

**Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung des
Schadstoffeinflusses auf Seehunde (*Phoca vitulina*)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

**Im Institut für Umweltchemie
der Leuphana Universität Lüneburg**

vorgelegt von

Antonia Wargel

aus Holzminden

Lüneburg 2010

Erstgutachterin: Prof. Dr. Dipl.-Chem. Veronika Hellwig
Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften
Fachhochschule Lübeck
Institut für Küstenforschung, Helmholtz-Zentrum Geesthacht

Zweitgutachter: Prof. Dr.-Ing. Wolfgang K. L. Ruck
Institut für Umweltchemie, Leuphana Universität Lüneburg

Development of a cell culture model to assess the impact of pollutants on harbour seals (*Phoca vitulina*)

Within the Trilateral Monitoring and Assessment Program for the Wadden Sea harbour seals (*Phoca vitulina*) are considered as sensitive indicators for the status of the Wadden Sea ecosystem. Due to their position as top predators in the marine food web and their long life spans, harbour seals are particularly burdened with persistent pollutants like polychlorinated biphenyls (PCBs) and perfluorooctane sulfonate (PFOS). These pollutants accumulate in the food web and numerous studies are indicating that they can cause severe effects on the health of chronically exposed organisms.

The present study contributes to current efforts undertaken to identify novel biomarkers for pollutant exposure of wild-ranging seals. For the early diagnosis of disorders caused by anthropogenic pollutants, pollutant-induced up- or down-regulation of protein expression in hepatocytes presents a potential marker. The aim of the present work was the elaboration of a cell culture model that enables the identification of proteins suiting those biomarker properties. For this purpose primary seal hepatocytes were incubated with pollutants in environmental relevant concentrations. Cells for a control group were only incubated with the respective solvent (isooctane for PCBs; DMSO for PFOS).

So far no description of an isolation procedure of hepatocytes from marine mammals has been published. In consequence, the initial aim of this thesis was to set up an appropriate isolation method for seal hepatocytes. Different methods of cell isolation have been established and compared within the scope of this study. Only the liver biopsy perfusion method turned out to be useful.

Successful application of the cell culture model requires the maintenance of the hepatocytes *in vivo* functions and viability during the three days of cultivation. Three viability assays were applied to assess overall functional cell viability (XTT assay), the hepato-specific urea synthesis and the membrane integrity (LDH assay). By means of these cell assays, the viability of the hepatocytes was examined and the impact of the pollutant's incubation was analysed. The applied pollutant's concentration should not have any detectable influence on the cell's general viability or morphology.

The results of the three viability tests showed that isooctane and the applied PCB concentrations had no negative impact on the cell's viability. Conclusions on the impact of the incubation with PFOS on urea synthesis and overall functional cell viability could not be made due to the high DMSO concentrations in the samples. The incubation with PFOS had no detectable effect on the membrane integrity as indicated by the LDH assay.

The functionality of the cell culture model was assessed through a preliminary series of tests conducted within our workgroup. Therefore proteome analyses of seal hepatocytes which were incubated with 1 μM , 50 μM or 100 μM PCB were performed. First results showed that the protein expression level of some proteins were significantly up-regulated. Sequence analyses suggested that these proteins belong to the cytochrome P450 enzyme complex. This enzyme complex is known to be involved in the degradation of xenobiotics, particular PCBs. Due to pollutant impact, the production of these proteins increases and an up-regulation of the expression level is expected. Therefore, the functionality and applicability of the cell culture model seems to be a valid approach for the identification of potential biomarker.

Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung des Schadstoffeinflusses auf Seehunde (*Phoca vitulina*)

Der Seehund wird in Monitoring-Programmen zum Zustand des Ökosystems Wattenmeer (z.B. TMAP) als ein Indikatororganismus genutzt. Aufgrund der Position im Nahrungsnetz (Top-Prädatoren) und der langen Lebensspanne sind Seehunde besonders stark mit Schadstoffen belastet, u.a. mit Polychlorierten Biphenylen (PCB) und Perfluorooctansulfonat (PFOS). Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass die Schadstoffbelastung die Gesundheit der Seehunde beeinträchtigt. Das Ziel unserer Arbeitsgruppe ist die Identifizierung neuer Biomarker, die im Lebendmonitoring von Seehunden eingesetzt werden können. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ausarbeitung und Etablierung eines Zellkulturmodells, welches in weiterführenden Arbeiten die Identifizierung der Biomarker ermöglicht. Als Biomarker sollen Proteine verwendet werden, die eine Früherkennung von schadstoffbedingten Veränderungen in der Seehundpopulation ermöglichen. Da Hepatozyten an der Metabolisierung von Xenobiotika beteiligt sind, werden sie für das Zellkulturmodell verwendet. Von den Hepatozyten werden *in vivo* Plasmaproteine synthetisiert, die bei *in vitro* Experimenten im Zellkulturmedium nachweisbar sind. Diese Proteine könnten anschließend als Biomarker in einem Lebendmonitoring (Blutproben) an Seehunden eingesetzt werden.

Für das Zellkulturmodell wurden primäre Seehund-Hepatozyten mit Schadstoffen (PCB, PFOS) in umweltrelevanten Konzentrationen inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit dem jeweiligen Lösungsmittel inkubiert wurden (Isooctan für PCB; DMSO für PFOS). Da in der Literatur bisher keine Isolierung von Hepatozyten aus marinen Säugern beschrieben wurde, musste eine geeignete Isolierungsmethode etabliert werden. Die Methode musste die Isolierung vitaler Hepatozyten aus bereits verstorbenen Tieren in ausreichend hoher Menge ermöglichen. Es wurden verschiedene Isolierungsmethoden getestet von denen sich nur die Leberbiopsie Perfusion eignete. Sämtliche Parameter müssen mit den sich anschließenden Proteomanalysen kompatibel sein. Die Hepatozyten müssen ihre Vitalität nach der Isolierung und während der Kultivierung beibehalten. Zur Analyse der Vitalität wurden der XTT- und LDH-Test (allgemeiner Stoffwechsel und Membranintegrität) angewendet sowie die Harnstoffsynthese (leberspezifischer Stoffwechsel) beurteilt. Mit Hilfe der Zelltests wurde die Vitalität der Hepatozyten im Verlauf einer dreitägigen Kultivierung untersucht und der Einfluss einer Schadstoffinkubation auf die Zellvitalität analysiert. Die Schadstoffe sollen in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellvitalität oder Morphologie haben. Die Ergebnisse aus den Vitalitätstests zeigten, dass die verwendeten PCB-Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität hatten. Eine Aussage zum Einfluss einer PFOS-Inkubation auf die Zellen (XTT- und Harnstoff-Test) konnte nicht gemacht werden, da die DMSO-Konzentration in den Proben zu hoch gewählt wurde. Die PFOS-Inkubation hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Membranintegrität.

Anhand erster Testreihen, die in unserer Arbeitsgruppe realisiert wurden, konnte die Funktionalität des Zellkulturmodells überprüft werden. Hierzu wurden Proteomanalysen von Seehund-Hepatozyten durchgeführt, die mit PCB inkubiert wurden. Erste Ergebnisse zeigten, dass es zu einer signifikanten Hochregulierung der Expressionslevel einiger Proteine kam, die am Schadstoffabbau beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde erfolgreich ein Zellkulturmodell mit primären Seehund-Hepatozyten entwickelt, welches die Identifizierung neuer Biomarker für Seehunde ermöglicht.

