine Akkumulation von Nitromoschus im menschlichen Körper vor allem das Fettgewebe und darauffolgend die Leber betrafen. Bei diesen Messungen wurden Moschus Ambrette und Moschus Mosken in wenigen Proben und Moschus Tibeten in keiner Probe festgestellt (Bestimmungsgrenze: 0,01 mg/kg Fett). Eine Untersuchung in Muttermilch 1999 ergab Konzentrationen von 9,4  $\mu\text{g/kg}$  Fett Moschus Xylol, 14,9  $\mu\text{g/kg}$  Fett Moschus Keton und weniger als 1,3  $\mu\text{g/kg}$  Fett Moschus Mosken. Moschus Tibeten und Moschus Ambrette wurden nicht nachgewiesen (DUEDAHL-OLESEN ET AL. (2005)). Auch in Schweden und den USA wurden Moschus Xylol und Moschus Keton in der Muttermilch gefunden. In den USA konnte Moschus Xylol in Konzentrationen von 2 – 150 ng/g und Moschus Keton von 2 - 238 ng/g analysiert werden (REINER ET AL. (2007)), in Schweden analysierten LIGNELL ET AL. (2008) Muttermilchproben von 101 Erstgebärenden zwischen 1996 und 2003, in denen Moschus Xylol mit einer Maximalkonzentration von 9,5 ng/g vorhanden war. Moschus Keton war nicht nachweisbar, die Nachweisgrenze lag bei 2-3 ng/g.

Es wurden mehrere Untersuchungen zum Gehalt von Nitromoschus im menschlichen Blut durchgeführt, die mittlere Konzentration an Moschus Xylol lag bei 24 ng/g Fett und konnte in 98% der Proben nachgewiesen werden (ANGERER UND KÄFFERLEIN (1997)). 5 Jahre später in einer Wiederholungsstudie wurde Moschus Xylol noch in 12% der Proben ermittelt, die mittlere Konzentration lag unter 10 ng/g Fett (KÄFFERLEIN UND ANGERER (2001)). Eine weitere Studie bestätigte den Nachweis von Moschus Xylol (mittlere Konzentration 6,5 ng/g Fett) und Moschus Keton (mittlere Konzentration 5,5 ng/g Fett) im Humanblut (EISENHARDT ET AL. (2001)). Messungen im menschlichen Fettgewebe ergaben eine maximale Konzentration von 288 ng/g Fett Moschus Xylol (MÜLLER ET AL. (1996)).

Weltweit wurden Untersuchungen zur Bioakkumulation durchgeführt. DUEDAHL-OLESEN ET AL. (2005) führten 1999 und 2003/2004 Messungen in dänischen Fischfarmen durch, die zeigten, dass 1999 in einem Großteil der Forellenproben Moschus Mosken mit 98% am häufigsten nachweisbar war, gefolgt von Moschus

Keton in 84%. 2003/2004 waren Moschus Xylol in 34% und Moschus Keton in 30% messbar. Moschus Mosken und Moschus Tibeten konnten 2003/2004 nicht ermittelt werden. Es zeigte sich weiterhin, dass Moschus Ambrette in 50% der Proben vorhanden war mit einer Konzentration nahe der Bestimmungsgrenze von 0,3 µg/kg Frischgewicht.

Untersuchungen in verschiedenen wasserabhängigen Systemen ergaben eine Belastung mit synthetischen Nitromoschusverbindungen, wobei hauptsächlich Moschus Xylol und Moschus Keton Gegenstand dieser Untersuchungen waren. Im Sediment des Eriesee und im Ontariosee (PECK ET AL. (2006)) sowie in der Bucht von San Francisco wurden Moschus Xylol und Moschus Keton gemessen, wobei die Konzentrationen von 0,034 - 0,038 ng/g Sediment für Moschus Xylol und Moschus Keton in San Francisco niedrig waren. Die Konzentrationen in der Nähe einer Kläranlage dagegen fielen höher aus, und zwar 0,13 – 0,24 ng/g Sediment Moschus Xylol und 1,08 – 2,74 ng/g Sediment Moschus Keton (RUBINFELD UND LUTHY (2008)). Weiterhin konnte Nitromoschus im Klärschlamm ortsansässiger Kläranlagen in Kanada (YANG UND METCALFE (2006), SMYTH ET AL.(2007)) und in Klärschlammproben in der Schweiz (HEEREN UND BERSET (2000)) sowie in Wasserproben im Michigan See der USA (PECK UND HORNBUCKLE (2004)), in Gewässern der Schweiz (HEEREN UND BERSET (2000)) und in der Elbe in Deutschland (GATERMANN ET AL. (1998)) nachgewiesen werden.

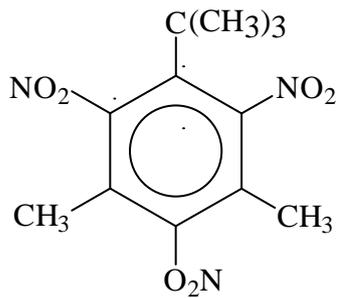
Diese Studien führten dazu, dass biologische Endpunkte wie Toxizität, Gentoxizität, Mutagenität sowie Kanzerogenität dieser Substanzen in Hinblick auf ein mögliches gesundheitliches Gefährdungspotential genauer untersucht und bewertet werden sollten. Eine Untersuchung zur Gentoxizität ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.1.1. Moschus Xylol

Substanzname: 1-tert.-Butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzol

Summenformel:  $C_{12}H_{15}N_3O_6$

Molekulargewicht: 297,3



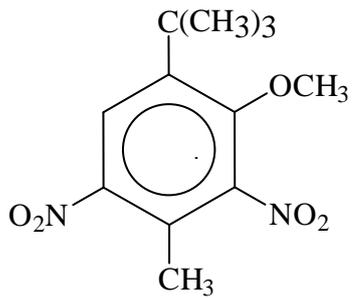
**Abbildung 1: Strukturformel Moschus Xylol**

### 1.1.2. Moschus Ambrette

Substanzname: 1-tert.-Butyl-4-methyl-6-methoxy-3,5-dinitrobenzol

Summenformel:  $C_{12}H_{16}N_2O_5$

Molekulargewicht: 268,2



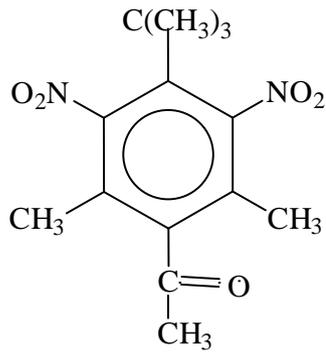
**Abbildung 2: Strukturformel von Moschus Ambrette**

### 1.1.3. Moschus Keton

Substanzname: 4-tert.-Butyl-3,5-dinitro-2,6-dimethylacetophenon

Summenformel:  $C_{14}H_{18}N_2O_5$

Molekulargewicht: 294,3



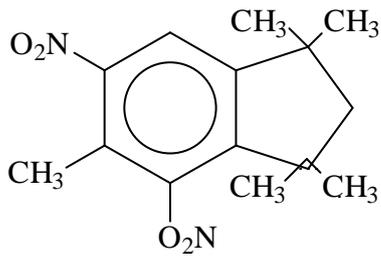
**Abbildung 3: Strukturformel von Moschus Keton**

#### 1.1.4. Moschus Mosken

Substanzname: 1,1,3,3,5-Pentamethyl-4,6-dinitroindan

Summenformel:  $C_{14} H_{18} N_2 O_4$

Molekulargewicht: 278,3



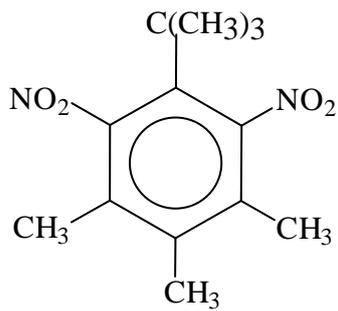
**Abbildung 4: Strukturformel von Moschus Mosken**

### 1.1.5. Moschus Tibeten

Substanzname: 1-tert.-Butyl-3,4,5-trimethyl-2,6-dinitrobenzol

Summenformel:  $C_{13}H_{18}N_2O_4$

Molekulargewicht: 266,3



**Abbildung 5: Strukturformel von Moschus Tibeten**

## **1.2. Gentoxizitätsprüfung**

Gentoxische Schäden können durch chemische Agenzien, ionisierende Strahlen oder Mikroorganismen (besonders durch Viren) induziert werden. Im Erbgut eines Organismus kann dies zu Mutationen führen. Im Rahmen der Gentoxizitätsprüfung werden Veränderungen am Genom untersucht, bei denen es sich um Basenveränderungen, Intra- und Interstrangvernetzungen der DNA sowie um DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche handeln kann. Die ausgewählten Testverfahren, die in dieser Arbeit angewandt wurden, dienen der Untersuchung chromosomaler Veränderungen des menschlichen Zellgutes und können keine Aussage über direkt induzierte Mutationen machen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nitromoschusverbindungen mittels des Schwesterchromatidaustausch-Tests und des Mikrokern-Tests auf gentoxisches Potenzial untersucht.

### **1.2.1. Der Schwesterchromatidaustausch-Test**

Der Schwesterchromatidaustausch-Test ist ein Indikator-test auf gentoxische Wirkungen. Als Schwesterchromatidaustausch bezeichnet man den molekulargenetischen Vorgang, bei dem es im Verlauf des Zellzyklus (in der Metaphase) zu einem intrachromosomalen Austausch von Genmaterial kommt. Die Ursache der Schwesterchromatidaustausch-Induktion ist vielseitig und unabhängig von der Entstehung der Mutationen. Zur Bildung von Schwesterchromatidaustauschen können neben DNA-Schäden auch Störungen der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur führen (SPEIT 1993). Schwesterchromatidaustausche treten spontan in der Replikationsphase während des Zellzyklus auf und sind in fast jeder Zelle zu finden. Der Schwesterchromatidaustausch-Test ist in seiner Durchführung und Auswertung sehr praktikabel und zuverlässig, so dass dieser in der Gentoxizitätsprüfung als Nachweis von Umweltmutagenen Verwendung findet (SPEIT 1993). Eine Schwäche des Tests sieht man darin, dass der Entstehungsmechanismus und die biologische Bedeutung von Schwesterchromatidaustauschen bisher nur unzureichend erklärt werden konnte.

Der Austausch von Schwesterchromatiden wurde erstmals 1958 von TAYLOR beschrieben. Er wies diese mit Hilfe der Autoradiographie nach. ZAKHAROV UND EGOLINA (1972) setzten Bromodesoxyuridin, ein halogeniertes Nukleosid, zur Chromosomenmarkierung ein, und zwar am Ende des Zellzyklus. Durch die Einführung der Fluoreszenzfarbstoffe zur unterschiedlichen Anfärbung der Schwesterchromatiden (LATT 1973) gewann der Schwesterchromatidaustausch-Test immer mehr an Bedeutung in der Gentoxizitätsprüfung. Als Farbstoff wurde die Benzimidazolverbindung Hoechst 33258 verwendet. Um Schwesterchromatidaustausche sichtbar zu machen, wurden die Chromatiden asymmetrisch mit Bromodesoxyuridin, einem bromierten Basenanalogen, substituiert. Bromodesoxyuridin wurde zu Beginn der Kultivierung zugesetzt, welches sich während der Replikationsphase (S-Phase) anstelle der Base Thymidin in die DNA einbaute.

Die Chromosomen waren nach der ersten Mitose unverändert.

Nach der zweiten mitotischen Teilung erhielt man Chromatiden mit einem asymmetrisch substituierten Strang, wobei eine Chromatide doppelseitig und die andere Chromatide einseitig substituiert war. Dies stellte sich nach Fluoreszenzfärbung in unterschiedlicher Farbintensität dar, die doppelseitig substituierte Chromatide war heller gefärbt. Die unterschiedliche Farbintensität liegt an der durch Bromodesoxyuridin reduzierten Affinität der DNA zu einigen Farbstoffen.

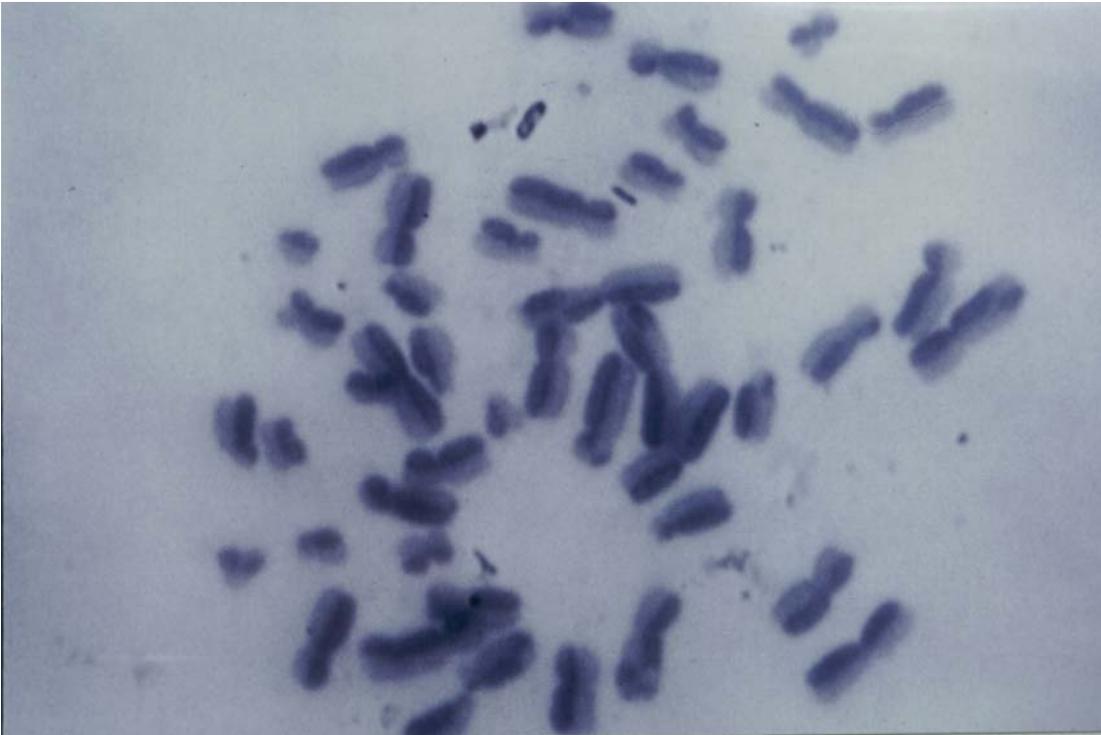
Nach der dritten Mitose entstanden Chromosomen mit vollständig substituierten Chromatiden und verschiedenen substituierten Chromatiden.