| | |
|--|-----|
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1 Einleitung und Problemstellung | 1 |
| 2 Stand der Forschung | 9 |
| 3 Entwicklung des Zellkulturmodells | 13 |
| 3.1 Der Seehund (<i>Phoca vitulina</i>) | 14 |
| 3.2 Zellkultur | 16 |
| 3.2.1 Primäre Hepatozyten | 18 |
| 3.2.2 HepG2-Zellen | 21 |
| 3.3 Isolierung primärer Hepatozyten | 21 |
| 3.4 Kultivierung primärer Hepatozyten | 24 |
| 3.5 Optimierungsversuche zur Leberbiopsie Perfusion | 26 |
| 3.6 Kultivierung der HepG2-Zellen | 27 |
| 3.7 Vitalitätstests | 28 |
| 3.7.1 Bestimmung der Zellzahl (Trypanblau-Ausschlusstest) | 29 |
| 3.7.2 Bestimmung der Stoffwechselaktivität (XTT-Test) | 29 |
| 3.7.3 Nachweis spezifischer Stoffwechselaktivität (Harnstoff-Test) | 31 |
| 3.7.4 Beurteilung der Membranschädigung (LDH-Test) | 32 |
| 3.8 Schadstoffe | 34 |
| 3.8.1 Polychlorierte Biphenyle (PCB) | 34 |
| 3.8.1.1 Verwendung und Eigenschaften von PCB | 35 |
| 3.8.1.2 Auswirkungen von PCBs auf marine Säugetiere | 36 |
| 3.8.2 Perfluorooctansulfonat (PFOS) | 40 |
| 3.8.2.1 Verwendung und Eigenschaften von PFOS | 40 |
| 3.8.2.2 Toxizität von PFOS | 41 |
| 3.9 Inkubationsexperimente | 44 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.9.1 | Inkubationsexperimente mit PCB | 47 |
| 3.9.2 | Inkubationsexperimente mit PFOS | 47 |
| 3.10 | Proteinextraktion | 47 |
| 3.11 | Zusammenfassung des Zellkulturmodells | 48 |
| 4 | Material und Methoden | 51 |
| 4.1 | Verwendete Chemikalien | 51 |
| 4.2 | Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial | 53 |
| 4.2.1 | Verwendete Geräte in Geesthacht | 53 |
| 4.2.2 | Verwendete Geräte in Büsum | 53 |
| 4.3 | Verbrauchsmaterial | 54 |
| 4.4 | Probenahme | 55 |
| 4.4.1 | Seehunde | 55 |
| 4.4.2 | Schweine | 58 |
| 4.5 | Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten | 59 |
| 4.5.1 | Mechanische Isolierungsmethoden | 59 |
| 4.5.1.1 | Gewebedissoziation mittels Sieb (GdS) | 59 |
| 4.5.1.2 | Explantat-Kultur (EpK) | 60 |
| 4.5.2 | Enzymatische Isolierungsmethoden | 60 |
| 4.5.2.1 | Gewebedissoziation in PBS (GdP) | 60 |
| 4.5.2.2 | Gewebedissoziation in Medium (GdM) | 61 |
| 4.5.2.3 | Leberbiopsie Perfusion (LbP) | 62 |
| 4.6 | Bestimmung der Zellzahl | 66 |
| 4.7 | Collagenbeschichtung | 66 |
| 4.8 | Optimierungsversuche zur Leberbiopsie Perfusion | 67 |
| 4.8.1 | Kultivierung der HepG2-Zellen | 67 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.9 | Vitalitätstests | 68 |
| 4.9.1 | Bestimmung der allgemeinen Stoffwechselaktivität (XTT-Test) | 68 |
| 4.9.2 | Nachweis der spezifischen Stoffwechselaktivität (Harnstoff-Test) | 69 |
| 4.9.3 | Beurteilung der Membranschädigung (LDH-Test) | 70 |
| 4.10 | Durchführung der Inkubationsexperimente | 70 |
| 4.10.1 | Durchführung der Inkubationsexperimente mit PCB | 70 |
| 4.10.2 | Durchführung der Inkubationsexperimente mit PFOS | 72 |
| 4.11 | Proteinextraktion | 74 |
| 4.12 | Statistik | 75 |
| 5 | Ergebnisse und Diskussion | 76 |
| 5.1 | Krankheitsbilder der beprobten Seehunde | 78 |
| 5.2 | Beprobung der Seehunde und Schweine | 80 |
| 5.3 | Ergebnisse und Diskussion der verwendeten Isolierungs-methoden | 80 |
| 5.3.1 | Mechanische Isolierungsmethoden | 80 |
| 5.3.1.1 | Gewebedissoziation mittels Sieb (GdS) | 81 |
| 5.3.1.2 | Explantatkultur (EpK) | 82 |
| 5.3.2 | Enzymatische Isolierungsmethoden | 82 |
| 5.3.2.1 | Gewebedissoziation in PBS (GdP) | 83 |
| 5.3.2.2 | Gewebedissoziation in Medium (GdM) | 83 |
| 5.3.2.3 | Leberbiopsie Perfusion | 86 |
| 5.3.3 | Vergleichende Diskussion der Isolierungsmethoden | 90 |
| 5.4 | Optimierungsversuche zur Leberbiopsie Perfusion | 94 |
| 5.5 | Kultivierung der HepG2-Zellen | 95 |
| 5.6 | Vitalitätstests | 96 |
| 5.6.1 | Bestimmung der allgemeinen Stoffwechselaktivität (XTT-Test) | 97 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.6.1.1 | Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test | 97 |
| 5.6.1.2 | Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test nach Schadstoffinkubation | 99 |
| 5.6.1.3 | Diskussion der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test | 100 |
| 5.6.1.4 | Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test | 102 |
| 5.6.1.5 | Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test nach Schadstoffinkubation | 103 |
| 5.6.1.6 | Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode | 105 |
| 5.6.1.7 | Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test in Abhängigkeit vom Kulturmedium | 106 |
| 5.6.1.8 | Diskussion der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test | 107 |
| 5.6.1.9 | Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen im XTT | 109 |
| 5.6.1.10 | Veränderung der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen im XTT-Test nach Schadstoffinkubation | 110 |
| 5.6.1.11 | Diskussion der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen | 111 |
| 5.6.1.12 | Vergleichende Diskussion der Stoffwechselaktivität bei den verschiedenen Zelltypen | 112 |
| 5.6.2 | Nachweis der spezifischen Stoffwechselaktivität (Harnstoff-Test) | 112 |
| 5.6.2.1 | Harnstoffsynthese der Seehund-Hepatozyten mit Schadstoffinkubation | 113 |
| 5.6.2.2 | Diskussion der Harnstoffsynthese der Seehund-Hepatozyten nach Schadstoffinkubation | 115 |
| 5.6.2.3 | Harnstoffsynthese der Schweine-Hepatozyten | 117 |
| 5.6.2.4 | Harnstoffsynthese der Schweine-Hepatozyten in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode | 119 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.6.2.5 | Harnstoffsynthese der Schweine-Hepatozyten in Abhängigkeit vom Kulturmedium | 120 |
| 5.6.2.6 | Veränderung der Harnstoffsynthese der Schweine-Hepatozyten während einer 14tägigen Kultivierung | 121 |
| 5.6.2.7 | Diskussion der Harnstoffsynthese primärer Schweine-Hepatozyten | 123 |
| 5.6.2.8 | Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen | 124 |
| 5.6.2.9 | Veränderung der Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen nach Schadstoffinkubation | 125 |
| 5.6.2.10 | Diskussion der Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen | 127 |
| 5.6.2.11 | Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Harnstofftests bei den untersuchten Zelltypen | 127 |
| 5.6.3 | Beurteilung der Membranschädigung (LDH-Freisetzung) | 128 |
| 5.6.3.1 | Veränderung der LDH-Freisetzung der Seehund-Hepatozyten nach Schadstoffinkubation | 129 |
| 5.6.3.2 | Diskussion der LDH-Freisetzung der Seehund-Hepatozyten nach Schadstoffinkubation | 130 |
| 5.6.3.3 | LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten | 132 |
| 5.6.3.4 | Veränderung der LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode | 134 |
| 5.6.3.5 | Veränderung der LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten in Abhängigkeit vom Kulturmedium | 135 |
| 5.6.3.6 | Veränderung der LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten im Verlauf einer 14tägigen Kultivierung | 135 |
| 5.6.3.7 | Vergleichende Diskussion der LDH-Freisetzung bei primären Schweine-Hepatozyten | 136 |
| 5.6.3.8 | LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen | 138 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.6.3.9 | Veränderung der LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen nach Schadstoffinkubation | 138 |
| 5.6.3.10 | Diskussion der LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen | 140 |
| 5.6.3.11 | Vergleichende Diskussion der LDH-Freisetzung bei den untersuchten Zelltypen | 141 |
| 5.6.4 | Zusammenfassung der Ergebnisse der Vitalitätstests und abschließende Diskussion | 142 |
| 5.7 | Allgemeine Bewertung des <i>in vitro</i> Zellkulturmodells | 153 |
| 6 | Ausblick | 160 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 162 |
| 8 | Anhang | 184 |
| 8.1 | Herstellung und Zusammensetzung der Puffer und Mediumzusätze | 184 |
| 8.2 | Erläuterung der medizinischen Fachbegriffe | 187 |
| 8.3 | Zusätzliche Abbildungen zum XTT-Test | 188 |
| 8.3.1 | Veränderung der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen im XTT-Test nach Schadstoffinkubation | 188 |
| 8.3.2 | Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine- Hepatozyten im XTT-Test nach Schadstoffinkubation | 189 |
| 8.3.3 | Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund- Hepatozyten im XTT-Test nach Schadstoffinkubation | 190 |
| 9 | Erklärung zur selbständigen Anfertigung der Arbeit | 192 |
| 10 | Danksagung | 193 |
| 11 | Abbildungsverzeichnis | 195 |
| 12 | Tabellenverzeichnis | 200 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| 2D-Gelelektrophorese | Zweidimensionale Gelelektrophorese |
| Ah-Rezeptor | Arylhydrocarbon Rezeptor |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat |
| CWSS | <i>Common Wadden Sea Secretariat</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>) |
| EMEM | <i>Eagle's Minimal Essential Medium</i> |
| EpK | Explantat Kultur |
| EROD | Ethoxyresorufin-O-Deethylase |
| FCS | Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>) |
| FTZ | Forschungs- und Technologiezentrum Westküste |
| GdM | Gewebedissoziation in Medium |
| GdP | Gewebedissoziation in PBS |
| GdS | Gewebedissoziation mittels Sieb |
| GJIC | interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions (<i>gap junctional intercellular communication</i>) |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure |
| LbP | Leberbiopsie Perfusion |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| m | männlich |
| MALDI | Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>) |
| MS | Massenspektrometrie (<i>mass spectrometry</i>) |
| n.b. | nicht bestimmt |
| PAH | Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (<i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>) |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PBDE | Polybromierte Diphenylether (<i>polybrominated diphenyl ethers</i>) |
| PCB | Polychlorierte Biphenyle (<i>polychlorinated biphenyls</i>) |
| PDV | Seehundstaupevirus (<i>phocine distemper virus</i>) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PFOA | Perfluorooctansäure (<i>perfluorooctanoic acid</i>) |
| PFOS | Perfluorooctansulfonat (<i>perfluorooctanesulfonate</i>) |
| POP | persistente organische Schadstoffe (<i>persistent organic pollutants</i>) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| PROD | Pentoxyresorufin-O-Deethylase |
| Pv | <i>Phoca vitulina</i> |
| RPMI Medium | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standardabweichung (<i>standard deviation</i>) |
| Seehundst. | Seehundstation Friedrichskoog |
| SMP | <i>Seal management plan</i> |
| TCDD | 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo[1,4]dioxin |
| TOF | Flugzeit (<i>time of flight</i>) |
| U | Units |
| UW-Lösung | <i>University of Wisconsin</i> Lösung |
| Vergr. | Vergrößerung |
| vs. | versus (gegenüber gestellt) |
| w | weiblich |
| WME | <i>Williams' Media E</i> |
| XTT | Natrium 3'-[1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium]-bis (4-Methoxy-6-Nitro)-Benzen-Sulfonsäurehydrat) |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1 Einleitung und Problemstellung