Die Zellen wurden in der Metaphase mit Colcemid arretiert, so dass die DNA als Chromosom sichtbar blieb.

Zur Auswertung wurden die Chromatiden nach zwei durchlaufenen Mitosen herangezogen, weil in dieser Phase die Schwesterchromatiden unterschiedlich angefärbt und die Austausche gut darstellbar waren (siehe Abbildung 1). Die Chromosomen der ersten Mitose waren einheitlich gefärbt und die Chromosomen der dritten Mitose zu einem Viertel stark und zu drei Viertel schwach gefärbt.

Der Schwesterchromatidaustausch-Test kann an allen in vitro proliferierenden Zellen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden Humanlymphozyten zur Kultivierung

eingesetzt. Die Kultivierung von Humanlymphozyten hatte den Vorteil, dass die Zellen schnell einsetzbar waren und eine konstante Proliferationsrate aufwiesen.



***Abbildung 1: Schwesterchromatiden nach der zweiten mitotischen Teilung***

### 1.2.2. Der Mikrokern-Test

Der Mikrokern-Test dient der Prüfung von Chromosomen-Aberrationen, d. h. strukturellen Veränderungen der Chromosomen durch klastogene Effekte (chromosomen-brechend) und numerischen Veränderungen (Aneuploidien) durch aneugene Effekte (den Spindelapparat schädigend), wobei vollständige Chromosomen Mikrokerne entstehen lassen können (ROMAGNA 1993).

Zur Testung chemischer Agenzien konnte der Mikrokern-Test *in vivo* und *in vitro* durchgeführt werden. Der *in-vivo*-Mikrokern-Test wurde 1971 von MATTER UND SCHMID an Mäusen (in polychromatischen Erythrozyten in Knochenmarksausstrichen) etabliert. EVANS UND O'RIORDAN (1975) stellten den Vorteil von Humanlymphozyten aus dem peripheren Blut zum Einsatz in Mutagenitätstests zur Analyse von Chromosomen-Aberrationen dar. Der Vorteil lag in der schnellen Gewinnung der Lymphozyten, der einfachen Kultivierung, der Übertragung der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus, und darin, dass Lymphozyten eine konstante Spontanrate an Mikrokernen aufwiesen. COUNTRYMAN UND HEDDLE (1976) zeigten, dass Mikrokerne auch in menschlichen Lymphozyten durch Chromosomen-Aberrationen entstehen. Sie legten die Kriterien für Mikrokerne fest, wodurch eine Standardisierung zur Auswertung gegeben war.

Durch die Entwicklung der Cytokinese-blockierenden Mikrokern-Methode von FENECH UND MORLEY (1985) konnte die Auswertung des Mikrokern-Tests insofern verbessert werden, dass durch den Einsatz von Cytochalasin B die Zellen, die eine Mitose durchlaufen hatten, von den Zellen ohne Zellteilung unterschieden werden konnten. Bei Cytochalasin B handelte es sich um eine Substanz, welche die Teilung des Zytoplasmas nach erfolgter Kernteilung blockiert. Die Voraussetzung für die Entstehung von Mikrokernen war eine mitotische Zellteilung (siehe Abbildung 2). Inzwischen sind verschiedene Testprotokolle beschrieben worden, in denen mit Vollblut oder mit isolierten Lymphozyten gearbeitet wurde und verschiedene Techniken zur Aufbereitung der Präparate angewendet wurden. In dieser Arbeit wurde mit isolierten Lymphozyten gearbeitet, um eine genaue Zelldichte einsetzen zu können und qualitativ bessere Präparate zu erhalten.



**Abbildung 2: Binukleärer Humanlymphozyt mit einem Mikrokern (Pfeil) nach einer mitotischen Teilung**

Während im Schwesterchromatidaustausch-Test Humanlymphozyten eingesetzt wurden, kam im Mikrokern-Test neben den Humanlymphozyten auch die metabolisch kompetente Zelllinie HepG2 zum Einsatz. Die Aufarbeitung entsprach der, die bei Humanlymphozyten verwendet wurde. Der Einsatz von humanen Leberzellen scheint bezüglich einer Aussage zur Gesundheitsgefährdung des Menschen gegenüber tierischen Leberzellen Vorteile zu haben, da bekannt ist, dass fremdstoff-metabolisierende Enzyme oft erhebliche Interspezies-Variationen aufweisen. Die eingesetzte Leberzelllinie HepG2 besitzt die Teilungsfähigkeit einer Krebszelle bei gleichzeitig weitgehender metabolischer Kompetenz einer intakten Leberzelle. Diese Zellen weisen Enzymaktivitäten des menschlichen Metabolismus auf, zu denen die P450-Cytochromoxydasen, Hydrolasen, Peroxydasen usw. gehören. Die genaue Enzymaktivität ist unter 2.1.1. beschrieben.

Der Mikrokern-Test, durchgeführt an isolierten Lymphozyten oder an Vollblut, eignete sich außerdem zum humanen Effektmonitoring schadstoffbelasteter Personen (KEVEKORDES ET AL. 1998).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Zellen

##### Humanlymphozyten

Es wurden bei jedem Versuch Humanlymphozyten aus frisch gewonnenem venösen Blut verwendet. Das Blut stammte von freiwilligen, gesunden und nicht rauchenden Spendern im Alter von 20 - 35 Jahren. Die Humanlymphozyten wurden nach unter 2.2.2 beschriebener Methode gewonnen.

##### HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen entstammen einer Zelllinie aus menschlichen Leberzellen. Die Leberzellen wurden aus einem primären Hepatoblastom eines 15-jährigen argentinischen Jungen durch Dres. BARBARA KNOWLES UND DAVID ADEN 1979 isoliert. Aus Biopsien nach Lobektomie wurden Karzinomzellen isoliert und über mehrere Monate kultiviert. Diese Zelllinie wurde als HepG2 bezeichnet. Es handelt sich um transformierte und hoch differenzierte Leberzellen, welche der morphologischen Struktur normalen Leberparenchyms ähneln und normale Funktionen der Leber beibehalten haben. Wichtige Plasmaproteine der menschlichen Leber konnten in der Zellkultur nachgewiesen werden (KNOWLES ET AL. (1980); ADEN ET AL. (1979)).

Die Isoenzymmuster wurden in verschiedenen Testsystemen untersucht. Diese Untersuchungen ergaben einen erhöhten Anteil an P450-Cytochromreduktasen im Vergleich zu Hepatozyten von Ratten (GLATT ET AL. (1990)). Erste Analysen hatten gezeigt, dass HepG2-Zellen sowohl Phase-I- als auch Phase-II-Enzyme enthalten. Von den Phase-I- Enzymen in den Mikrosomen waren Cytochrom P450 (CYP) 1A, 2C und 3A durch das Western-blotting-Verfahren nachgewiesen worden (FARDEL ET AL. (1992)). Weiterhin nachweisbar waren die Phase-I-Enzyme CYP 1A1/ 1A2 (DIAMOND ET AL. (1980)), CYP 1A und 2B (DOOSTDAR ET AL. (1988)), Arylhydrocarbonhydroxylase (DUVERGER-VAN BOGAERT ET AL.(1993); SASSA ET AL. (1987); DIGIOVANNI ET AL. (1984)), Nitroreduktase (EDDY ET AL. (1987)), N-Demethylase, Katalase, PeroxiDADse, Flavinmonooxygenase und NAD(P)H;

Cytochrom.cReduktase (DUVERGER-VAN BOGAERT ET AL.(1993)) sowie Cytochrom P450 Reduktase (GRANT ET AL. (1988)). Als Phase-II-Enzyme wurden die Glutathion-S-transferase (DOOSTDAR ET AL. (1988)), die Epoxidhydrolase (DEARFIELD ET AL. (1983)), die Sulfotransferase ST (DIGIOVANNI ET AL. (1984)), Sulfotransferase M-Form (WALLE ET AL. (1994)), UDPGlucuronyltransferase (DUVERGER-VAN BOGAERT ET AL.(1993)) und die N-Acetyltransferase (CORONEOS UND SIM (1993)) ermittelt. Zusammenfassend identifizierten KNASMÜLLER ET AL. (1998) diese metabolisierenden Enzyme in HepG2-Zellen.

## 2.1.2. Zellkulturmedien

### Medium zur Kultivierung von Humanlymphozyten im Schwesterchromatidaustausch-Test

Chromosomenmedium B (Biochrom) mit fetalem Kälberserum und

Heparin

100 IE/ml Pencillin

100 µg/ml Streptomycin

Phytohämagglutinin (PHA-L)

### Medium zur Kultivierung von Humanlymphozyten im Mikrokern-Test

RPMI 1640 (mit L-Glutamin)

komplementiert mit 15% fetalem Kälberserum

100 IE/ml Pencillin

100 µg/ml Streptomycin

### Medium zur Kultivierung von HepG2-Zellen

RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)

komplementiert mit 10% fetalem Kälberserum

1,5% L-Glutamin

100 IE/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

### 2.1.3. Lösungen und Substanzen mit Bezugsquellen

#### Nitromoschus

von Promochem, Wesel

Reinheit: Moschus Xylol: >98%; Moschus Keton: 99%; Moschus Ambrette: 99%;  
Moschus Mosken: 99%; Moschus Tibeten: 99%

#### Bromodesoxyuridin

0,6 mg/ml H<sub>2</sub>O (Serva, Heidelberg)

#### Colcemid

1 µg/100 µl H<sub>2</sub>O (Aldrich, Steinheim)

#### Cyclophosphamid

Molekulargewicht: 279,1 g/mol (Sigma)

10<sup>-4</sup> mmol/l Kultur

10<sup>-4</sup> mol/l = 5,35 x 10<sup>-4</sup> mmol/5,35 ml Kultur

1,07 x 10<sup>-2</sup> mmol/ml entsprach 2,986 mg Cyclophosphamid/ml Lösungsmittel

#### Mitomycin C

(Aldrich)

Mitomycin C wurde in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst, Konzentration: 0,01 g/l  
wurden 10 µl zur Kultur zugegeben, entsprach dies 0,12 µM

#### DMSO

= Dimethylsulfoxid (Aldrich)

#### S9 - Aroclor 1254

11,03 µg Protein/100µl Kultur entsprach 590 µg/50 µl S9 - Mix/5,35 ml Kultur;  
(Organon Technika, Eppelheim)

### S9 - Mix

Co-Faktor-Lösungen:

CO-1: 2,44 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  + 3,725 g KCl in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (Aqua bidest.)

CO-2: 26,85 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (Aqua bidest.)

Die Co-Faktor-Lösungen wurden steril filtriert und in kleinen Portionen autoklaviert.

Ansatz S9:

1 ml CO-1 + 1 ml CO-2 + 6 mg Glukose-6-Phosphat + 10 mg NADP (pH 7,4)

2 ml dieses Ansatzes S9 + 1 ml S9 = 3 ml S9 - Mix

$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (Merck)

KCl (Merck)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  (Merck)

Glukose-6-Phosphat (Boehringer)

### Hanc's Salt Solution

mit Phenolrot (Biochrom KG, Berlin)

### PBS-Lösung

= Phosphate Buffered Saline – Dulbecco (Biochrom)

### Ficoll

Trennungslösung für Lymphozyten (Biochrom)

### Trypanblaulösung

(Biochrom)

### Phytohämagglutinin (PHA - L)

(Biochrom)

1,2 mg Protein (lyophilisiert) wurden mit 5 ml sterilem Aqua dest. aufgefüllt

### Cytochalasin B-Lösung

(Biochrom)

5 mg Cytochalasin B wurden in 4,4 ml DMSO gelöst und in 150 µl - Portionen bei -20°C eingefroren

### Trypsin

Trypsin/ EDTA Solution 0,05/0,02% (w/v) in PBS (Biochrom)

### Kaliumchlorid-Lösung

(Merck)

0,07 molare Lösung: 5,22 g/l

### Natriumchlorid-Lösung

(Merck)

0,15 molare Lösung: 8,77 g/l

### Hypotonische Lösung (Mikrokern-Test mit Lymphozyten)

0,07 molare KCl-Lösung und 0,15 molare NaCl-Lösung im Verhältnis 5:1

### Carnoy-Fixativ

Schwesterchromatidaustausch-Test: Methanol/ Essigsäure (99%ig) im Verhältnis 3:1

Mikrokern-Test mit Lymphozyten: Methanol/ Essigsäure (99%ig) im Verhältnis 4:1

Methanol (Merck), Essigsäure (Merck)

### SSC-Bad (Zitratpuffer)

4,412 g NaCitrat x 2 H<sub>2</sub>O

8,77 g NaCl auf 2 l H<sub>2</sub>O

auf pH 7 mit Hilfe von HCl einstellen

### Hoechst-Farbstoff

Bisbenzimidazole H 33258 1 mg/ml Lösung

### HCl-Lösung

2-normale Lösung: 76,6 ml rauchende HCl auf 500 ml Aqua dest.

### Giemsa

(Gurr - Paesel und Lorei GmbH)

### Sörensen-Puffer

pH 6,8

Komponente 1: 9,08 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)

Komponente 2: 11,88 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck)

### Giemsa-Lösung

5%ige: 40 ml Sörensen-Puffer 1 + 40 ml Sörensen-Puffer 2 + 4 ml Giemsa

2%ige: 50 ml Sörensen-Puffer 1 + 50 ml Sörensen-Puffer 2 + 2 ml Giemsa

### Depex

(Gurr)

## **2.1.4. Geräte**

### Zentrifuge

(Heraeus Megafuge 1.0R)

Rotor 27040 = 16,9 cm

### Brutschrank

CO<sub>2</sub> Brutschrank (Heraeus)

### Mikrobiologische Sicherheitsbank

Hera Safe 12/2 (Heraeus)

### UV -Lampe

35 A, 22 V (Quarzlampen GmbH Hanau)

### Zählkammer

Neubauer-Zählkammer

### Mikroskop

(Zeiss Axioplan)

### Heizplatte

(Heidolph MR 301)

### Wasserbad

(GLF 1083)

### Kulturschalen

60 x 15 mm (Sarstedt)

Zentrifugenröhrchen

50 ml (Nunc 339497)

10 ml (Nunc 348097)

Kulturflaschen

Ion Flasks (Nunc 147589)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Schwesterchromatidaustausch-Test mit Humanlymphozyten (aus Vollblut)

Zur Kultivierung von Humanlymphozyten im Schwesterchromatidaustausch-Test benötigt man 5 ml Vollblut, welches in einer Monovette, die mit Natriumcitrat angereichert war, entnommen wurde. Es wurde pro Kultur ein steriles Reagenzröhrchen mit 5 ml Chromosomenmedium B, 0,3 ml Citratblut und 50 µl Bromodesoxyuridin angesetzt. Das Blut sollte frisch verarbeitet werden oder maximal 48 Stunden aufbewahrt sein. Die Inkubationszeit betrug insgesamt 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Die Kultur wurde an jedem Tag einmal aufgeschüttelt. Die Zugabe der zu untersuchenden Substanzen erfolgte 48 Stunden nach Kulturbeginn. Die Untersuchung erfolgte mit und ohne metabolische Aktivierung. Als Leerwert wurde das Lösemittel DMSO und als Positivkontrolle Cyclophosphamid mit und ohne S9-Mix verwendet. Die Behandlungszeit betrug bei Verwendung von S9-Mix aufgrund der toxischen Wirkung zwei Stunden. Um die Substanzen und den S9-Mix auszuwaschen, wurden die Kulturen zentrifugiert bei 1000 Umdrehungen/min. für 10 Minuten, der Überstand abgehoben und das Zellpellet mit Hanc's Salt Solution, die auf 37°C erwärmt war, resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min. für 10 Minuten und das Abheben des Überstandes. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Chromosomenmedium B resuspendiert und mit 50 µl Bromodesoxyuridin angereichert.

Nach 70 Stunden wurde die Kultivierung durch Zugabe von Colcemid zur Arretierung der Metaphase abgebrochen und für weitere 2 Stunden im Brutschrank belassen. Zur Fixierung der Lymphozyten wurden die Kulturen bei 1000 Umdrehungen/min. für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgehoben, das Zellpellet komplett resuspendiert und mit hypotoner KCl-Lösung, die zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde, behandelt, um die Erythrozyten zu lysieren und die Lymphozyten zu ballonieren. Die Zugabe erfolgte in drei Schüben unter Schüttelbewegungen, wobei zuerst 1 ml sehr langsam, 2 ml etwas schneller und danach 3 ml normal schnell zugegeben wurden. Die Hypotoniezeit betrug 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Messung begann nach Zugabe des ersten Schubes der KCl-Lösung.

Nach weiterer 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min. und Abheben des Überstandes erfolgte die Zugabe des abgekühlten Carnoy-Fixativs identisch der KCl-Zugabe nach sorgfältiger Resuspension, um eine Agglutination der Zellen zu verhindern. Die Röhrchen wurden für mindestens 1,5 Stunden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Diese Phase konnte auf maximal 24 Stunden erweitert werden. Dieser Schritt wurde nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min. und Abheben des Überstandes einmal wiederholt. Das Carnoy-Fixativ musste frisch angesetzt werden. Die Einwirkzeit bei der zweiten Anwendung im Kühlschrank bei 4°C betrug 30 Minuten.

Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min. und Abpipettieren des Überstandes bis auf einen Rest von 1 ml wurden die Zellen sorgfältig resuspendiert und auf gekühlte und in Ethanol gesäuberte Objektträger aus einer Höhe von 25 cm mit einer langen Pasteur-Pipette aufgetropft. Dieser Schritt war notwendig, um die Lymphozyten zum Platzen zu bringen und eine Spreitung der Chromosomen zu bewirken. Pro Kulturansatz wurden zwei Objektträger angefertigt, welche zum Trocknen auf eine Heizplatte mit einer Temperatur von 55°C gelegt wurden. Zum Schutz der Präparate wurden diese an einem dunklen Ort aufbewahrt und vor dem Färben zur Verbesserung der Qualität für 24 Stunden dort belassen. Das Färbeverfahren wurde nach der FPG-Methode (Fluoreszenz-Plus-Giemsa) von PERRY UND WOLFF (1974) durchgeführt. Die Objektträger wurden in einer Küvette mit jeweils 100 ml Sörensen-Puffer 1 und Sörensen-Puffer 2 sowie 200 µl Hoechst-Farbstoff gefärbt. Danach beließ man die Präparate, die mit beiden Komponenten Sörensen-Puffer bedeckt waren, unter UV-Licht über einen Zeitraum von 30 Minuten. Anschließend verblieben diese für 2 Stunden in einem SSC-Bad, um eine konstante Temperatur von 60°C beizubehalten. Um das Anfärben des Zytoplasmas zu verhindern, wurden die Präparate nach Abspülen mit destilliertem Wasser für 10 Minuten in 2-normaler HCl belassen. Die Objektträger wurden für 15 Minuten in 5%iger Giemsa-Lösung gefärbt und danach mit destilliertem Wasser kräftig abgespült. Zur Konservierung deckte man die Präparate mit Depex ein.

## 2.2.2. Lymphozytenisolierung aus Vollblut

Zur Lymphozytenisolierung nach Beschreibung von BOYUM (1964) benötigte man 10 ml heparinisiertes Vollblut, welches durch Venenpunktion von freiwilligen Spendern entnommen wurde. Das heparinisierte Vollblut wurde im Verhältnis 1 : 1 mit PBS bei Raumtemperatur gemischt. Das verdünnte Blutvolumen wurde vorsichtig über 10 ml Ficoll-Lösung in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen geschichtet. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 1100 Umdrehungen/min. und 20°C zentrifugiert, wobei eine langsame Beschleunigung und ein Ausrotieren ohne Bremse wichtig waren, um die einzelnen Schichten nicht zu zerstören. Nach der Zentrifugation erhielt man vier Schichten. Die schweren Blutbestandteile (Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten) bildeten die untere Schicht. Darüber lag die Ficoll-Lösung als Trennungsmittel zur darüberliegenden schmalen Lymphozytenschicht, und über dieser sammelten sich die leichten Blutanteile (Plasma). Die Plasmaschicht wurde, ohne die Lymphozytenschicht zu zerstören, abgesaugt und verworfen. Die Lymphozytenschicht wurde sorgfältig aufgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Lymphozyten wurden mit 40 ml PBS gewaschen, bei 1500 Umdrehungen/min. für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand bis auf das Zellpellet abgesaugt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das Zellpellet resuspendierte man in 2 ml Zellkulturmedium für Humanlymphozyten und zählte die Anzahl an Lymphozyten. Zur Auszählung wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einem Gemisch aus 100 µl Trypanblaulösung und 20 µl der gewonnenen Lymphozytensuspension befüllt. Zur Ermittlung der Anzahl an Lymphozyten in 1 ml Lymphozytensuspension wurden die vitalen Zellen in den vier großen Eckquadraten bei 20-facher Vergrößerung gezählt und das Zählergebnis mit 15.000 multipliziert.

Die allgemeine Formel zur Zellzahlberechnung lautet:

Zählergebnis / 0,4 x Verdünnungsfaktor (in diesem Fall 6) x 1000 = Zellzahl pro ml Zellstammlösung

### 2.2.3. Mikrokern-Test mit isolierten Humanlymphozyten

Zur Durchführung des Mikrokern-Tests wurden Kulturen in sterilen 10-ml-Zentrifugenröhrchen angesetzt, welche 2,5 ml Kulturmedium enthielten. Es wurden pro Kultur  $1 \times 10^6$  Lymphozyten eingesetzt. Dazu wurde die Stammsuspension entsprechend der Zelldichte mit Kulturmedium verdünnt. Zur Stimulation der Zellteilung erfolgte die Zugabe von Phytohämagglutinin-Lösung in einer Menge von 50 µl pro Kultur, dies entsprach einer Endkonzentration von 5 µg/ml. Die Kulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5,2% CO<sub>2</sub>-Anteil im Gasgemisch für 72 Stunden inkubiert.

Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen, die in DMSO gelöst waren, in einer Menge von 20 µl.

Nach 44 Stunden wurde Cytochalasin B zugegeben, um eine Teilung des Zytoplasmas nach erfolgter Kernteilung zu verhindern. Diese in-vitro-Methode wurde von FENECH UND MORLEY (1986) entwickelt.

Zur Fixierung der Lymphozyten wurden viele Testprotokolle in der Literatur beschrieben. Diese Testdurchführung wurde in Anlehnung an die Methoden von AGHAMOHAMMADI ET AL. (1984) und VRAL ET AL. (1994) modifiziert.

Nach Abbruch der Kultivierung nach 72 Stunden wurden die Zentrifugenröhrchen bei 1000 Umdrehungen/min. für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert und mit 6 ml hypotonischer Lösung behandelt. Die Zugabe des ersten und zweiten ml erfolgte sehr langsam unter Schütteln mit einer Eppendorfpipette. Die weiteren 4 ml wurden normal schnell mit einer Messpipette zugegeben. Die Hypotoniezeit betrug 2 Minuten, gemessen ab der letzten Zugabe, wobei insgesamt zügig gearbeitet wurde, um die Hypotoniezeit nicht zu lang auszudehnen. Eine weitere Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min. für 10 Minuten wurde durchgeführt und der Überstand abgehoben. Die Zellen wurden resuspendiert und mit 6 ml Carnoy-Fixativ behandelt, wobei die Zugabe wie bei der hypotonischen Lösung erfolgte. Die Röhrchen wurden für eine Fixierdauer von 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C belassen. Dieser Schritt wurde nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min. und Abheben des Überstandes einmal mit frisch angesetztem Carnoy-Fixativ wiederholt. Um das Zytoplasma sichtbar zu erhalten, wurde ein Waschschrift mit 5 ml

PBS durchgeführt. Dieser Schritt wurde notwendig, weil DMSO als Lösungsvermittler verwendet wurde und dieses toxisch auf die Zellen wirken kann, welches an der Beschaffenheit des Zytoplasmas deutlich werden würde. Die Zellen wurden ein weiteres Mal bei 1000 Umdrehungen/min. für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgehoben, das Zellpellet resuspendiert und auf gereinigte und gekühlte Objektträger aus 10 cm Höhe mit einer Pasteurpipette aufgetropft. Die Objektträger wurden zur Trocknung auf einer Heizbank mit einer Temperatur von 40°C belassen. Die Präparate wurden mit 5%iger Giemsa-Lösung für 15 Minuten gefärbt. Nach der Färbung der Objektträger wurden diese mit Depex eingedeckt.

## **2.2.4. Methoden zur Zellkulturhaltung**

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

### **2.2.4.1. Kulturhaltung der Zellen**

Die HepG2-Zellen wurden in oberflächenbehandelten Gewebekulturschalen (75 cm<sup>2</sup> Grundfläche) gehalten und vermehrt und in Gewebekulturschalen (Durchmesser von 60 mm) kultiviert. Dies erfolgte in einem Brutschrank mit einer Atmosphäre von 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.2.4.2. Auftauen von Zellen**

Die HepG2-Zellen waren in 2-ml-Portionen mit DMSO als Lösungsmittel in 2-ml-Gefrier Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen musste schnell erfolgen, um die HepG2-Zellen zügig in 5 ml Kulturmedium aufzunehmen. Dazu wurden die Gefrier Röhrchen in der Hand erwärmt. Das Kulturmedium und die Zellen wurden sehr schonend in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen vermischt und bei 1000 Umdrehungen/min. in einer Kühlzentrifuge bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Um das Lösemittel zu entfernen, wurde der Überstand bis auf das Zellpellet abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert.

### **2.2.4.3. Kultivierung von Zellen**

Die HepG2-Zellen wurden alle 2 - 3 Tage mit frischem Kulturmedium versorgt und je nach Zelldichte passagiert. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 2 ml sterilem PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen von einer dicht bewachsenen Kulturflasche erfolgte durch Zugabe von 1 ml Trypsin und konnte unter dem Mikroskop mittels Abrundung der Zellen beobachtet werden. Die Dauer der Ablösung betrug 5 Minuten. Währenddessen bewahrte man die Gewebekulturflasche im Brutschrank unter Kulturhaltungsbedingungen auf. Die abgenommenen Zellen wurden in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurden 100 µl der Zellmasse mit 500 µl Trypanblaulösung versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Ausgezählt wurden die vitalen Zellen in den vier großen Eckquadraten bei 20-facher Vergrößerung. Zur Ermittlung der Zellzahl in 1 ml Zellsuspension wurde das Zählergebnis mit 15.000 multipliziert (zur allgemeinen Formel siehe unter 2.2.2.). Die Anzahl an Passagen war bei HepG2-Zellen auf 12 - 13 begrenzt, da die Zellen in ihrer Funktion abschwächen.

### **2.2.5. Mikrokern-Test mit HepG2-Zellen**

Zum Einsatz im Mikrokern-Test wurden die HepG2-Zellen von einer dicht bewachsenen Gewebekulturschale abgenommen, indem entsprechend der Ablösung bei der Kultivierung von Zellen (unter 2.2.4.3.) verfahren wurde. Die Zellen wurden für diesen Test in einer Zelldichte von 500.000 Zellen in 4 ml Kulturmedium pro Gewebekulturschale ausgesät. Die Inkubationszeit in einem Brutschrank mit einer Atmosphäre von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> betrug 72 Stunden.

Die Zugabe der zu testenden Substanzen erfolgte 24 Stunden nach Kulturbeginn. Die Substanzen waren in DMSO gelöst und wurden in einer Menge von 50 µl pro Kultur zugegeben. Die Einwirkzeit umfasste 2 Stunden, da eine längere Behandlung toxische Einflüsse zeigte, die eine Auswertung nicht ermöglichten. Nach dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Nach 44 Stunden Kultivierung wurde 15 µl Cytochalasin B pro Kultur zugegeben. Die Endkonzentration betrug 3 µg/ml.

Nach 72 Stunden wurde die Kultivierung beendet, indem die HepG2-Zellen von den Gewebekulturschalen geerntet und zur Weiterverarbeitung in sterile 10-ml-Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Dieser Arbeitsschritt wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Kulturmedium wurde umgegossen und die Schalen mit 2 ml sterilem PBS gewaschen, welches in das gleiche Röhrchen gegossen wurde. Mit 500 µl Trypsin wurden die Zellen abgelöst, wozu die Schalen zum Einwirken für 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen wurden. Die Zellen wurden mit 2 ml sterilem PBS abgespült und in das entsprechende Zentrifugenröhrchen gegeben.