Das Wattenmeer ist ein einzigartiges, sensibles Ökosystem, welches besonders erhaltenswert ist. Es dient unter anderem Seehunden (*Phoca vitulina*) sowie zahlreichen Fischarten als Lebensraum und Kinderstube und stellt aufgrund seines außerordentlichen Nahrungsreichtums ein wichtiges Rast- und Fortpflanzungshabitat für viele Vögel dar. Aufgrund seiner Einzigartigkeit wurde das Wattenmeer am 27.06.2009 zum UNESCO Weltnaturerbe ernannt. Um das Wattenmeer über die Landesgrenzen hinaus wirksam schützen zu können, haben sich Dänemark, die Niederlande und Deutschland zusammengeschlossen und halten hierzu seit 1978 regelmäßig (alle 3-4 Jahre) eine Trilaterale Regierungskonferenz ab. Im Zuge dessen wurde 1991 ein gemeinsames, wissenschaftliches Beobachtungsprogramm (*Trilateral Monitoring and Assessment Program* = TMAP) verabschiedet, das seit 1994 durchgeführt wird. Ziel des TMAP ist es, eine wissenschaftliche Beurteilung des Zustandes und der Entwicklung des Ökosystems Wattenmeer zu ermöglichen. Als Parameter für diese Beurteilung werden u. a. Organismen aus verschiedenen Ebenen des Nahrungsnetzes erforscht. Für die Untersuchungen werden Phytoplankton, Makroalgen, Makrozoobenthos, Vögel und marine Säugetiere herangezogen (CWSS, 2008). Drei Arten mariner Säugetiere sind in der Nordsee heimisch: der Seehund (*Phoca vitulina*, Linnaeus 1758), die Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*, Fabricius 1791) und der Schweinswal (*Phocoena phocoena*, Linnaeus 1758). Marine Säuger sind besonders geeignet, um mittel- und langfristige Änderungen im Ökosystem zu erfassen, da sie eine lange Lebensspanne haben, als Top-Prädatoren am oberen Ende der Nahrungskette stehen und daher persistente Schadstoffe akkumulieren (Ross 2000).

Da Seehunde auch Sandbänke und Strände als Lebensraum nutzen, können sie im Lebendmonitoring (s. u.) eingesetzt werden. Dies trifft auch auf die Kegelrobben zu. Allerdings ist die Seehundpopulation derzeit noch deutlich größer als die Population der Kegelrobben (21.571 vs. 2194; TSEG, 2009a,b) was die Aussagekraft der Seehunde als Indikatororganismus erhöht. Ziel unserer Arbeitsgruppe ist die Entwicklung geeigneter Biomarker, die im Lebendmonitoring eingesetzt werden

können. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit der Seehund für die Untersuchungen gewählt.

Neben dem TMAP wurde 1991 das „Abkommen zum Schutz der Seehunde im Wattenmeer“ (*Seal Agreement*) verabschiedet. In diesem Abkommen ist u. a. ein Erhaltungs-, Hege- und Nutzungsplan für die Seehundpopulation im Wattenmeer enthalten. Ferner sind Maßnahmen zur Erforschung und Überwachung der Tiere festgelegt, sowie die Entnahme aus der Natur geregelt. Außerdem wird sowohl der Schutz von Lebensstätten, als auch die Analyse und Eindämmung von Verschmutzungen berücksichtigt (CWSS, 1990). Im Seehundmanagementplan (CWSS, 2007) werden diese Vereinbarungen konkretisiert.

Die Beurteilung des Zustands der Seehundpopulation erfolgt anhand verschiedener Parameter. So werden z. B. demographische Aspekte wie Populationsgröße, Altersstruktur (Verhältnis zwischen juvenilen und adulten Tieren), Geschlechterverteilung, Reproduktions- und Mortalitätsrate erfasst. Darüber hinaus werden zusätzlich medizinische Parameter erhoben (CWSS, 2003; Siebert *et al.*, 2007). Seit 1975 werden im Rahmen des TMAP im gesamten Wattenmeer jedes Jahr im Juni und August Zählungen per Flugzeug vorgenommen (Reijnders *et al.*, 2003a). Dadurch können Aussagen zur Populationsgröße und zum Anteil der Neugeborenen gemacht werden (Reijnders *et al.*, 2003a). Diese Ergebnisse werden in Schleswig-Holstein seit 1992 mit Daten aus einem Lebend- und Totfundmonitoring ergänzt. Die Monitoring Programme werden am Forschungs- und Technologiezentrum Westküste (FTZ) der Universität Kiel in Büsum durchgeführt. Diese Arbeiten erfolgen in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. U. Siebert und werden vom Land Schleswig-Holstein beauftragt. Die Ergebnisse aus den beiden Programmen fließen in das TMAP ein.

Im Rahmen des Lebendmonitorings werden jährlich mindestens zwei Wildfangaktionen durchgeführt (im Frühjahr und Herbst). Bei den Wildfangaktionen wird das Geschlecht der hierfür kurzzeitig eingefangenen Tiere, ihre Länge und das Gewicht bestimmt, sowie das Alter geschätzt (Hasselmeier *et al.*, 2008). Zusätzlich werden Blut-, Kot- und Haarproben sowie Abstriche aus After und Maul genommen. Diese Proben werden unter immunologischen, mikrobiologischen, virologischen,

serologischen, toxikologischen und parasitologischen Aspekten untersucht (Siebert *et al.*, 2003).