Zur Fixierung wurden die Zellen in Anlehnung an die Methode nach NATARAJAN UND DARROUDI (1991) weiterverarbeitet. Die Zellen behandelte man nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min. und Absaugen des Überstandes sowie sorgfältiger Resuspendierung mit hypotoner KCl-Lösung, die zuvor auf 4°C abgekühlt wurde. Die Zugabe erfolgte in zwei Schüben, 1 ml langsam unter Schüttelbewegungen und 3 ml schneller. Die Behandlung sollte eine Schwellung des Zytoplasmas bewirken, dieses aber nicht zerstören. Die Hypotoniezeit betrug 5 Minuten, gemessen vom Zeitpunkt der ersten Zugabe, bei Raumtemperatur. Die Kulturen wurden anschließend 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Es wurde der Überstand bis auf einen Rest von 1 ml abgesaugt. Vor dem Aufbringen auf die Objektträger wurde sorgfältig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einer 100-µl-Pipette (Gilson) aufgetragen. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und anschließend mit 2%iger Giemsa-Lösung für 5 Minuten gefärbt.

## 2.2.6. Mikroskopische Auswertung

### 2.2.6.1. Schwesterchromatidaustausch-Test

Zur Untersuchung der Schwesterchromatidaustausche wurde die zweite Generation von 30 Chromosomensätzen, die in der Metaphase arretiert wurden, ausgewertet. Zur Ermittlung des Proliferationsindex (PRI) wurden 100 Metaphasen je nach Teilungszustand, d. h. nach der Phase der Zellteilungen - 1. Generation nach der 1. Mitose, 2. Generation nach der 2. Mitose und die 3. Generation nach der 3. Mitose - ausgezählt. Zur Berechnung diente die Formel nach LAMBERTI ET AL. (1983):

$$\text{PRI} = \frac{\text{M1} + 2 \times \text{M2} + 3 \times \text{M3}}{100}$$

M1: 1. Generation, M2: 2. Generation, M3: 3. Generation

### 2.2.6.2. Mikrokern-Test

Mikrokerne wurden nach den Kriterien von FENECH (1993) ausgezählt. Diese zählte man in 1000 binukleären Zellen, um sicher zu stellen, dass die Zellen eine Mitose durchlaufen haben. Zur Erkennung zytotoxischer Dosisseffekte ermittelte man den NDI = Nuclear Division Index nach SURRALLÉS ET AL. (1995) und EASTMOND UND TUCKER (1989) nach der Formel:

$$\text{NDI} = \frac{\text{M1} + 2 \times \text{M2} + 3 \times (\text{M3} + \text{M4})}{\text{Gesamtzahl an Zellen}}$$

In diesem Fall wurden 500 Zellen gezählt, wobei M1 – M4 die Anzahl an Lymphozyten mit einem bis vier Zellkernen darstellen.

### 3. Ergebnisse

Es wurden in dieser Studie die Nitromoschussubstanzen Moschus Xylol, Moschus Keton, Moschus Ambrette, Moschus Mosken und Moschus Tibeten auf genotoxische Effekte untersucht. Dazu wurden der Schwesterchromatidaustausch-Test in Humanlymphozyten in vitro mit und ohne metabolische Aktivierung sowie der Mikrokern-Test mit Humanlymphozyten in vitro und HepG2-Zellen durchgeführt.

Bei der Versuchsdurchführung wurde ein Leerwert und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Leerwert dient der Lösungsvermittler DMSO, der eine Schwesterchromatidaustauschrates von im Mittel 6,67 und 7 – 11 Mikrokernen in Humanlymphozyten und 20 – 23 Mikrokernen in HepG2-Zellen zeigte.

Im Schwesterchromatidaustausch-Test wurde Cyclophosphamid als Positivkontrolle verwendet. Diese Kontrolle diente zur Beurteilung der Kulturbedingungen und Auswertungskriterien sowie zur Überprüfung des Metabolisierungssystems. Dabei ergaben sich für die Positivkontrolle ohne externe Metabolisierung im Mittel 13,94 Austausche und mit externer Metabolisierung im Mittel 54,1 Austausche.

Im Mikrokern-Test mit Humanlymphozyten und HepG2-Zellen diente Mitomycin als Positivkontrolle. Mitomycin induzierte 41 – 49 Mikrokernkerne in Humanlymphozyten und 51 – 57 Mikrokernkerne in HepG2-Zellen.

Zur statistischen Auswertung wurde beim Schwesterchromatidaustausch-Test der t-Test und beim Mikrokern-Test der Chi-Square-Test verwendet.

## Moschus Xylol

Tab. 1.1 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten ohne S9 durch Moschus Xylol (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,068	7.03	2,74	2,11
Xylol	0,68	7.00	1,84	2,20
	6,8	6,90	1,97	2,20
	68,0	6.77	2,53	1,60
	135	T	T	T
	DMSO		6,67	2,47
Cyclophosphamid	0,1	13,94	3,89	1,93

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 1.2 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten mit S9 durch Moschus Xylol (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,068	6,97	1,87	2,20
Xylol	0,68	7,33	2,09	2,30
	6,8	5,87	2,06	2,10
	68,0	7,20	2,26	1,50
	135	T	T	T
Cyclophosphamid	0,1	54,1	14,38	2,06

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 1.3 Induktion von Mikrokernen in Humanlymphozyten durch Moschus Xylol  
(n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus	0,014	5,5	0,5	2,21
Xylol	0,135	5,5	0,5	2,12
	1,35	5,5	0,8	1,93
	13,5	6,5	1,7	1,53
	135	8,5	1,2	1,37
	270	T	T	T
DMSO		9,1	0,7	2,2
Mitomycin	0,4	45,3	4,8	2,08

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 1.4 Induktion von Mikrokernen in HepG2-Zellen durch Moschus Xylol (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus	8	24	2,0	1,99
Xylol	15,6	24,5	4,8	1,97
	31,25	24,5	4,2	1,93
	62,5	23	2,5	1,84
	125	21	3,0	1,71
	250	18	2,8	1,56
	500	T	T	T
	DMSO		21,2	1,7
Mitomycin	0,4	53,5	6,5	2,00

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch

Moschus Xylol wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,014 – 500  $\mu\text{mol}$  eingesetzt. Die Höhe der Konzentration richtete sich nach der Höhe der Toxizitätsgrenze, welche in den einzelnen Verfahren Unterschiede aufwies. Es zeigte sich in keinem der Tests eine dosisabhängige Steigerung der Schwesterchromatidaustauschrates und der Mikrokerne. Die Schwankungen waren im Vergleich zur Positivkontrolle nicht signifikant.

## Moschus Ambrette

Tab. 2.1 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten ohne S9 durch Moschus Ambrette (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,075	8,20	2,91	2,10
Ambrette	0,75	8,20	2,75	2,00
	7,5	8,37	2,48	2,10
	75,0	8,17	1,65	1,80
	150	T	T	T
DMSO		6,67	2,47	2,10
Cyclophosphamid	0,1	13,94	3,89	1,93

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 2.2 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten mit S9 durch Moschus Ambrette (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,075	7,70	3,03	2,30
Ambrette	0,75	6,63	2,18	2,20
	7,5	7,50	2,36	2,20
	75,0	6,43	2,20	1,70
	150	T	T	T
Cyclophosphamid	0,1	54,1	14,38	2,06

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 2.3 Induktion von Mikrokernen in Humanlymphozyten durch Moschus Ambrette (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw,	NDI
Moschus	0,015	7,5	0,2	2,22
Ambrette	0,15	5,5	0,8	2,00
	1,49	7,5	0,6	1,88
	14,9	7	2,0	1,62
	149	8	0,8	1,41
	298	T	T	T
	DMSO		9,1	0,7
Mitomycin	0,4	45,3	4,8	2,08

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 2.4 Induktion von Mikrokernen in HepG2-Zellen durch Moschus Ambrette (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus	9,38	23	4,2	1,99
Ambrette	18,75	24	4,0	1,97
	37,5	21	2,8	1,88
	75	20	2,0	1,75
	150	20,5	3,5	1,54
	300	T	T	T
	DMSO		21,2	1,7
Mitomycin	0,4	53,5	6,5	2,00

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Moschus Ambrette wurde in Konzentrationen zwischen 0,015 – 300  $\mu\text{mol}$  in den einzelnen Versuchen eingesetzt. Es zeigte sich weder ein signifikanter Anstieg der Schwesterchromatidaustauschrate im Vergleich mit Cyclophosphamid noch eine Erhöhung der induzierten Mikrokerne im Vergleich zu Mitomycin. Der Einsatz von S9 und die Induktion von Mikrokernen in HepG2-Zellen ergab keine signifikant erhöhten Ergebnisse.

## Moschus Keton

Tab. 3.1 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten ohne S9 durch Moschus Keton (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,068	6,90	2,23	2,20
Keton	0,68	7,00	2,14	2,10
	6,8	6,97	2,07	2,00
	68,0	7,13	2,20	1,70
	136	T	T	T
	DMSO		6,67	2,47
Cyclophosphamid	0,1	13,94	3,89	1,93

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 3.2 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten mit S9 durch Moschus Keton (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,068	7,27	2,28	2,10
Keton	0,68	7,00	2,24	2,20
	6,8	7,00	2,00	2,00
	68,0	6,70	2,25	1,80
	136	T	T	T
	Cyclophosphamid	0,1	54,1	14,38

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 3.3 Induktion von Mikrokernen in Humanlymphozyten durch Moschus Keton  
(n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus Keton	0,014	5,5	0,3	2,21
	0,14	5	0,7	2,17
	1.36	5	0,0	1,95
	13.6	8	1,2	1,66
	136	8	0,8	1,47
	272	T	T	T
DMSO		9,1	0,7	2,2
Mitomycin	0,4	45,3	4,8	2,08

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 3.4 Induktion von Mikrokernen in HepG2-Zellen durch Moschus Keton (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus	0,85	18,5	4,2	1,98
Keton	8,5	23	3,5	1,95
	42,5	21	1,8	1,89
	85	20,5	2,4	1,75
	170	21	3,0	1,57
	340	T	T	T
	DMSO		21,2	1,7
Mitomycin	0,4	53,5	6,5	2,00

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Moschus Keton wurde in Konzentrationen zwischen 0,014 und 340  $\mu\text{mol}$  eingesetzt. Dabei zeigten sich keine signifikant erhöhten Ergebnisse im Schwesterchromatidaustausch-Test mit und ohne externe Metabolisierung mittels S9 sowie im Mikrokern-Test mit Humanlymphozyten und HepG2-Zellen.

## Moschus Mosken

Tab. 4.1 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten ohne S9 durch Moschus Mosken (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,072	7,50	2,73	2,10
Mosken	0,72	7,00	2,82	2,10
	7,2	6,10	1,89	2,00
	72	66,80	1,85	1,80
	144	T	T	T
	DMSO		6,67	2,47
Cyclophosphamid	0,1	13,94	3,89	1,93

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 4.2 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten mit S9 durch Moschus Mosken (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,072	6,10	2,10	2,00
Mosken	0,72	6,57	2,30	2,10
	7,2	6,73	2,13	2,00
	72	6,77	1,96	1,60
	144	T	T	T
	Cyclophosphamid	0,1	54,1	14,38

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 4.3 Induktion von Mikrokernen in Humanlymphozyten durch Moschus Mosken (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus	0,014	4,5	0,7	2,20
Mosken	0,14	6	0,7	2,18
	1,44	7,5	1,4	1,92
	14,4	7,5	0,8	1,68
	144	7,5	1,4	1,44
	288	T	T	T
DMSO		9,1	0,7	2,2
Mitomycin	0,4	45,3	4,8	2,08

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 4.4 Induktion von Mikrokernen in HepG2-Zellen durch Moschus Mosken (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus	0,9	22,5	5,2	2,01
Mosken	9,0	24,5	2,8	1,93
	45	21,5	2,4	1,84
	90	19,5	4,2	1,72
	180	19,5	3,2	1,52
	360	T	T	T
	DMSO		21,2	1,7
Mitomycin	0,4	53,5	6,5	2,00

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Moschus Mosken wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,014 bis 360  $\mu\text{mol}$  verwendet. Die Ergebnisse waren in keinem der durchgeführten Testverfahren signifikant erhöht.

## Moschus Tibeten

Tab. 5.1 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten ohne S9 durch Moschus Tibeten (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,09	7,17	2,62	2,00
Tibeten	0,90	6,40	2,56	2,20
	9,0	6,77	2,36	2,10
	90	6,93	2,43	1,60
	180	T	T	T
DMSO		6,67	2,47	2,10
Cyclophosphamid	0,1	13,94	3,89	1,93

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 5.2 Schwesterchromatidaustauschraten (SCE) in Humanlymphozyten mit S9 durch Moschus Tibeten (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	SCE	Stabw.	PRI
Moschus	0,09	6,80	2,43	2,20
Tibeten	0,90	6,47	2,43	2,10
	9,0	6,77	2,38	2,00
	90	6,83	2,81	1,80
	180	T	T	T
	Cyclophosphamid	0,1	54,1	14,38

Stabw = Standardabweichung

PRI = Proliferationsindex

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 5.3 Induktion von Mikrokernen in Humanlymphozyten durch Moschus Tibeten (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus	0,018	7	0,8	2,21
Tibeten	0,18	7	1,0	2,19
	1,8	5,5	0,8	1,97
	18	7	0,6	1,55
	180	7	0,0	1,43
	360	T	T	T
	DMSO		9,1	0,7
Mitomycin	0,4	45,3	4,8	2,08

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Tab. 5.4 Induktion von Mikrokernen in HepG2-Zellen durch Moschus Tibeten (n=2)

Substanz	Dosis $\mu\text{M}$	Mikrokerne*	Stabw.	NDI
Moschus	1,125	19,5	0,7	2,01
Tibeten	11,25	21,0	1,3	1,94
	56,25	22,5	2,4	1,85
	112,5	20,0	2,0	1,71
	225	20,5	2,6	1,52
	350	18,5	2,1	1,17
	450	T	T	T
	DMSO		21,2	1,7
Mitomycin	0,4	53,5	6,5	2,00

\* = Mikrokerne pro 1000 binukleäre Zellen

Stabw. = Standardabweichung

NDI = Nuclear Division Index

T = Toxisch (nicht auswertbar)

Moschus Tibeten wurde in Konzentrationen zwischen 0,018 und 450  $\mu\text{mol}$  eingesetzt. Im Vergleich zur Positivkontrolle ergaben weder der Schwesterchromatidaustausch-Test mit und ohne S9 noch der Mikrokern-Test signifikant erhöhte Ergebnisse.

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen in den ausgewählten Testsystemen Schwesterchromatidaustausch-Test und Mikrokern-Test haben gezeigt, dass keine der fünf getesteten Nitromoschussubstanzen gentoxische Schäden in Humanlymphozyten und in menschlichen kultivierten Leberzellen induzieren. Der Schwesterchromatidaustausch-Test als ein Indikator für gentoxische Reaktionen ergab keine signifikant höheren Schwesterchromatidaustauschraten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit DMSO, welches als Leerwert diente. Der Mikrokern-Test bestätigte diese Ergebnisse, da auch in diesem Gentoxizitätstest keine gentoxischen Auswirkungen auf die menschlichen Zellen durch Nitromoschusverbindungen ermittelt wurden.

Für Moschus Ambrette wurde ein mutagenes Potential im Salmonella-typhimurium-Test (nach Ames) beschrieben, welches auf den Stamm TA 100 nach metabolischer Aktivierung mit S9-Mix, einer Fraktion aus Rattenleberzellen, beschränkt werden musste (WILD ET AL. (1983); NAIR ET AL. (1986); EMIG ET AL. (1996)). Im Test mit anderen Salmonella-typhimurium-Stämmen konnte weder mit noch ohne Einsatz von S9-Mix ein signifikanter Anstieg mutagener Effekte gesehen werden. Im SOS-Chromotest, welcher zur Prüfung der Gentoxizität in Escherischia coli PQ 37 dient, blieben signifikante Reaktionen aus (EMIG ET AL. (1996); KEVEKORDES ET AL. (1996)). Zur mutagenen Wirkung von Moschus Ambrette im Ames-Test formulierten MERSCH-SUNDERMANN ET AL. (1996) als Erklärung, dass dieses auf die Anwesenheit externer Metabolisierung in Form von S9-Fractionen aus Rattenleber zurückzuführen sei. Es könnten säugetierspezifische Enzyme, die sich von menschlichen Enzymsystemen unterscheiden, für die Toxifizierung von Moschus Ambrette zu einem mutagenen Stoff verantwortlich sein.

Moschus Ambrette wurde im Mikrokern-Test mit Knochenmarkszellen von Mäusen und im Drosophila-Test, in denen keine gentoxischen Effekte beschrieben wurden (WILD ET AL. (1983)) getestet.

Aufgrund des nachgewiesenen mutagenen Potentials, der neurotoxischen Wirkungen, die von SPENCER ET AL. (1984) beschrieben wurden, und der

fotoallergisierenden Reaktionen (PARKER ET AL. (1986)) ist der Einsatz von Moschus Ambrette in der Europäischen Union verboten worden. Nach Empfehlung der „International Fragrance Association“ (IFRA) wurde dieser Duftstoff in den Anhang II der Kosmetikrichtlinie der Europäischen Union (76/768/EWG) aufgenommen. Umweltmedizinische Untersuchungen haben gezeigt, dass Moschus Ambrette trotz des Verbotes in geringen Konzentrationen in Forellenproben (DUEDAHL-OLESEN ET AL. (2005)) und in Blutproben von Menschen (PETERS (2004); HUTTER ET AL. (2009)) weiterhin vorhanden war.

Für Moschus Xylol konnte im Salmonella-typhimurium-Test kein mutagener Effekt ermittelt werden (NAIR ET AL. (1986); EMIG ET AL. (1996)), ebenso fielen die Ergebnisse zur Gentoxizität im SOS-Chromotest negativ aus (EMIG ET AL. (1996); KEVEKORDES ET AL. (1996)).

Weitere Testsysteme in Säugetierzellkulturen wie der Zytogenitätstest mit CHO-Zellen, einer permanenten Zelllinie aus Ovarialzellen chinesischer Hamster, der Mouse-Lymphoma-Test und der in-vitro sowie in-vivo-in-vitro-UDS-Test (UDS = unscheduled DNA synthesis) in primären Hepatozyten von Ratten konnten weder ohne noch mit externer Metabolisierung einen gentoxischen Effekt für Moschus Xylol nachweisen (API ET AL. (1995)). Diese Ergebnisse korrelieren mit denen dieser Arbeit in menschlichen Zellen, so dass die Vermutung nahe liegt, dass keine Unterschiede in der gentoxischen Wirkung bei Menschen, anderen Säugetieren und weiterem Zellgut bestehen.

Um den Wirkmechanismus und das damit verbundene potentielle Risiko von Nitromoschusverbindungen, und insbesondere von Moschus Xylol als nicht-gentoxischem Kanzerogen, abzuschätzen, wurden Studien zur Induktion der im Fremdstoffmetabolismus wirksamen Enzyme durchgeführt. Diese Enzyme der Biotransformation werden in zwei Gruppen eingeteilt nach der Phase, in der sie aktiviert werden. Zur Gruppe der Phase-I-Enzyme gehören die Cytochrom-P450-abhängigen Oxygenasen mit Isoenzymen und die mikrosomalen Mischoxydasen, die durch Oxidation und/ oder Reduktion zur Umwandlung von Stoffen führen können. Die Phase-II-Enzyme sind beispielsweise Hydrolasen und Transferasen, die sowohl toxifizierend als auch detoxifizierend wirken können. Die Hauptaufgabe der Phase-II-

Enzyme liegt in der Konjugation von Metaboliten, um diese auf renalem oder hepatischem Wege der Ausscheidung zuzuführen.

IWATA ET AL. (1992) beschrieben eine Induktion sowohl der Phase-I- als auch der Phase-II-Enzyme. Die Induktion der mischfunktionalen Oxygenasen bezog sich besonders auf die Typen Cytochrom P450 1A2 und Cytochrom b<sub>5</sub> sowie in geringerem Maße auf Cytochrom P450 1A1 (IWATA ET AL. (1992)). Von den Phase-II-Enzymen wurden die Glutathion-S-transferase, die DT-Diaphorase und die UDP-Glucuronyltransferase durch Moschus Xylol dosisabhängig vermehrt synthetisiert (IWATA ET AL. (1993A)). Zusammenfassend beschrieben die Autoren Moschus Xylol als einen neuen Typ eines Enzyminduktors. Das Muster war mit keinem der bekannten Induktortypen Phenobarbital und 3-Methylantrazen exakt vergleichbar. Es wurde als ein neuer Induktortyp mit bifunktionalen Eigenschaften eingestuft. Eine Studie an Mäusen ergab einen Anstieg der gesamten mikrosomalen Cytochrome P450 nach oraler Gabe von Moschus Xylol und insbesondere einen großen Einfluss auf den Cytochromtyp P450 2B (LEHMAN-MCKEEMAN ET AL. (1995)). Neben der Induktion zeigten die Ergebnisse gleichzeitig eine Inhibition des Cytochromtyp P450 2B, für die sich keine Erklärung finden ließ. Der Prototyp Phenobarbital induzierte insbesondere das Enzym Cytochrom P450 2B und wurde als Lebertumorpromotor bezeichnet, wobei der karzinogene Mechanismus keinen gentoxischen Einfluß aufwies. Die Autoren beschrieben einen kausalen Zusammenhang zwischen der Cytochrom-P450-2B-Induktion und der Tumorpromotion in Nagetieren.

LEHMAN-MCKEEMAN ET AL. (1995) vermuteten, dass die Inhibition entweder vernachlässigt wurde oder diese der Induktion überwog. 1997 konnten LEHMAN-MCKEEMAN ET AL. (1997A, B) die Inhibition von Cytochrom P450 2B durch Moschus Xylol auf eine Reaktion, die nur in vivo vorhanden ist, beschreiben und führten dies auf eine Reaktion im Metabolismus in Verbindung mit Mikroorganismen zurück. Die Enzyminhibition konnte durch einen Metaboliten von Moschus Xylol, entstanden im Fremdstoffmetabolismus durch zusätzlichen Einfluss von Mikroorganismen, erklärt werden (LEHMAN-MCKEEMAN ET AL. (1997 A, B)). Nach Meinung von MINEGISHI ET AL. (1991) bestehe eine Affinität zur Leber von Mäusen und von Ratten. Die Langzeitfütterungsstudien an B6C3F1-Mäusen von MAEKAWA ET AL. (1990) bestätigten dies anhand einer erhöhten Tumorrates, vor allem für Leberzellkarzinome.

Die eingesetzten HepG2-Zellen, in denen Enzyme der Phase I und der Phase II identifiziert wurden (KNASMÜLLER ET AL. (1998)), dienten der Untersuchung einer Toxifizierung von Nitromoschussubstanzen durch metabolisch wirksame Enzyme. Im Regelfall dienen die Enzyme des hepatischen Kreislaufs einer Detoxifizierung giftiger Substanzen, um eine Ausscheidung über nicht-toxische Metaboliten gewährleisten zu können. Diese Wirkung kann jedoch das Gegenteil auslösen, und zwar die Toxifizierung von Fremdstoffen zu toxischen Metaboliten, die den Organismus schädigen können. Die Zelllinie HepG2 wurde bereits als Nachweisverfahren indirekt gentoxisch wirkender Substanzen eingesetzt (DARROUDI UND NATARAJAN (1994)). Der Einsatz von HepG2-Zellen in Verbindung mit dem Mikrokern-Test wurde als äußerst brauchbar zur Untersuchung gentoxischer Karzinogene beschrieben (MAJER ET AL. (2004)) und zur Untersuchung indirekt wirkender Toxine auf ihr gentoxisches Potential (DARROUDI ET AL. 1996)). Als Testsystem diente in der vorliegenden Arbeit der Mikrokern-Test. Die Ergebnisse zeigten keine signifikant erhöhten Mikrokernraten, woraus zu folgern ist, dass die Nitromoschusverbindungen in den HepG2-Zellen keiner Toxifizierung unterliegen.

Nach einer Analyse von MINEGISHI ET AL. (1991) konnten neun Metaboliten von Moschus Xylol im Stoffwechsel von Ratten dargestellt werden. Die Metaboliten wurden durch die Massenspektrometrie ermittelt und miteinander verglichen. Für die Metabolisierung konnten zwei Reaktionsschritte aufgezeigt werden, bei denen es sich erstens um die Reduktion der Nitrogruppe an Position 2 des Benzolringes zur Aminogruppe mit weiterer Azetylierung handelt und zweitens um die Oxidation der Methylgruppe des Metaboliten zwei, welcher als 2-NH<sub>2</sub>-Moschus-Xylol bezeichnet wurde. Mit der Gaschromatographie und der Dünnschichtchromatographie wurden außerdem die kumulativen Konzentrationen in verschiedenen Stoffwechselprodukten und in am Stoffwechsel beteiligten Organen gemessen. Die Werte zeigten eine vermehrte Anreicherung in der Gallenflüssigkeit. Die Nitromoschussubstanzen wurden entsprechend ihrer lipophilen Eigenschaften mit der Gallenflüssigkeit über den enterohepatischen Kreislauf und in geringerem Maße im Urin ausgeschieden. Für die Reaktionsfähigkeit im Stoffwechsel machten MINEGISHI ET AL. (1991) die funktionellen Gruppen des Benzolringes verantwortlich, die aufgrund ihrer sterischen Verhältnisse von unterschiedlicher Bedeutung waren. In dieser Studie konnte den Metaboliten keine Kanzerogenität nachgewiesen werden. Ein Ausscheidungsprodukt

von Moschus Xylol 4-Amino-Xylol wurde in Wasserproben der Elbe in 6 mal höherer Konzentration nachgewiesen als der Ausgangsstoff Moschus Xylol (GATERMANN ET AL. (1998)).

Da die Nitromoschusverbindungen selbst nicht im Metabolismus toxifiziert wurden, galt es zu klären, ob Nitromoschussubstanzen die Enzymsynthese induzieren können. Die Enzyminduktion spielt eine Rolle, wenn durch die gesteigerte Synthese andere Stoffe, sogenannte Prägenotoxine, toxifiziert werden.

Die Ergebnisse eines Enzyminduktionstests in Rattenleberzellen deuteten auf die Induktion von leberspezifischen Mischoxygenasen (MERSCH-SUNDERMANN ET AL., 1996) hin. Als Grundlage wurden die Nitromoschusverbindungen auf ein kogentoxisches Potential untersucht. Dazu verwendete man die als bekannt eingestuftes Prägenotoxine Benz[a]pyren, 2-Aminoanthrazen sowie Aflatoxin B1 und bestimmte die Gentoxizität ihrer reaktiven Metaboliten nach Zusatz von Nitromoschusverbindungen im SOS-Chromotest. Es ging daraus hervor, dass Moschus Keton die Cytochrome P450 1A1 und Moschus Xylol die Cytochrome P450 1A2 Isoenzyme induzierte. Die Autoren wiesen auf eine kogentoxische Wirkung der Nitromoschussubstanzen hin, die sich in diesem Fall auf die Rattenleber bezog. Über einen kogentoxischen Einfluss in Gegenwart von Prägenotoxinen im menschlichen Organismus ließ sich nur spekulieren, da sich das Enzymsystem von Säugetieren wie der Ratte und der Maus nicht ohne Einschränkung auf den menschlichen Organismus übertragen läßt. Als indirekter Hinweis dienen die Ergebnisse der Gentoxizitätstests mit metabolisch aktiven Zellen, welche kein induzierendes Potential der Nitromoschussubstanzen zeigten. Endgültige Aussagen konnten jedoch nur nach Durchführung von Induktionstests mit menschlichem Zellgut getroffen werden. Dazu wurden von MERSCH-SUNDERMANN ET AL. (2001) Untersuchungen mit Moschus Keton und Benzapyren in HepG2-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Moschus Keton eine höhere durch Benzapyren induzierte Mikrokernrate in HepG2-Zellen bedingte als beide Stoffe allein. Daraus folgerte man eine Induktion der Phase-I-Enzyme und ein komutagenes Potential von Moschus Keton.

Das gentoxische und mutagene Potential von Moschus Keton als Einzelsubstanz wurde in mehreren Testsystemen untersucht. Dazu gehörten der Salmonella-typhimurium-Test (NAIR ET AL. (1986); EMIG ET AL. (1996)), der SOS-Chromotest (EMIG ET AL. (1996); KEVEKORDES ET AL. (1996)) und Kurzzeittestsysteme in Hamsterzellen,

Mauszellkulturen und in primären Hepatozyten von Ratten (API ET AL. (1996)). In allen Untersuchungen konnte kein gentoxisches und kein mutagenes Potential für Moschus Keton aufgezeigt werden. Die Ergebnisse von Moschus Keton korrelieren mit den Ergebnissen des Schwesterchromatidaustausch-Tests und des Mikrokern-Tests in Humanlymphozyten und humanen Leberzellen, in denen keine gentoxischen Effekte erzielt wurden.