Das Totfundmonitoring dient dazu, Erkrankungs- und Todesursachen tot aufgefundener Tiere zu erfassen, sowie Veränderungen im Auftreten von Erregern zu dokumentieren. Die Kadaver werden je nach Erhaltungszustand vollständig bzw. teilweise sezirt und beprobt. Die entnommenen Proben werden mit immunologischen, mikrobiologischen, virologischen, serologischen, toxikologischen und parasitologischen Methoden analysiert (Siebert *et al.*, 2007).

Neben der allgemeinen Beurteilung des Gesundheitszustandes von Seehunden und anderer mariner Säuger wird in den letzten Jahrzehnten verstärkt der Einfluss von Schadstoffen auf die Gesundheit der Tiere untersucht (Olsson *et al.*, 1993; Nyman *et al.*, 2003). In zahlreichen Studien wird ein Zusammenhang zwischen der Schadstoffbelastung und einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes hergestellt (Jepson *et al.*, 1999, 2005; Ross, 2002; Reijnders, 2003b; Reijnders *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2009). Allerdings ist es schwierig, eine direkte Kausalität zwischen Schadstoffeinfluss und Verschlechterung des Allgemeinzustandes bei frei lebenden Tieren herzustellen, da diese einer Vielzahl von Einflüssen gleichzeitig ausgesetzt sind, in der Regel nur wenige Tiere untersucht werden können und die Untersuchungsmethoden begrenzt sind. Eine Möglichkeit zur Analyse der Kausalität sind Fressexperimente an Tieren in Gefangenschaft, die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden können (Reijnders, 1986; De Swart *et al.*, 1994). Solche Experimente sind jedoch aus ethischer Sicht umstritten und zudem in der Durchführung sehr aufwendig.

Als Ersatz bieten sich Zellkulturexperimente an. Hierfür können beispielsweise Zellen aus der zu untersuchenden Tierart isoliert und mit Schadstoffen versetzt werden. Dies wird u. a. an Zellen aus marinen Säugern und Fischen durchgeführt (Marsili *et al.*, 2000; Fossi *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2009; Braathen *et al.*, 2009). Zellkulturen spiegeln den *in vivo* Zustand wider und bieten im Vergleich zu Tierversuchen zahlreiche Vorteile (Andersson *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2002; Nussler *et al.*, 2001). Die Testbedingungen sind einfach zu kontrollieren, es besteht eine größere Flexibilität in der experimentellen Durchführung und die benötigte Menge der Testsubstanzen ist geringer. Zudem können keine Interaktionen mit anderen

Organen stattfinden, was die Interpretation der Daten vereinfacht. Einige der genannten Vorteile stellen jedoch zugleich einen Nachteil dar. Die Tatsache, dass es in einer Zellkultur nicht zu Interaktionen mit anderen Organen kommt, limitiert die Übertragbarkeit und damit die Aussagekraft eines Zellkulturmodells. Es ist nicht möglich, alle Reaktionen, die gleichzeitig in einem Organismus stattfinden, in der Zellkultur zu simulieren. Dies erschwert die Übertragung auf die *in vivo* Situation (Blaauboer, 2008).

Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, Biomarker zu identifizieren mit denen die Auswirkungen eines Schadstoffeinflusses auf den Gesundheitszustand von Seehunden möglichst nicht-invasiv analysiert werden können. In der vorliegenden Arbeit sollte ein Zellkulturmodell ausgearbeitet werden auf dessen Grundlage in weiterführenden Arbeiten die Identifizierung der Biomarker erfolgen kann.

Hier bieten sich Proteine als Biomarker an, weil Xenobiotika (z. B. Schadstoffe, Medikamente) unter anderem Auswirkungen auf den Proteinstoffwechsel haben, wodurch einige Proteine in ihrer Expression hoch- oder dereguliert werden können (Fountoulakis *et al.*, 2002; Farkas *et al.*, 2005). Die Änderungen des Protein-expressionsmusters lassen sich mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) darstellen (Brenez *et al.*, 2004; Görg *et al.*, 2004). Die in ihrer Expression veränderten Proteine können anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und mittels massenspektrometrischen Methoden (z. B. MALDI-TOF/TOF-MS; *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation time of flight mass spectrometry*) analysiert werden. Proteine, deren Expression sich nach einer Inkubation mit einem bestimmten Schadstoff spezifisch verändert, können als Biomarker verwendet werden (Monsinjon und Knigge, 2007). Um diese Proteine später als Biomarker im Lebendmonitoring einsetzen zu können, müssen sie im Blut lebender Tiere nachweisbar sein. Von der Leber werden *in vivo* Plasmaproteine synthetisiert (Campbell und Reece, 2003). Analog zur *in vivo* Situation sind die von den Hepatozyten gebildeten Plasmaproteine im Zellkulturmedium nachweisbar (Gómez-Lechón *et al.*, 1990; Farkas *et al.*, 2005). Ein Vergleich der veränderten Proteine aus dem Zellkulturmedium mit den Plasmaproteinen aus lebenden Seehunden soll eine Identifizierung geeigneter Biomarker ermöglichen. Erste Untersuchungen hierzu wurden in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführt (Behr, 2008a; Behr *et al.*, 2008b;

Last, 2008; Holdt, 2009). Da mit Hilfe des Zellkulturmodells Aussagen zum Fremdstoffwechsel gemacht werden sollen und die Leber an selbigem maßgeblich beteiligt ist, wurden für das Modell Leberzellen (Hepatozyten) verwendet. Damit die *in vivo* Situation möglichst gut wiedergespiegelt wird, wurden nicht Zelllinien, sondern primäre Hepatozyten eingesetzt (s. Kapitel 3.2) (Li, 1998; Donato *et al.*, 1999). Der Fremdstoffmetabolismus ist bei verschiedenen Arten unterschiedlich weshalb es unerlässlich ist, artspezifische Untersuchungen vorzunehmen (Jover *et al.*, 1992; Dickens *et al.*, 2008) (s. Kapitel 3.2.1). Aus diesem Grund wurden für das Zellkulturmodell primäre Seehund-Hepatozyten verwendet. Eine Isolierung primärer Hepatozyten aus marinen Säugern wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, weshalb in der vorliegenden Arbeit zunächst eine geeignete Methode zur Isolierung der Hepatozyten etabliert werden musste. Eine Herausforderung bestand darin, die Zellen aus bereits verstorbenen Tieren zu isolieren. Bei den in der vorliegenden Arbeit beprobten Seehunden handelte es sich ausschließlich um solche Tiere, die eines natürlichen Todes gestorben sind oder aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet werden mussten (s. Kapitel 4.4). Bei der Wahl der Isolierungsmethode mussten einige weitere Rahmenbedingungen beachtet werden. So musste die Methode ohne große Vorbereitungen durchführbar sein, da der Zeitpunkt der Isolierung nicht planbar war. Des Weiteren musste berücksichtigt werden, dass für die Isolierung der Hepatozyten nicht die gesamte Leber zur Verfügung stand, da ein Teil des Lebergewebes für andere Fragestellungen benötigt wurde (Pathologie, Messung der Schadstoffbelastung). Zudem musste die Methode die Isolierung vitaler Hepatozyten für die nachfolgenden Proteomuntersuchungen in ausreichender Menge erlauben (s. Kapitel 3.4).

Die Höhe der benötigten Zellzahl wurde von zwei Faktoren beeinflusst. Zum einen sollte die Zellzahl so gewählt werden, dass für die Zellen optimale Kulturbedingungen herrschen und zum anderen musste gewährleistet sein, dass die Zellzahl eine ausreichend hohe Proteinmenge bei der Proteinextraktion ergibt (s. Kapitel 3.4). Auch bei der Wahl des Kulturmediums musste berücksichtigt werden, dass mit den Proben nach Abschluss der Inkubationsexperimente Proteomanalysen durchgeführt werden. Die Hepatozyten mussten aus diesem Grund in serumfreiem Medium

kultiviert werden, um zu verhindern, dass Serumproteine in der 2D-Gelelektrophorese relevante Proteine überlagern (s. Kapitel 3.4).