Ein Bericht der Europäischen Union zu Moschus Xylol (EU RISK ASSESSMENT REPORT (2005)) und Moschus Keton (EU RISK ASSESSMENT REPORT (2005)) kommt zu der Einschätzung, dass keine weiteren Maßnahmen zur Risikoreduzierung notwendig sind als die, die bereits ergriffen werden.

Zur Enzyminduktion durch Moschus Keton wurde ein dem Moschus Xylol entsprechendes Muster beschrieben (STUARD ET AL. (1997), SCHMEISER ET AL. 2001)). Moschus Keton induzierte hauptsächlich Cytochrom P450 Typ 2B und in geringerem Maße die Typen 1A und 3A. Weiterhin wurde in Fütterungsstudien von Mäusen mit Moschus Keton eine histologische Veränderung der Leberzellstruktur in Form von Hypertrophien gesehen. Dies entsprach dem Reaktionsmuster von Phenobarbital (STUARD ET AL. (1997)).

Für Moschus Keton konnten 2 Metaboliten ermittelt werden, und zwar 2-Amino-Keton und 4-Amino-Keton, beide wurden in Wasserproben der Elbe in 3 - 10 mal höheren Konzentrationen als Moschus Keton nachgewiesen (GATERMANN ET AL. (1998)).

Auch die Stoffwechselprodukte der Nitromoschusverbindungen spielen demzufolge in der Akkumulation in der Umwelt eine Rolle.

Zur Mutagenität der Nitromoschusverbindungen Moschus Mosken und Moschus Tibeten wurden keine signifikant erhöhten Ergebnisse im Salmonella-typhimurium-Test (NAIR ET AL. (1986); EMIG ET AL. (1996)) und im SOS-Chromotest (EMIG ET AL. (1996); KEVEKORDES ET AL. (1996)) beschrieben. Eine Untersuchung zur fotochemischen Stabilität von Moschus Tibeten zeigte, dass ein Hauptprodukt unter Sonnenlicht entstand, welches länger in der Umwelt persistierte als das Ausgangsprodukt (CANTERINO ET AL. (2008)).

Ein Großteil der Analysen befassen sich mit den beiden Hauptvertretern der Nitromoschusverbindungen Moschus Xylol und Moschus Keton. Es gibt wahrscheinlich weniger Daten von Moschus Mosken und Moschus Tibeten aufgrund der geringeren Relevanz in der Anwendung. Da im Schwesterchromatidaustausch-

Test und im Mikrokern-Test mit Humanlymphozyten und Humanhepatozyten kein gentoxischer Effekt nachweisbar war, können diese im Zusammenhang mit den vorhandenen Daten ebenfalls als nicht-gentoxisch eingestuft werden.

Bekannt ist, dass die Nitromoschusverbindungen aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften ein hohes Akkumulationspotential aufweisen. In der Literatur wurden die unterschiedlichen Wege des natürlichen Kreislaufes, die zur Akkumulation in der Umwelt führen, beschrieben. Im Mittelpunkt stand dabei der Mensch, der durch den Verbrauch dieser Zusatzstoffe in Haushalt und Industrie zur Verbreitung beitrug. Seine eigene Gefährdung konnte im Bereich der genetischen Wirkung mit diesen Untersuchungen geklärt werden. Das Hauptproblem der Nitromoschussubstanzen liegt in ihrer lipophilen Eigenschaft und der damit verbundenen Akkumulation, welches auch den menschlichen Organismus, insbesondere das Fettgewebe betrifft. Zahlreiche Untersuchungen haben die Verbreitung der Nitromoschusverbindungen in aquatischen und terrestrischen Umweltsystemen sowie in menschlichem Gewebe bestätigt. In diesem Zusammenhang galt zunächst festzustellen, auf welche Weise eine Belastung des menschlichen Organismus zustande kommen kann. Als Aufnahmewege wurden die dermale Absorption durch den Gebrauch von Kosmetika, Waschmitteln etc., die orale Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, z.B. Fisch und Muscheln und als weitere Möglichkeit die Inhalation beschrieben.

Um die Bedeutung der einzelnen Aufnahmewege einzustufen zu können, wurden Messungen zur Halbwertszeit im Körper durchgeführt. Von KOKOT-HELBLING ET AL. (1995) wurde eine Halbwertszeit nach oraler Belastung bei Menschen von ungefähr 100 Tagen ermittelt, wobei von einem durchschnittlichen Körperfettanteil von 25% ausgegangen wurde. Die Analysen zeigten, dass die Halbwertszeit der lipophilen Nitromoschussubstanzen wesentlich vom Anteil des Körperfetts abhing. Die Anreicherung im Humanfett, die in mehreren Untersuchungen dargestellt wurden, bestätigte diesen Zusammenhang. KOKOT-HELBLING ET AL. (1995) kamen nach ihren oralen Belastungsversuchen mit Moschus Xylol an drei Probanden zu einer Gesamtkörperbelastung bei einem Menschen mit 70 kg Körpergewicht von 1,75 mg, welche als ein unzulässig hohes Risiko eingestuft wurde.

Nach einer Studie im Rahmen des Human-Biomonitoring von KÄFFERLEIN ET AL. (1997) wurden Daten zur Belastung des Menschen durch Moschus Xylol erhoben. In

91,7% der Blutproben wurden Moschus-Xylol-Werte im Bereich von 0,1 - 1,12 µg/l Plasma nachgewiesen. Das gemischte Probengut ergab, dass weder ein unterschiedlich hoher Fischkonsum noch das Alter einen signifikanten Einfluss auf den Moschus-Xylol-Gehalt im Venenblut hatten. Aus diesem Zusammenhang schlossen die Autoren eine Akkumulation von Moschus Xylol im menschlichen Organismus aus. Messungen zur Nitromoschuskonzentration im Blut junger Konsumenten von Kosmetika ergaben, dass in 79% der Blutproben Moschus Xylol und in 17% der Blutanalysen Moschus Keton in Konzentrationen von maximal 60 ng/l bzw. 67 ng/l nachweisbar waren. Interessanterweise fand sich trotz des Verbotes in einer Blutprobe einer Probandin Moschus Ambrette. Die von dieser Probandin benutzten Kosmetika eines Herstellers waren frei von Moschus Ambrette. Die Blutproben wurden im Zusammenhang mit dem täglichen Kosmetikverbrauch, Körperbau, Hautbeschaffenheit und Fischkonsum ausgewertet. Die Körperoberfläche zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Blutkonzentrationen. Weder Fischkonsum noch das Verbrauchsverhalten von Kosmetika hatten signifikante Effekte (HUTTER ET AL. (2009)). Man nahm abschließend an, dass trotz sinkendem Kosmetikgebrauch die Belastung mit Nitromoschusverbindungen in entsprechenden Produkten anhalten wird. Es zeigte sich in einer Untersuchung des Umweltbundesamtes in Österreich, dass das Geschlecht eine wesentliche Rolle spielte. Frauen waren mehr betroffen, welches auf den allgemein höheren Kosmetikgebrauch, besonders von Körpercremes zurückgeführt wurde. Menschen mit trockener oder fetter Hautbeschaffenheit wiesen tendenziell höhere Blutkonzentrationen auf als Menschen mit Mischformen (Umweltbundesamt (2003)). Eine Untersuchung älterer Probandinnen, die 50 Jahre und älter waren, zeigte vergleichsweise höhere Plasmakonzentrationen, insbesondere an Moschus Xylol. In 62 % der Proben konnten bis zu 190 ng/l Moschus Xylol gemessen werden. Es wurde anhand einer Befragung, die gleichzeitig mit der Auswertung der Blutproben erfolgte, ein Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Seife und Weichspülern aufgezeigt. Verantwortlich dafür könnte der Alterungsprozess der Haut sein, der eine höhere dermale Absorption begünstigen könnte (HUTTER ET AL. (2010)). Die dermale Absorption galt als entscheidend für die Aufnahme von Nitromoschusverbindungen (ROOSENS ET AL. (2007)). HAWKINS UND FORD (1999) untersuchten zunächst die Absorptionsrate und die Ausscheidung in Ratten, es

konnten nach 5 Tagen 0,4 - 2,1% der verabreichten Menge als Rückstände im Knochen und Gewebe nachgewiesen werden. Es folgte eine Untersuchung an sieben männlichen Probanden, an denen die Absorptionsraten und die Menge an Nitromoschus im Urin und Faeces gemessen wurden (HAWKINS ET AL. (2002)). Im Unterschied zu Ratten war die Absorptionsquote 20 - 60 mal geringer und die Elimination erfolgte hauptsächlich über die Nieren. Bei Ratten dominierte die biliäre Exkretion, so dass sich auch geringfügige Unterschiede in der Verstoffwechslung und den Stoffwechselprodukten zeigten. Aufgrund der geringen Absorption über die menschliche Haut und einem fehlenden Nachweis von Rückständen im Organismus wurde das Risiko als geringfügig eingestuft.

Die direkte Wirkung der Nitromoschussubstanzen auf der Haut wurde in Versuchen mit Moschus Ambrette getestet (KROON (1997)). Es konnte eine fotoallergische Wirkung nachgewiesen werden. In zwei Fällen wurden nach Benutzung Moschus-Ambrette-haltiger Kosmetika bei den Probanden Hautekzeme beobachtet. Die Durchführung von Patch-Tests bestätigten diese Wirkung (BRUZE ET AL. (1985)). Diese Untersuchungen konnten jedoch keine Aussage über das Ausmaß einer Belastung durch dermale Resorption machen. Als Nebenbefund zeigte sich, dass Moschus Ambrette toxische Risiken für die Haut in sich birgt.

Der zweite Aufnahmepfad über die Nahrungskette wurde als nicht relevant eingestuft. Auch erhöhter Fischkonsum hatte keine signifikant erhöhte Konzentration an Nitromoschus im Blut zur Folge (HUTTER ET AL. (2009)).

Als dritter Aufnahmeweg von Nitromoschussubstanzen wurde der inhalative Mechanismus diskutiert (KOKOT-HELBLING, 1995). Es gibt wenige Anhaltspunkte für eine inhalative Belastung. Nitromoschusverbindungen sind auch Bestandteil in Raumluftverbesserern, Deodoranten und Räucherstäbchen. Aus diesem Grund kann eine inhalative Aufnahme nicht ausgeschlossen werden. Es gibt wenig Daten über eine Belastung der Luft durch Nitromoschussubstanzen. KALLENBORN ET AL. (1999) untersuchten Luftproben in Norwegen, in denen Moschus Xylol und Moschus Keton nachweisbar waren. Es zeigten sich unterschiedliche Konzentrationen in Proben aus einem ländlichen Gebiet im Vergleich zu dichter besiedelten Gebieten, woraus sich schließen lässt, dass ein menschlicher Einfluss auf die Luftkonzentration von Bedeutung sein könnte. PECK UND HORNBuckle (2006) fanden ähnliche Ergebnisse in Iowa (USA), wo sie Luftproben aus unterschiedlich besiedelten Gebieten

untersuchten. In Nordspanien wurden Raumlufthproben unter anderem auf Nitromoschus getestet. Zur Analyse wurden mehrere Hausstaubproben aus spanischen Wohnhäusern herangezogen. Dabei konnten in allen Proben Moschus Xylol und Moschus Keton und mit einer Ausnahme auch Moschus Mosken nachgewiesen werden. Auch die Rückstände im Hausstaub sollten für die Risikoabschätzung berücksichtigt werden, denn trotz abnehmender Produktion und Verwendung von Nitromoschus in Europa lassen sich die Substanzen weiterhin nachweisen (REGUEIRO ET AL. (2007)).

Bereits 1993 wurde vom Pressedienst des Industrieverbandes Körperpflege- und Waschmittel e.V. eine Empfehlung zum vorsorglichen Verzicht insbesondere von Moschus Xylol in Kosmetika und Haushaltsprodukten veröffentlicht. Der Mensch trägt unbewusst seinen Teil zur Verbreitung von Nitromoschus bei, indem er Kosmetika und Waschmittel verwendet. Da keine Kennzeichnungspflicht für die einzelnen Duftstoffe besteht, hat der Mensch kaum die Möglichkeit, diesen Produkten aus dem Weg zu gehen. Daher ist der Schritt der deutschen Kosmetik- und Waschmittelhersteller ein richtiger Weg gewesen, um die Verbreitung dieser Duftstoffe einzudämmen. Problematisch ist der anhaltende Einsatz der Nitromoschusverbindungen auf dem asiatischen Markt der Kosmetik- und Waschmittelherstellung, der durch den Import dieser Waren auch weiterhin Europa betrifft. Die Kosmetikrichtlinie der Europäischen Union, die bereits seit 1976 besteht und immer wieder aktualisiert wird, zuletzt 2008, enthält in Anhang II Stoffe, die als kanzerogen, mutagen oder teratogen eingestuft wurden und als Bestandteil von Kosmetika verboten sind. Moschus Ambrette ist in diesem Anhang aufgeführt, so dass ein erster Schritt zum Verbot gemacht wurde.

Neben den umweltmedizinischen Aspekten wurden endokrine Wirkungen diskutiert. In humanen MCF-7-Brustkrebszellen nahm die Zellvermehrung unter Zusatz von Nitromoschus signifikant zu, welches eine erhöhte östrogene Wirkung vermuten ließ, die aber vergleichsweise geringer war als 17- $\beta$ -Östradiol (BITSCH ET AL. (2002)). Eine Blutuntersuchung in Heidelberg ließ den Verdacht aufkommen, dass Moschus Xylol und Moschus Keton Einfluß auf die hormonelle Steuerung im Hypothalamus-Ovarial-System nehmen könnten (EISENHARDT ET AL. (2001)). Neben endokrinen Wirkungen konnte eine Beeinflussung zellulärer Abwehrmechanismen aufgezeigt werden.