Um die Hepatozyten erfolgreich für das Zellkulturmodell einsetzen zu können, mussten sie ihre Vitalität nach der Isolierung und während der Kultivierung beibehalten. Zur Beurteilung der Zellvitalität kamen in der vorliegenden Arbeit verschiedene Vitalitätstests zum Einsatz. Die Vitalitätstests wurden dabei so ausgewählt, dass sie eine Analyse der Vitalität auf unterschiedlichen Ebenen erlauben (s. Kapitel 3.7). Zur Anwendung kamen der XTT-, Harnstoff- und LDH-Test. Hierdurch konnten Aussagen zur allgemeinen Stoffwechselaktivität (XTT-Test) sowie zum spezifischen Metabolismus (Harnstoffsynthese) und zur Membranintegrität (LDH-Test) getroffen werden (s. Kapitel 3.7). Zusätzlich zu den Experimenten mit Seehund-Hepatozyten wurden Versuche mit primären Schweine-Hepatozyten und HepG2-Zellen durchgeführt. Diese Experimente dienten zur Etablierung der Vitalitätsassays.

Mit den Vitalitätstests sollte nicht nur untersucht werden, ob die Zellen nach der Isolierung vital sind, sondern insbesondere die Reaktion der Hepatozyten auf eine Schadstoffinkubation analysiert werden. Die Inkubationsexperimente sind der zentrale Bestandteil des Zellkulturmodells. Die verwendeten Schadstoffe sollen in den eingesetzten Konzentrationen keinen, mit den Vitalitätstests messbaren, Einfluss auf die Zellvitalität haben oder zu sichtbaren morphologischen Veränderungen führen. Zugleich wäre es wünschenswert, dass die Schadstoffinkubation eine Änderung im Proteinexpressionsmuster hervorruft. Dies soll in weiterführenden Arbeiten mit Hilfe der Proteomanalyse untersucht werden.

Als Schadstoffe für die Inkubationsexperimente wurden Polychlorierte Biphenyle (PCB) und Perfluorooctansulfonat (PFOS) eingesetzt. Die Schadstoffe wurden ausgewählt, da sie weltweit in Umweltproben nachweisbar sind und marine Säugetiere als Endglieder der Nahrungskette besonders hohe Schadstoffkonzentrationen aufweisen. Beide Schadstoffe stehen im Verdacht die Gesundheit der marinen Säuger zum Teil erheblich zu beeinträchtigen. In zahlreichen Studien wurden die Auswirkungen einer PCB-Belastung auf marine Säugetiere untersucht. Es gibt Hinweise darauf, dass PCB bei marinen Säugern u. a. zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems führt und ein erhöhtes Tumorwachstum

verursacht (Ross *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2005; Martineau *et al.*, 1987, 2002; Sørmo *et al.*, 2009). Weitere mögliche Effekte werden in Kapitel 3.8 vorgestellt. Die Auswirkungen einer PFOS-Belastung auf marine Säugertiere sind bisher noch nicht weitreichend untersucht. Daten aus Experimenten an Labortieren zeigen jedoch, dass PFOS endokrine Signalwege stört (Austin *et al.*, 2003), zu einer Peroxisomen Proliferation führt (Berthiaume und Wallace, 2002; Martin *et al.*, 2007) und immunsuppressiv wirkt (Fang *et al.*, 2008; Keil *et al.*, 2008; Peden-Adams *et al.*, 2008) (s. Kapitel 3.8). Ein weiterer Grund für die Auswahl von PCB für die Inkubationsexperimente ist die Tatsache, dass für PCB der Toxizitätsmechanismus aufgeklärt ist (Poland *et al.*, 1976; Bandiera *et al.*, 1982; Safe, 2001) (s. Kapitel 3.9). Mit Hilfe der PCB-Inkubationsexperimente kann überprüft werden, ob die erwarteten Veränderungen im Proteinexpressionsmuster auftreten (z. B. erhöhtes Expressionslevel von CYP1A1). Hierdurch ließe sich die Funktionsweise des Zellkulturmodells überprüfen. Die Schadstoffe wurden in den Inkubationsexperimenten in umweltrelevanten Konzentrationen eingesetzt (s. Kapitel 3.9 und 5.10). Die Schadstoffzugabe erfolgte an Tag 2 der Kultivierung, um den Zellen eine ausreichende Akklimatisierung an die Kulturbedingungen zu erlauben (Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983; Corlu *et al.*, 1991; Maurel, 1996) (s. Kapitel 3.9) und wurde für 24 h durchgeführt. Alle Experimente wurden in dreifachem Ansatz durchgeführt (Ablauf der Inkubationsexperimente s. Abbildung 3-8).

Nach Abschluss der Inkubationsexperimente erfolgte die Proteinextraktion (s. Kapitel 3.10). Bei der Etablierung der Proteinextraktion war es von entscheidender Bedeutung, dass die extrahierten Proteine in einem Medium vorliegen, welches direkt in der 2D-Gelelektrophorese eingesetzt werden kann und mit ihr kompatibel ist (s. Kapitel 3.10). Die Arbeiten auf Proteomebene werden in weiterführenden Studien von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe (Analyse schadstoff-induzierter Proteinexpression, Helmholtz-Zentrum Geesthacht) durchgeführt. Zusätzlich zu den Proteomanalysen werden Untersuchungen auf genetischer Ebene durchgeführt. Mit Hilfe der mRNA Expression sollen schadstoffinduzierte Veränderungen in der Genexpression detektiert werden, um so weitere Informationen zu den Auswirkungen eines Schadstoffeinflusses zu erlangen.

Die Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung des Schadstoffeinflusses auf Seehunde in der Nordsee liefert einen wichtigen Beitrag zum TMAP. Neu identifizierte potentielle Biomarker könnten im Rahmen des Lebendmonitorings eingesetzt werden und würden somit ein weiteres Hilfsmittel zur Beurteilung des Gesundheitszustandes darstellen. Mit Hilfe von Biomarkern können Beeinträchtigungen einzelner Individuen erfasst werden und eine mögliche Schädigung der Population oder des Ökosystems vorausgesagt werden. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Zellkulturmodell soll die Identifizierung neuer Biomarker ermöglichen.

2 Stand der Forschung

Zunächst wird zusammenfassend dargestellt, welche Zellkulturmodelle bisher bei marinen Säugern etabliert sind und welche Biomarker zum Einsatz kommen. Anschließend wird exemplarisch ein kleiner Teil der Arbeiten vorgestellt, welche an Zellen aus marinen Säugern durchgeführt werden. Die Zusammenstellung soll vor allem einen guten Überblick über die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten geben und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Des Weiteren wird der Stand der Technik hinsichtlich der Isolierungsmethode der Leberbiopsie Perfusion dargelegt.

Zellkulturmodelle werden u. a. zur Beurteilung der Effekte von Pharmazeutika und Schadstoffen eingesetzt. Wird in diesem Zusammenhang der Fremdstoffmetabolismus untersucht, kommen vorrangig primäre Hepatozyten in den Zellkulturmodellen zum Einsatz. Für marine Säugetiere sind einige Zellkulturmodelle in der Literatur beschrieben (Garrick *et al.*, 2006; Fossi *et al.*, 2008; Mollenhauer *et al.*, 2009) (s. auch Tabelle 2-1). Bislang wurde allerdings erst ein Zellkulturmodell vorgestellt, welches dazu dient mit Hilfe von Proteomanalysen Biomarker zu identifizieren. Brenez *et al.* (2004) entwickelten ein Zellkulturmodell, welches auf der Inkubation von Lymphozyten aus dem Seehund mit polychlorierten Dibenzodioxinen (PCDD) beruht. Die Schadstoffinkubation verursachte eine Veränderung im Proteinexpressionsmuster und wurde mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. Allerdings liegen bisher nur Ergebnisse aus Vergleichsexperimenten mit Lymphozyten aus dem Rind vor (Brenez *et al.*, 2004). Daten aus den Experimenten an Lymphozyten aus dem Seehund wurden bisher nicht veröffentlicht.

Untersuchungen an Zellen aus marinen Säugetieren werden bevorzugt an leicht zugänglichem Material wie z. B. Blut- oder Hautzellen durchgeführt. Nur in wenigen Arbeitsgruppen erfolgen Studien an Zellen, die aus inneren Organen isoliert werden. Anhand der Zellen aus marinen Säugetieren wird insbesondere der Einfluss von organischen Schadstoffen, Metallen und Viren auf die Tiere untersucht. In der folgenden Tabelle (s. Tabelle 2-1) wird ein exemplarischer Überblick über die Arbeiten aus den verschiedenen Gebieten gegeben.