Untersuchungen an Muscheln der Gattung *Mytilus californianus* von LUCKENBACH ET AL. (2004) und LUCKENBACH UND EPEL (2005) ergaben, dass die Transportmechanismen zur Entfernung von Fremdstoffen nach Exposition mit Nitromoschus gehemmt wurden und die Fremdstoffe länger akkumulierten. Ein Einfluss auf die Fortpflanzungsfähigkeit der im Wasser lebenden Tiere, die durch die Akkumulation der Nitromoschusverbindungen ausgesetzt sind, ist nicht eindeutig. CHOU UND DIETRICH (1999) schlußfolgerten aus ihren Untersuchungen an Froschlarven (*Xenopus laevis*) und Zebrafischen (*Danio rerio*), dass Nitromoschus die Lebensfähigkeit nicht gefährdet. CARLSSON ET AL. (2000) beobachteten hingegen eine verminderte Fortpflanzung und Lebensfähigkeit in Zebrafischen (*Danio rerio*) durch Kontamination mit Moschus Keton. Ebenso zeigte ein Toxizitätstest an Krebsen (*Nitocra spinipes*), dass Nitromoschussubstanzen negativen Einfluss auf die Population der Krebse hatten (BREITHOLTZ ET AL. (2003)). Auch eine Beobachtung der Larvenentwicklung von Krebsen (*Acartia tonsa*) bestätigte einen negativen Einfluss durch Moschus Keton (WOLLENBERGER ET AL. (2003)).

Die ökologischen Aspekte der Nitromoschussubstanzen sind nicht unerheblich. Bereits 1999 wurde in einem Übersichtsbeitrag zur Bewertung von Nitromoschus auf die umweltmedizinischen Risiken hingewiesen (KEVEKORDES ET AL. (1999)). Eine Zusammenfassung der Belastung durch Nitromoschus in den nordeuropäischen Ländern (Island, Schweden, Norwegen, Finnland und Dänemark) weist auf die erhöhten Konzentrationen besonders im Abwasser hin und empfiehlt eine effizientere Reduzierung durch Kläranlagen und dauerhaftes Monitoring, insbesondere aquatischer Systeme (TEMANORD (2004)). Die Europäische Chemikalienagentur ECHA stuft Moschus Xylol als einen Stoff mit hoher Persistenz und hoher Bioakkumulation ohne hohe Toxizität ein (ECHA (2008)). Studien zeigen das anhaltende Vorkommen der Nitromoschusverbindungen, so wurden diese aktuell in Gewässern Südenslands (SUMNER ET AL. (2010)) nachgewiesen. Es zeigt sich anhand der durchgeführten ökologischen Untersuchungen, dass das Interesse an diesen synthetischen Duftstoffen fortbesteht und auch in Zukunft von Bedeutung sein wird.

Aus präventivmedizinischer Sicht sollte die Belastung des Menschen mit synthetischen Nitromoschusverbindungen so weit wie möglich minimiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Nitromoschussubstanzen Moschus Ambrette, Moschus Xylol, Moschus Keton, Moschus Mosken und Moschus Tibeten sind künstliche Duftstoffe, die als Geruchsverstärker bzw. Geruchsträger in Wasch- und Reinigungsmitteln, Körperpflegemitteln und kosmetischen Produkten Verwendung finden. Weiterhin wurden sie früher als Geruchsstoffe in Lebensmitteln, in der Tiernahrung und in Fischködern eingesetzt.

Die Persistenz von Nitromoschusverbindungen in der Umwelt sowie deren Anreicherung in der Nahrungskette führte in den letzten Jahren zum Nachweis insbesondere von Moschus Xylol und Moschus Keton in aquatischen Systemen, humanem Fettgewebe und Frauenmilch.

Zur Abschätzung einer möglichen Gesundheitsgefährdung des Menschen wurden die fünf Nitromoschusverbindungen im Schwesterchromatidaustausch-Test und im Mikrokern-Test auf ihre Gentoxizität untersucht.

Der Schwesterchromatidaustausch-Test dient der Prüfung von DNA-Schäden und Störungen des DNA-Stoffwechsels, indem die Bildung von Schwesterchromatidaustauschen ermittelt wird. Anhand der Zahl der Austauschraten kann eine gentoxische Einwirkung durch chemische Agenzien abgeleitet werden.

Der Mikrokern-Test prüft strukturelle Veränderungen der Chromosomen durch klastogene Effekte (chromosomenbrechend) und numerische Chromosomenmutationen (Aneuploidien) durch aneugene Effekte (den Spindelapparat schädigend). Das Prinzip des Mikrokern-Tests ist die Darstellung von kleinen Nuklei, die aus abgespaltenen Chromosomenanteilen entstehen.

Als Zellgut wurden im Schwesterchromatidaustausch-Test Humanlymphozyten und als metabolisierendes System S9, ein Rattenleberextrakt, verwendet. Im Mikrokern-Test wurden Humanlymphozyten und zur Testung mit Metabolisierung wurden HepG2-Zellen, bei denen es sich um eine Zelllinie metabolisch aktiver Hepatozyten handelt, eingesetzt.

Im Schwesterchromatidaustausch-Test mit Humanlymphozyten zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Austauschraten durch Nitromoschus. Der Einsatz von S9-Mix zur metabolischen Aktivierung ergab keine erhöhten gentoxischen Effekte. Im

Mikrokern-Test mit Humanlymphozyten und HepG2-Zellen induzierten die Nitromoschussubstanzen keine signifikant erhöhten Mikrokerne. Diese Ergebnisse entsprachen überwiegend Ergebnissen anderer Kurzeittestsysteme zur Erkennung genotoxischer Effekte.

## 6. Literaturverzeichnis

**Aden DP**, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles B (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615 - 616

**Aghamohammadi SZ**, Henderson L, Cole RJ (1984): The human lymphocyte micronucleus assay. Response of cord blood lymphocytes to  $\gamma$ -irradiation and bleomycin. *Mutat Res* 130 (6), 395 - 401

**Angerer J**, Käfferlein HU (1997): Gas chromatographic method using electron-capture detection for the determination of *musk xylene* in human blood samples: Biological monitoring of the general population. *J Chromatogr B : Biomedical Applications* 693, 71 - 78

**Api AM**, Ford RA, San RHC (1995): An evaluation of *musk xylene* in a battery of genotoxicity tests. *Food Chem Toxicol* 33 (12), 1039 - 1045

**Api AM**, Pfitzer EA, San RHC (1996): An evaluation of genotoxicity tests with *musk ketone*. *Food Chem Toxicol* 34, 633 - 638

**Bedoukian PZ**: *Perfumery and Flavouring Synthetics*. 3rd Ed. Allured Publ. Corp., Wheaton (Ill.) 1986, 322 - 333

**Bitsch N**, Dudas C, Korner W, Failing K, Biselli S, Rimkus G, Brunn H (2002): Estrogenic activity of *musk* fragrances detected by the E-screen assay using human MCF-7 cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 43 (3), 257 - 264

**Boyum A** (1964): Separation of white blood cells. *Nature* 204, 793 - 794

**Breitholtz M**, Wollenberger L, Dinan L (2003): Effects of four *synthetic musks* on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquat Toxicol* 63 (2), 103 - 118

**Bruze M**, Edman B, Niklasson B, Möller H (1985): Thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography of *musk ambrette* and *other nitromusk* compounds including photopatch studies. *Photodermatology* 2, 295 - 302

**Canterino M**, Marotta R, Temussi F, Zarrelli A (2008): Photochemical behaviour of *musk tibetene*. A chemical and kinetic investigation. *Environ Sci Pollut Res Int* 50 (3), 182 - 187

**Carlsson G**, Orn S, Andersson PL, Söderström H, Norrgren L (2000): The impact of *musk ketone* on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar Environ Res* 50 (1-5), 237 - 241

**Chou YJ**, Dietrich DR (1999): Toxicity of *nitromusks* in early lifestages of South African clawed frog (*Xenopus laevis*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Lett* 111 (1-2), 17 - 25

**Coroneos E**, Sim E (1993): Arylamine-N-acetyltransferase activity in human cultured cell lines. *Biochem J* 294 (2), 481 - 486

**Countryman PI**, Heddle JA (1976): The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41, 321 - 332

**Darroudi F**, Natarajan AT (1994): Induction of sister-chromatid exchanges, micronuclei and gene mutations by indirectly acting promutagens using human hepatoma cells as an activation system. *ATLA - Alternatives To Laboratory Animals* 22, 445 - 453 (Fourth Joint Dutch In Vitro Toxicology Meeting)

**Darroudi F**, Meijers CM, Hadjidekova V, Natarajan AT (1996): Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent in situ hybridization with a DNA centromeric probe. *Mutagenesis* 11 (5), 425 - 433

**Dearfield KL**, Jacobson-Kram DK, Brown NA, Williams JR (1983): Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology. *Mutat Res* 108, 437 - 449

**Diamond I**, Kruszewski F, Aden DP (1980): Metabolic activation of benzo(a)pyrene by a human hepatoma cell line. *Carcinogenesis* 1 (10), 871 - 875

**DiGiovanni J**, Singer JM, Diamond L (1984): Comparison of the metabolic activation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene by a human hepatoma cell line (Hep G2) and low passage hamster embryo cells. *Canc Res* 44 (7), 2878 - 2884

**Doostdar H**, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1988): The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Lett* 241, 15 - 18

**Duedahl-Olesen L**, Cederberg T, Høgsbro Pedersen K, Højgard A (2005): *Synthetic musk* fragrances in trout from Danish fish farms and human milk. *Chemosphere* 61 (3), 422 - 431

**Duverger-van Bogaert M**, Dierickx PJ, Stecca C, Crutzen MC (1993): Metabolic activation by a supernatant from human hepatoma cells: a possible alternative in mutagenic tests. *Mutat Res* 292 (2), 199 - 204

**Eastmond DA**, Tucker JD (1989): Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* 13, 34 - 43

**ECHA:** SVHC Support Document for Identification of 5-tert-butyl-2,4,6-trinitro-m-xylene as a substance of very high concern. European Chemicals Agency (ECHA), Helsinki 2008

**Eddy EP**, Howard PC, McCoy D, Rosenkranz HS (1987): Mutagenicity, unscheduled DNA synthesis and metabolism of 1-nitropyrene in the human hepatoma cell line Hep G2. *Canc Res* 47, 3163 - 3168

**Eisenhardt S**, Runnebaum B, Bauer K, Gerhard I (2001): *Nitromusk* compounds in woman with gynaecological and endocrine dysfunction. *Environ Res* 87 (3), 123 - 130

**Emig M**, Reinhardt A, Mersch-Sundermann V (1996): A comparative study of five *nitro musk* compounds for genotoxicity in the SOS chromotest and Salmonella mutagenicity. *Toxicol Lett* 85, 151 - 156

**European Union Risk Assessment Report** on 5-tert-butyl-2,4,6-m-xylene (*musk xylene*) Vol 55. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg 2005

**European Union Risk Assessment Report** on 4'-tert-butyl-2',6'-dimethyl-3',5'-dinitroacetophenone (*musk ketone*) Vol 62. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg 2006

**Evans HJ**, O'Riordan ML (1975): Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat Res* 31, 135 - 148

**Fardel O**, Morcel F, Ratanasavanh D, Fautrel A, Beaune P, Guillouze A (1992): Expression of drug metabolizing enzymes in human HepG2 hepatoma cells. In: Cellular and molecular aspects of cirrhosis; Vol.216, hrsg. v. Clement B und Guillouze A; Colloque INSERM/ John Lilbey Eurotest LTD, Montrouge/ Frankreich 1992, 327 - 330

**Fenech M** (1993): The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285, 35 - 44

**Fenech M**, Morley AA (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147, 29 - 36

**Fenech M**, Morley AA (1986): Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 161, 193 - 198

**Gatermann R**, Hühnerfuss H, Rimkus G, Attarand A, Kettrup A (1998): Occurrence of *musk xylene* and *musk ketone* metabolites in the aquatic environment. *Chemosphere* 36, 2535 - 2547

**Glatt HR**, Gemperlein I, Setiaboudi F, Platt KL, Oesch F (1990): Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* 5, 241 - 249

**Grant MH**, Duthie SJ, Gray AG, Burke MD (1988): Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatomacell line. *Biochem Pharmacol* 37, 4111 - 4116

**Hahn J** (1993): Untersuchungen zum Vorkommen von *Moschus-Xylol* in Fischen. *Dtsch Lebensmittel Rundsch* 89 (6), 175 - 177

**Hawkins DR**, Ford RA (1999): Dermal absorption and disposition of *musk ambrette*, *musk ketone* and *musk xylene* in rats. *Toxicol Lett* 111 (1-2), 95 - 103

**Hawkins DR**, Elsom LF, Kirkpatrick D, Ford RA, Api AM (2002): Dermal absorption and disposition of *musk ambrette*, *musk ketone* and *musk xylene* in human subjects. *Toxicol Lett* 131 (3), 147 - 151

**Heeren D, Berset D** (2000): *Nitro musks*, nitro musk amino metabolites and polycyclic musks in sewage sludges: Quantitative determination by HRCG-ion-trap-MS/MS and mass spectral characterization of the amino metabolites. *Chemosphere* 40 (5), 565 - 574

**Hutter HP, Wallner P, Moshhammer H, Hartl W, Sattelberger R, Lorbeer G, Kundi M** (2009): Synthetic *musks* in blood of healthy young adults: Relationship to cosmetic use. *Sci Total Environ* 407, 4821 - 4825

**Hutter HP, Wallner P, Hartl W, Uhl M, Lorbeer G, Gminski R, Mersch-Sundermann V, Kundi M** (2010): Higher blood concentrations of synthetic *musks* in women above fifty years than in younger women. *Int. J Hyg Environ Health* 213 (2), 124 - 130

**Ippen H** (1994): *Nitromoschus* Teil I. *Bundesgesundheitsblatt* 6/ 94, 255 - 260

**Iwata N, Minegishi KI, Suzuki K, Ohno Y, Kawanishi T, Takahashi A** (1992): *Musk xylene* is a novel specific inducer of cytochrome P-450 IA2. *Biochem Biophys Res Commun* 184 (1), 149 - 153

**Iwata N, Minegishi KI, Suzuki K, Ohno Y, Igarashi T, Satoh T, Takahashi A** (1993 a): An unusual profile of *musk xylene*-induced drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Biochem Pharmacol* 45 (8), 1659 - 1665

**Iwata N, Suzuki K, Minegishi KI, Kawanishi T, Hara S, Endo T, Takahashi A** (1993 b): Induction of cytochrome P450 1A2 by *musk* analogues and other inducing agents in rat liver. *Eur J Pharmacol* 248, 243 - 250

**Käfferlein HU, Angerer J** (2001): Trends in the *musk xylene* concentrations in plasma samples from the general population from 1992/1993 to 1998 and the relevance of dermal uptake. *Int Arch Occup Environ Health* 74 (7), 470 - 476

**Käfferlein HU, Göen T, Angerer J** (1997): Belastung der Allgemeinbevölkerung durch *Moschus-Xylol*. *Umweltmed Forsch Prax* 2 (3), 169 - 170

**Kallenborn R**, Gatermann R, Planting S, Rimkus GG, Lund M, Schlabach M, Burkow IC (1999): Gas chromatographic determination of *synthetic musk* compounds in Norwegian air samples. J Chromatogr A 846, 295 - 306

**Kevekordes S**, Grahl K, Zaulig A, Dunkelberg H (1996): Genotoxicity testing of *nitro musks* with the SOS-Chromotest and the sister-chromatid exchange test. Environ Sci Pollut Res 3 (4), 189 - 192

**Kevekordes S**, Gebel TW, Hellwig M, Dames W, Dunkelberg H (1998): Human effect monitoring in cases of occupational exposure to antineoplastic drugs: a method comparison. Occup Environ Med 55, 145 - 149

**Kevekordes S**, Dunkelberg H, Mersch-Sundermann V (1999): Bewertung gesundheitlicher Risiken durch *Nitromoschus*. Umweltmed Forsch Prax 4 (2), 107 - 112

**Knasmüller S**, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, Mersch-Sundermann V, Williamson G, Hietsch G, Langer T, Darroudi F, Natarajan AT (1998): Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutat Res 402 (1-2), 185 - 202

**Knowles BB**, Howe CC, Aden DP (1980): Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen. Science 209, 497 - 499

**Kokot-Helbling K**, Schmid P, Schlatter C (1995): Die Belastung des Menschen mit *Moschus-Xylol* - Aufnahmewege, Pharmakokinetik und toxikologische Bedeutung. Mitt Gebiete Lebensmittel Hyg 86, 1 - 13

**Kroon S** (1979): *Musk Ambrette*, a new cosmetic sensitizer and photo sensitizer. Contact Dermatitis 5, 237 - 238

**Lamberti L**, Bigatti P, Ardito G (1983): Cell kinetics and sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat Res* 120, 193 - 199

**Latt SA** (1973): Microfluorometric detection of desoxyribonucleic acid replication in Human Metaphase Chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 70 (12), 3395 - 3399

**Lehman-McKeeman LD**, Caudill D, Young JA, Dierckman TA (1995): *Musk xylene* induces and inhibits mouse hepatic cytochrome P-450 2B enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 206 (3), 975 - 980

**Lehman-McKeeman LD**, Johnson DR, Caudill D (1997a): Induction and inhibition of Mouse Cytochrome P-450 2B enzymes by *musk xylene*. *Toxicol Appl Pharmacol* 142 (1), 169 - 177

**Lehman-McKeeman LD**, Johnson DR, Caudill D, Stuard SB (1997b): Mechanism-based inactivation of mouse hepatic cytochrome P4502B enzymes by amine metabolites of *musk xylene*. *Drug Metabol Dispos* 25, 384 - 389

**Liebl B**, Ehrenstorfer S (1993): *Nitromoschus-Verbindungen* in der Frauenmilch. *Gesundheits-Wesen* 55, 527 - 532

**Lignell S**, Darnerud PO, Aune M, Cnattingius S, Hajslova J, Setkova L, Glynn A (2008): Temporal trends of *synthetic musk* compounds in mother's milk and associations with personal use of perfumed products. *Environ Sci Technol* 42 (17), 6743 - 6748

**Luckenbach T**, Epel D (2005): *Nitromusk* and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters. *Environ Health Perspect* 113 (1), 17 - 24

**Luckenbach T**, Corsi I, Epel D (2004): Fatal attraction: *synthetic musk* fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. *Mar Environ Res* 58 (2-5), 215 - 219

**Maekawa A**, Matsushima Y, Onodera H, Shibutani M, Ogasawara H, Kodama Y, Kurokawa Y, Hayashi Y (1990): Long-term toxicity/ carcinogenicity of *musk xylol* in B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol* 28 (8), 581 - 586

**Majer BJ**, Mersch-Sundermann V, Darroudi F, Laky B, de Wit K, Knasmüller S (2004): Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutat Res* 551, 153 - 166

**Matter B**, Schmid W (1971): Treminon-induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutat Res* 12, 417 - 425

**Mersch-Sundermann V**, Reinhardt A, Emig M (1996): Untersuchungen zur Mutagenität, Genotoxizität und Kogenotoxizität umweltrelevanter *Nitromoschus-Verbindungen*. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 198, 429 - 442

**Mersch-Sundermann V**, Schneider H, Freywald C, Jenter C, Parzefall W, Knasmüller S (2001): *Musk ketone* enhances benzo(a)pyrene induced mutagenicity in human derived HepG2 cells. *Mutat Res* 495, 89 - 96

**Minegishi KI**, Nambaru S, Fukuoka M, Tanaka A, Nishimaki-Mogami T (1991): Distribution, metabolism, and excretion of *musk xylene* in rats. *Arch Toxicol* 65, 273 - 282

**Müller S**, Schmid P, Schlatter C (1996): Occurrence of *nitro and non-nitro benzenoid musk* compounds in human adipose tissue. *Chemosphere*, 33 (1), 17 - 28

**Nair J**, Ohshima H, Malaveille C, Friesen M, O'Neill IK, Hautefeuille A, Bartsch H (1986): Identification, occurrence and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of two synthetic nitroarenes, *musk ambrette* and *musk xylene*, in Indian chewing tobacco and betel quid. *Food Chem Toxicol* 24 (1), 27 - 31

**Natarajan AT**, Darroudi F (1991): Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/ carcinogens. *Mutagenesis* 6 (5), 399 - 403

**Ospar Commission**: Hazardous Substances Series, *Musk xylene and other musks*. OSPAR Commission (Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East-Atlantic), London/ UK 2004

**Parker RD**, Buehler EV, Newman EA (1986): Phototoxicity, photoallergy, and contact sensitization of *nitro musk* perfume raw materials. *Contact Dermatitis* 14, 103 - 109

**Peck AM**, Hornbuckle KC (2004): *Synthetic musk* fragrances in Lake Michigan. *Environ Sci Technol* 38 (2), 367 - 372

**Peck AM**, Hornbuckle KC (2006): *Synthetic musk* fragrances in urban and rural air of Iowa and the Great Lakes. *Atmos Environ* 40, 6101 - 6111

**Peck AM**, Linebaugh EK, Hornbuckle KC (2006): *Synthetic musk fragrances* in Lake Erie and Lake Ontario sediment cores. *Environ Sci Technol* 40 (18), 5629 - 5635

**Perry P**, Wolff S (1974): New giemsa method for the differential straining of sister chromatids. *Nature* 251, 156

**Peters RJB** (2004): Man-made Chemicals in Human Blood. TNO-Report R 2004/493

**Regueiro J**, Llompert M, Garcia-Jares C, Cela R (2007): Development of a high-throughput method for the determination of organochlorinated compounds, *nitromusks* and pyrethroid insecticides in indoor dust. *J Chromatogr A* 1174, 112 - 124

**Reiner JL**, Wong CM, Arcaro KF, Kannan K (2007): *Synthetic musk fragrances* in human milk from the United States. *Environ Sci Technol* 41 (11), 3815 - 3820

**Richtlinie 76/768/EWG** des Rates vom 27. Juli 1976 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über kosmetische Mittel. Amtsblatt Nr. L262 vom 27/09/1976, 169 - 200

**Rimkus G**, Wolf M (1993 a): Nachweis von *Nitromoschus-Verbindungen* in Frauenmilch und Humanfett. Dtsch Lebensmittel Rundsch 89 (4), 103 - 107

**Rimkus G**, Wolf M (1993 b): Rückstände und Verunreinigungen in Fischen aus Aquakultur. Dtsch Lebensmittel Rundsch 89 (6), 171 - 174

**Römpp** Chemie Lexikon; Falbe J, Regitz M, 9. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1991, Band 4, 2858 – 2859, s.v. Moschus

**Romagna F**: Mikrokern-Testsysteme. In: Mutationsforschung und genetische Toxikologie; hrsg. v. Fahrig R, Wiss. Buchges., Darmstadt 1993, 290 - 298

**Roosens L**, Covaci A, Neels H (2007): Concentrations of *synthetic musk* compounds in personal care and sanitation products and human exposure profiles through dermal application. Chemosphere 69, 1540 - 1547

**Rubinfeld SA**, Luthy RG (2008): *Nitromusk* compounds in San Francisco Bay sediments. Chemosphere 73 (6), 873 - 879

**Sassa S**, Sugita O, Galbraith RA, Kappas A (1987): Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. Biochem Biophys Res Commun 143 (1), 52 - 57

**Schmeiser HH**, Gminski R, Mersch-Sundermann V (2001): Evaluation of health risks caused by *musk ketone*. Int J Hyg Environ Health 203 (4), 293 –299

**Smyth SA**, Lishman L, Alaei M, Kleywegt S, Svoboda L, Yang JJ, Lee HB, Seto P (2007): Sample storage and extraction efficiencies in determination of polycyclic and *nitro musks* in sewage sludge. Chemosphere 67 (2), 267 - 275

**Sommer C** (1993): Gaschromatographische Bestimmung von *Nitromoschus-verbindungen* in Kosmetika und Waschmitteln. Dtsch Lebensmittel Rundsch 89, (4) 108 - 111

**Speit G**: Der Schwesterchromatidenaustausch als Indikator für genotoxische Effekte. In: Mutationsforschung und genetische Toxikologie; hrsg. v. Fahrig R, Wiss. Buchges., Darmstadt 1993, 263 - 273

**Spencer PS**, Bischoff-Fenton MC, Moreno OM, Opdyke DL, Ford RA (1984): Short Communication: Neurotoxic Properties of *Musk Ambrette*. Toxicol Appl Pharmacol 75, 571 - 575

**Stuard SB**, Caudill D, Lehman-McKeeman LD (1997): Characterization of the effects of *musk ketone* on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. Fund Appl Toxicol 40, 264 - 271

**Sumner NR**, Guitart C, Fuentes G, Readman JW (2010): Inputs and distributions of *synthetic musk* fragrances in an estuarine and coastal environment; a case study. Environ Poll 158, 215 - 222

**Surrallés J**, Xamena N, Creus A, Catalán J, Norppa H, Marcos R (1995): Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte culture. Mutat Res 341, 169 - 184

**Tas JW**, Balk F, Ford RA, van de Plassche EJ (1997): Environmental risk assessment of *musk ketone* and *musk xylene* in The Netherlands in accordance with the EU-GTD. Chemosphere 35 (12), 2973 - 3002

**Taylor JH** (1958): Sister chromatid exchanges in tritium labelled chromosomes. Genetics 43, 515 - 529

**TemaNord**: *Musk Compounds* in the Nordic Environment. TemaNord 2004:503, Nordic Council of Ministers, Copenhagen 2004

**Umweltbundesamt:** Humanbiomonitoring von *Moschusduftstoffen*. Endbericht an das Bundesministerium für Gesundheit und Frauen Sektion IV. Umweltbundesamt/ Federal Environment Agency – Austria, Wien 2003

**Vral A,** Verhaegen F, Thierens H, de Ridder L (1994): The in vitro cytokinesis-block micronucleus assay: a detailed description of an improved slide preparation technique for the automated detection of micronuclei in human lymphocytes. *Mutagenesis* 9 (5), 439 - 443

**Walle T,** Walle UK, Shwed JA, Thornburg KR, Mathis CE, Pesola GR (1994): Human phenol sulfotransferases: chiral substrates and expression in Hep G2 cells. *Chem Biol Interact* 92 (1-3), 47 - 55

**Wild D,** King MT, Gocke E, Eckhardt K (1983): Study of artificial flavouring substances for mutagenicity in the Salmonella/ Microsome, Basc and Micronucleus Tests. *Food Chem Toxicol* 21 (6), 707 - 719

**Wollenberger L,** Breitholtz M, Ole Kusk K, Bengtsson BE (2003): Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four *synthetic musks* substances. *Sci Total Environ* 305 (1-3), 53 - 64

**Yamagishi T,** Miyazaki T, Horii S, Kaneko S (1981): Identification of *musk xylene* and *musk ketone* in freshwater fish collected from the Tama river, Tokyo. *Bull Environ Contam Toxicol* 26, 656 - 662

**Yang JJ,** Metcalfe CD (2006): Fate of *synthetic musks* in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids. *Sci Total Environ* 363 (1-3), 149 - 165

**Zakharov AF,** Egolina NA (1972): Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes I. BROMODESOXYURIDIN-revealed differentiation in Chinese Hamster chromosomes. *Chromosoma* 38, 341 - 365

## Lebenslauf

Am 14. Oktober 1970 wurde ich als das älteste von drei Kindern des Fliesenlegers Bernd-Hermann Zaulig und seiner Ehefrau Margret Zaulig, geb. Rödiger in Osterode geboren.

Von 1977 bis 1981 besuchte ich die Grundschule Bad Sachsa. Anschließend wechselte ich auf das Internatsgymnasium Pädagogium Bad Sachsa, wo ich im Mai 1990 die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Ich arbeitete von November 1990 bis Mai 1991 in der Lebenshilfe-Werkstatt für behinderte Menschen in Lamspringe im Rahmen eines Freiwilligen Sozialen Jahres. Im Mai 1991 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Fachbereich Humanmedizin. Während des Studiums konnte ich an der Ausbildung der humanmedizinischen Studenten als wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Anatomie mitwirken. Das Praktische Jahr beendete ich im April 1998 mit dem dritten Staatsexamen im Nordwest-Krankenhaus Sanderbusch und erlangte die Erlaubnis als Ärztin im Praktikum tätig zu werden.

In der Zeit vom 15. Mai 1998 bis 30. September 2000 war ich in der Medizinischen Klinik I des Nordwest-Krankenhauses Sanderbusch im Kreis Friesland tätig.

Vom 2. Mai 2001 bis 30. April 2002 absolvierte ich erfolgreich eine Weiterbildungsmaßnahme zum Thema „Krankenhausmanagement“ in Lübeck.

Von April 2002 bis April 2007 war ich Vollzeit als Mutter tätig.

Seit April 2007 arbeite ich in einem Plasmapherese-Center der Firma CSL Plasma GmbH in Kiel.