Tabelle 2-1: Exemplarische Übersicht über die bereits durchgeführten Arbeiten an Zellen aus marinen Säugetieren

| Autor | Jahr | Titel | Zelltyp |
|--------------------------------|------|---|---|
| Frouin, H. et al. | 2010 | Effects of individual polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners on harbour seal immune cells <i>in vitro</i> | Granulozyten |
| Chen, T.L. et al. | 2009 | Particulate Hexavalent Chromium is Cytotoxic and Genotoxic to the North Atlantic Right Whale (<i>Eubalaena glacialis</i>) Lung and Skin Fibroblasts | Lungen- und Haut-Fibroblasten |
| Wise, S.S. et al. | 2009 | Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to Steller sea lion lung cells | Lungen-Fibroblasten |
| Das, K. et al. | 2008 | Mercury immune toxicity in harbour seals: links to <i>in vitro</i> toxicity | Lymphozyten |
| Fossi, M.C. et al., | 2008 | First detection of Cyp1A1 and Cyp2B induction in Mediterranean cetacean skin biopsies and cultured fibroblasts by Western blot analysis | Haut-Fibroblasten |
| Godard, A.C. et al. | 2006 | Benzo[a]pyrene cytotoxicity in right whale (<i>Eubalaena glacialis</i>) skin, testis and lung cell lines | Haut-, Hoden und Lungen-Fibroblasten |
| Kakuschke, A. et al. | 2005 | Immunological impact of metals in harbor seals (<i>Phoca vitulina</i>) of the North Sea | Lymphozyten |
| Lalancette, A.Y. et al. | 2003 | Contrasting changes of sensitivity by lymphocytes and neutrophils to mercury in developing grey seals | Granulo-, Lympho- und Monzyten |
| Lu, Y.N. et al. | 2003 | Viral susceptibility of newly established cell lines from the Hawaiian monk seal <i>Monachus schauinslandi</i> | Epithelzellen und Fibroblasten aus diversen Organen |
| Sweat, J.M. et al. | 2003 | <i>In vitro</i> development and characterization of a manatee bronchial cell line | Lungen-Epithelzellen |
| Carvan, M.J. et al. | 1995 | Effects of benzo(a)pyren and tetrachlorodibenzo(p) dioxin on fetal dolphin kidney cells: Inhibition of proliferation and initiation of DNA damage | Nieren-Epithelzellen |

Der Abbau von Schadstoffen erfolgt größtenteils in der Leber. Um die Auswirkungen eines Schadstoffeinflusses auf marine Säuger bestmöglich analysieren zu können, wäre es von größtem Interesse die Effekte direkt an den Hepatozyten untersuchen zu können. Jedoch wurde bislang keine Isolierung primärer Hepatozyten aus marinen Säugetieren publiziert. In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen Hepatozyten aus Seehunden zu isolieren und zu kultivieren. Dies ermöglicht zum ersten Mal eine Untersuchung des Schadstoff-Einflusses auf Seehunde direkt am Zielorgan (Leber).

Die Mehrzahl der Biomarker für marine Säugetiere, die eine Belastung mit PCBs anzeigen, beruht auf dem Nachweis von den Cytochrom P450 Enzymen Cyp1A1 und Cyp2B (Troisi und Mason, 1997; Nyman *et al.*, 2003; Angell *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2005; Assunção *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007; Fossi *et al.*, 2008). Der Nachweis erfolgt hierbei in Biopsien aus Haut- oder Fettgewebe, in Plasma- oder in Leberproben. Eine Belastung mit PCBs führt zu einer vermehrten Induktion von Cyp1A1 und Cyp2B. Allerdings muss die Verwendung von Cytochrom P450 Enzymen als Biomarker kritisch betrachtet werden, da viele Faktoren die Höhe Cytochrom P450 Expression beeinflussen können. Die Höhe der Enzym-Expression in Haut- und Fettproben ist u. a. abhängig von der Probennahme. Montie *et al.* (2008) stellten beispielsweise bei der Untersuchung von Fettproben aus dem Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*) fest, dass die Expression des Enzyms Cytochrom P450 1A1 (Cyp1A1) in tiefer liegenden Fettschichten zunimmt. Diese Beobachtung konnten auch Wilson *et al.* (2007) bei der Analyse von Hautproben aus dem Großen Tümmler machen. Assunção *et al.* (2007) postulieren, dass auch die Herkunft der Probe (Körperregion, z. B. Rücken oder Flipper) einen Einfluss auf die Expression haben könnte. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Alter, Geschlecht, Reproduktions- und Ernährungsstatus die Höhe der Enzym-Expression beeinflussen können (Angell *et al.*, 2004; Montie *et al.*, 2008). Aus diesen Gründen ist es notwendig weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet durchzuführen, um die Eignung der Cytochrom P450 Enzyme als Biomarker zu verifizieren.

Mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Zellkulturmodell sollen weitere artspezifische Biomarker identifiziert werden, die ergänzend zu bereits etablierten Biomarkern eingesetzt werden können. Um die Auswirkungen des Schadstoff-

einflusses möglichst umfassend beurteilen zu können ist es sinnvoll, ein Set von verschiedenen Biomarkern zur Verfügung zu haben. Des Weiteren ist es notwendig artspezifische Biomarker einzusetzen, da die Auswirkungen einer Schadstoffbelastung bei verschiedenen Arten variieren können (Nyman *et al.*, 2003; Hammond *et al.*, 2005).

In der Regel werden für Zellkulturmodelle, die für pharmakologische und toxikologische Studien verwendet werden, Hepatozyten aus Ratte, Schwein oder Mensch eingesetzt. Zur Isolierung der Rattenhepatozyten kommt üblicherweise die von Seglen (1976) entwickelte zweistufige Collagenase-Perfusion zum Einsatz, diese wird *in vivo* durchgeführt (Chimenti *et al.*, 2007; Beigel *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008). Zur Isolierung porciner und humaner Hepatozyten wird häufig eine Leberbiopsie Perfusion verwendet (Clement *et al.*, 2001; Fröhlich *et al.*, 2005; Terry *et al.*, 2005; Sjögren *et al.*, 2010). Dabei wird statt der gesamten Leber nur ein Stück Lebergewebe verwendet. Die Methode wurde von Reese und Byard (1981) eingeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode erstmals zur Isolierung primärer Seehund-Hepatozyten eingesetzt. Nach erfolgreicher Etablierung der Leberbiopsie Perfusion für Seehund- und Schweine-Hepatozyten wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Diplomarbeit zur Untersuchung der Hepatozyten-Vitalität nach *in vitro* Inkubation mit PCBs und PFOS angefertigt (Korff, 2010). Diese beiden Arbeiten legen in der Arbeitsgruppe den Grundstein für die Entwicklung artspezifischer Biomarker für den Seehund.

3 Entwicklung des Zellkulturmodells

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Zellkulturmodell zu entwickeln auf dessen Grundlage die Identifizierung artspezifischer Biomarker für den Seehund erfolgen kann. Die Biomarker sollen anschließend im Rahmen eines Lebendmonitorings zum Einsatz kommen. Bei der Ausarbeitung des Zellkulturmodells mussten verschiedene Fragestellungen geklärt werden. Zunächst musste geklärt werden, welches Tier als Untersuchungsobjekt dienen soll und welches Organ am besten zur Fragestellung passt, damit so die Zielsetzung am besten erfüllt werden kann.

Der Seehund wurde als Studienobjekt gewählt, da er aufgrund seiner Position im Nahrungsnetz und seiner langen Lebensspanne persistente Schadstoffe akkumuliert. Dies ermöglicht die Verwendung von Seehunden als Indikatororganismus für den Zustand des Ökosystems Wattenmeer (s. Kapitel 1). Bedingt durch seine Lebensweise (Nutzung von Stränden und Sandbänken als Lebensraum), kann er im Lebendmonitoring eingesetzt werden. Mit Hilfe des Zellkulturmodells sollen Aussagen zum Fremdstoffmetabolismus von Schadstoffen getroffen werden. Da der größte Teil des Schadstoffabbaus in der Leber stattfindet ist sie, im Hinblick auf unsere Fragestellung, das Organ der Wahl. Hepatozyten sind maßgeblich am Abbau von Schadstoffen beteiligt und sind damit der am besten geeignete Zelltyp für das Zellkulturmodell. Um die *in vivo* Situation möglichst gut widerspiegeln zu können, werden keine permanenten Zelllinien, sondern primäre Hepatozyten verwendet. In diesem Kapitel wird deswegen genauer auf die Unterschiede zwischen Zelllinien und primären Hepatozyten eingegangen und die Verwendungsmöglichkeiten dargestellt. Bei der Metabolisierung von Fremdstoffen bestehen artspezifische Unterschiede (s. Kapitel 3.2.1). Deshalb ist es unerlässlich, dass für das Zellkulturmodell Hepatozyten aus dem Seehund eingesetzt werden. Eine Isolierung primärer Seehund-Hepatozyten wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben, weshalb in der vorliegenden Arbeit verschiedene Isolierungsmethoden evaluiert wurden, die in diesem Kapitel vorgestellt werden (s. Kapitel 3.3). Damit das Zellkulturmodell erfolgreich angewendet werden kann ist es entscheidend, dass die Hepatozyten vital sind. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene Vitalitätstests etabliert, deren Funktionsweise in diesem Kapitel erläutert wird (s. Kapitel 3.7). Des Weiteren wird

die Wahl der Schadstoffe begründet und auf die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen für die Inkubationsexperimente eingegangen (s. Kapitel 3.8). Zur Etablierung der einzelnen Arbeitsschritte wurden zusätzliche Versuche mit primären Schweine-Hepatozyten und der humanen Zelllinie HepG2 durchgeführt.

Eine übergreifende Darstellung des Zellkulturmodells wird am Ende des Kapitels gegeben. Zunächst werden in den folgenden Abschnitten die Hintergründe der verschiedenen Themenkomplexe (z. B. Zellkultur, Isolierungsmethoden etc.) vorgestellt. Anschließend wird das jeweilige Thema mit dem Zellkulturmodell in Beziehung gesetzt.

Im kommenden Kapitel wird näher auf die Biologie der Seehunde und Ihre Bestandsentwicklung im Wattenmeer eingegangen.

3.1 Der Seehund (*Phoca vitulina*)

Der Seehund wird in der Ordnung der *Carnivora* (Raubtiere) der Unterordnung *Pinnipedia* (Flossenfüßler) zugeordnet. Innerhalb der Überfamilie *Phocoidea* gehört er zur Familie *Phocidae* (Hundsrobben), zur Unterfamilie *Phocinae* und zu der Gattung *Phoca*. Die Gattung *Phoca* umfasst sieben Arten: *Phoca caspica*, *Phoca fasciata*, *Phoca groenlandica*, *Phoca hispida*, *Phoca largha*, *Phoca sibirica*, *Phoca vitulina* (King, 1983).



Abbildung 3-1: Juvenile Seehunde in der Seehundstation Friedrichskoog e. V.

Männchen und Weibchen der Seehunde (*Phoca vitulina*) unterscheiden sich im Gegensatz zu anderen Robbenarten in Größe und Gewicht nur geringfügig voneinander. Die Männchen erreichen eine Körperlänge von 150-180 cm und ein Gewicht von 50-130 kg. Weibliche Seehunde bleiben mit 120-150 cm Körperlänge und 45-105 kg Gewicht etwas kleiner als die Männchen. Die Jungtiere sind bei der Geburt zwischen 70-90 cm lang und wiegen 9-11 kg. Seehunde werden mit 2-3 Jahren (Weibchen) bzw. mit 3-4 Jahren (Männchen) geschlechtsreif. Die Jungtiere werden nach einer Tragzeit von 11-12 Monaten zwischen Mai und Juli geboren und etwa 3-5 Wochen gesäugt. Die Lebenserwartung von Seehunden beträgt etwa 40 Jahre (de Jong *et al.*, 1997). Seit 1960 wird der Bestand der Seehunde im Wattenmeer regelmäßig durch Flugzählungen ermittelt (Reijnders *et al.*, 1997). Vom Beginn der Bestandsermittlung bis zum Verbot der Seehundjagd im gesamten Wattenmeer (1976), nahm die Populationsgröße kontinuierlich ab. Erst seit Ende der 1970er Jahre vergrößerte sich der Bestand wieder kontinuierlich und erreichte 1988 ein Maximum (s. Abbildung 3-2). In dem Jahr trat die erste Seehundstaupeepidemie (*Phocine Distemper Virus*, PDV) auf und reduzierte den Bestand um ca. 50% (Dietz *et al.*, 1989). Im darauf folgenden Jahr war eine hohe Geburtenrate festzustellen und die Population wuchs bis zum Auftreten einer neuen PDV-Epidemie 2002 auf 20975 Tiere im gesamten Wattenmeer an (Abt *et al.*, 2002). Es kam zu einem erneuten Einbruch der Bestandszahlen, die seitdem wieder gleichmäßig ansteigen. 2009 konnten 21.571 Tiere (6.880 in Schleswig-Holstein, 25,3% der Tiere sind Jungtiere) gezählt werden (CWSS, 2009a).

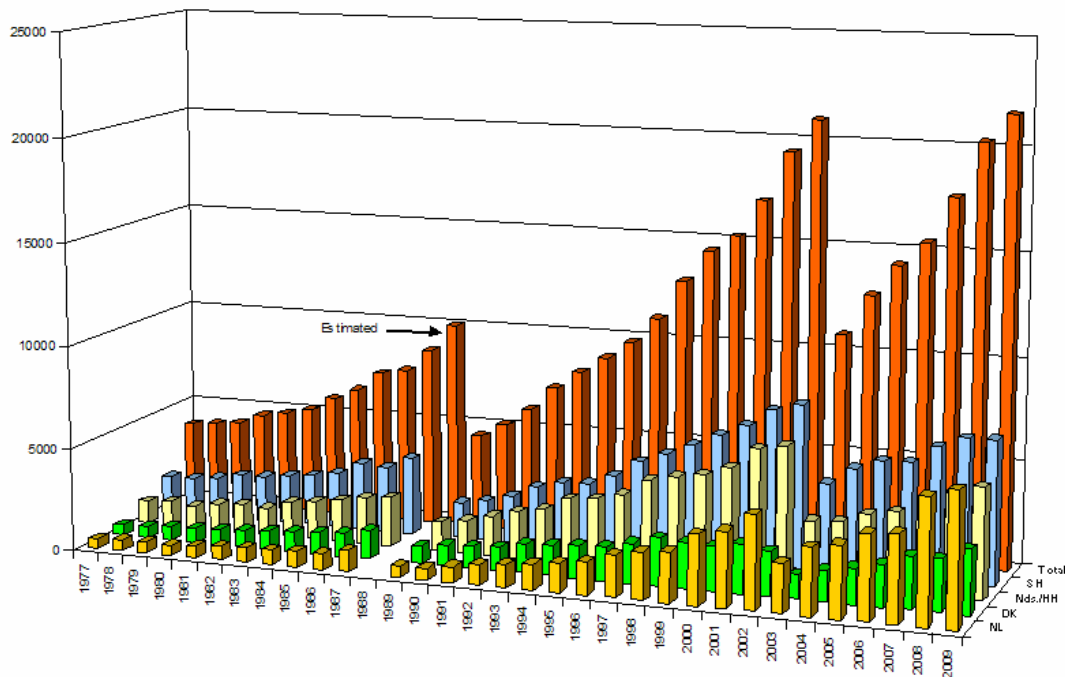


Abbildung 3-2: Seehundpopulation im Wattenmeer 1975-2009 (CWSS, 2009a); Die Farben kennzeichnen die verschiedenen Seehundpopulationen. Gelb: Niederlande; grün: Dänemark; weiß: Niedersachsen und Hamburg; blau: Schleswig-Holstein; rot: Gesamtbestand

Bedingt durch natürliche Ursachen (z. B. stürmisches Wetter) oder anthropogene Einflüsse (z. B. Störung durch Touristen) kann es zu einer Trennung von Mutter und Jungtier kommen. Wenn die Tiere dauerhaft den Kontakt zur Mutter verloren haben, werden sie als Heuler bezeichnet. In Schleswig-Holstein gibt es eine autorisierte Aufzuchtstation (Seehundstation Friedrichskoog), die einen Teil der Heuler aufnimmt. Aufgenommen werden nur Tiere, die als überlebensfähig eingestuft werden. Die Heuler werden tierärztlich versorgt und können in der Regel nach 2-3 Monaten, wenn sie ein Mindestgewicht von 25 kg erreicht haben, wieder in der Nordsee ausgewildert werden (T. Rosenberger, Leiterin der Seehundstation, mündliche Mitteilung).

3.2 Zellkultur

In der Zellkultur unterscheidet man zwischen primären, auch finite Kulturen genannt, und permanenten Kulturen. Als primäre Zellen bezeichnet man solche Zellen, die direkt aus Organen oder Gewebe isoliert wurden und eine begrenzte Lebensdauer haben (Freshney, 2005). Sie spiegeln am besten den Ausgangszustand des

Gewebes wider, aus dem die Zellen isoliert wurden. Für folgende Anwendungen ist es unerlässlich, dass die Zellen möglichst ihren *in vivo* Zustand auch nach der Isolierung beibehalten: für Studien des Zell- und Proteinstoffwechsels, der Metabolisierung von Fremdstoffen oder der Zellmorphologie (Schmitz, 2009). Besonders auf dem Gebiet des Fremdstoffmetabolismus kann die Verwendung von Zellkulturen die Anzahl der Tierversuche verringern (Freshney, 2005; Lindl und Gstrunthaler, 2008).

Permanente Zellen (Zelllinien) bieten den Vorteil, dass sie unter geeigneten Bedingungen unbegrenzt kultiviert werden können. Zelllinien können entweder aus Tumoren isoliert werden, sie weisen dann bereits eine Transformation auf, oder sie werden mittels molekulargenetischer Methoden transfiziert. Es gibt Zelllinien, die schon vor Jahrzehnten etabliert wurden und seitdem kultiviert werden. Ein Beispiel stellt die häufig verwendete Zelllinie HepG2 dar, die in der vorliegenden Arbeit für Vergleichs-Experimente und zur Methodenetablierung eingesetzt wurde. Sie wurde 1975 aus einem humanen Lebertumor etabliert (Aden *et al.*, 1979). Durch den vergleichsweise langen Kultivierungszeitraum haben sich die Zellen der permanenten Zelllinien in den meisten Fällen verändert und reagieren teilweise anders als im *in vivo* Zustand. So sind in vielen Zelllinien u. a. Chromosomenaberrationen oder Aneuploidien (Veränderungen in Struktur oder Anzahl der Chromosomen) vorhanden (Schmitz, 2009). Deswegen sind sie nur bedingt für Experimente geeignet in denen Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation gezogen werden sollen.

Eine unterschiedliche Reaktion von HepG2-Zellen und primären Hepatozyten sowie artspezifische Unterschiede konnten beispielsweise Silkworth *et al.* (2005) beobachten. Sie untersuchten den Einfluss von TCDD, PCB 126 und Aroclor 1254 auf HepG2-Zellen und primäre Hepatozyten aus Menschen, Ratten und Affen. Silkworth *et al.* (2005) stellten hierbei fest, dass die humanen Zellen (primäre Hepatozyten und HepG2-Zellen) wesentlich weniger empfindlich (Faktor 10-1000) auf eine Schadstoffinkubation reagierten als die übrigen Zellen. Die HepG2-Zellen zeigten sich von den humanen Zellen am wenigsten sensibel gegenüber der Schadstoffinkubation.

Es gibt eine weitere Möglichkeit, unsterbliche Zellen zu erhalten, bei der weitgehend die *in vivo* Eigenschaften beibehalten werden. Hierbei handelt es sich um so genannte *Infinity*-Zelllinien. Diese erlangen ihre Unsterblichkeit durch eine Transfektion mit dem katalytisch aktiven Teil der Telomerase h-TERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*). Sie weisen im Gegensatz zu den „normal“ transfizierten Zellen keine Chromosomenveränderungen auf und zeigen auch nach 150 Populationsverdopplungen keine Alterungserscheinungen. Ihre Kontakthemmung wird ebenso beibehalten wie ihre typische Morphologie (Schmitz, 2009).

Da mit Hilfe des Zellkulturmodells Proteomanalysen durchgeführt werden sollen ist es unerlässlich, dass die Zellen den *in vivo* Zustand bestmöglich widerspiegeln. Aus diesem Grund werden für das Zellkulturmodell primäre Hepatozyten und keine Zelllinien verwendet.

3.2.1 Primäre Hepatozyten

Die Leber ist entscheidend an Biotransformationsprozessen beteiligt und ist in der Regel das Ziel- und Abbauorgan chemischer Giftstoffe. Mit Hilfe primärer Hepatozyten lassen sich entsprechende *in vivo* Reaktionen gut widerspiegeln (Andersson *et al.*, 2001; Battle und Stacey, 2001; Ponsoda *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2002). Aus diesem Grund eignen sie sich besonders gut für Untersuchungen zum Schadstoffmetabolismus und für toxikologische Studien (Guillouzo *et al.*, 1993; Nussler *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2004). Primäre Hepatozyten finden eine breite Anwendung in der Forschung und werden vor allem für die Untersuchung und Entwicklung neuer Pharmazeutika, vorrangig im humanen Bereich, eingesetzt. Sie werden zur Bestimmung von zytotoxischen und hepatotoxischen Eigenschaften potentieller Wirkstoffe verwendet (Gómez-Lechón *et al.*, 2003; Kemp *et al.*, 2004; Bhandari *et al.*, 2008) und können für Interaktions- und Induktionsstudien eingesetzt werden (Li, 1998; Hewitt *et al.*, 2006). In den Interaktionsstudien kann z. B. untersucht werden, ob bei der gleichzeitigen Anwendung verschiedener Medikamente Wechselwirkungen auftreten. Mit Hilfe von Induktionsstudien kann ermittelt werden, in welchem Maße Medikamente z. B. eine vermehrte Bildung von Enzymen verursachen, die am Arzneistoff-Metabolismus beteiligt sind. Ein Anstieg

der Synthese dieser Enzyme führt zu einem schnelleren Abbau der Medikamente bis hin zum Verlust der therapeutischen Wirkung. Die Induktion kann auch zu einer gesteigerten Bildung von toxischen oder carcinogenen Metaboliten führen (Hewitt *et al.*, 2006).

Primäre Hepatozyten kommen nicht nur in der medizinischen Forschung zum Einsatz, sie werden auch in Studien zur Beurteilung von Umweltgiften, im Effektmonitoring und zur Etablierung von Biomarkern verwendet (Pesonen *et al.*, 1997). Viele Chemikalien stören beispielsweise endokrine Signalwege (*endocrine disruptors*) und üben damit einen erheblichen Einfluss auf die Organismen aus (z. B. Beeinträchtigung der Reproduktion) (Navas und Segner, 2006). Diese Effekte wurden z. B. von Braathen *et al.* (2008) anhand von primären Hepatozyten aus dem Atlantischen Lachs (*Salmon salar*) untersucht. Die Hepatozyten wurden mit hydroxylierten PCB-Metaboliten inkubiert. Die untersuchten Gene und Proteine (u. a. Östrogen-Rezeptoren) zeigten eine konzentrationsabhängige Änderung auf Ebene der mRNA-Transkription. Letcher *et al.* (2002) führten eine Studie an primären Hepatozyten aus dem Karpfen (*Cyprinus carpio*) durch und inkubierten diese mit Methylsulfon-Metaboliten von PCBs. In der Studie konnte eine antiöstrogene Wirkung der Substanzen nachgewiesen werden. Liu *et al.* (2007) evaluierten anhand von primären Hepatozyten aus dem Nil-Tilapia (*Oreochromis niloticus*) den Einfluss von PFCs auf die Vitalität der Zellen. Sie stellten eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Vitalität fest. Die Inkubation mit PFOA und PFOS führte in den Zellen zu oxidativem Stress, DNA-Fragmentierung und Apoptose.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten aus verschiedenen Tierarten unterschiedlich auf eine Inkubation mit Xenobiotika reagieren. Dickens *et al.* (2008) untersuchten den Einfluss eines Krebsmedikamentes (cis-4-Hydroxy-L-Prolin) auf humane Hepatozyten und verglichen die Ergebnisse mit denen aus Tierexperimenten an Ratten und aus der Klinischen Phase II an Menschen (kontrollierter Einsatz neuer Medikamente an Patienten). Die Ergebnisse aus den humanen Hepatozyten korrelierten mit denen aus der klinischen Studie an Menschen, aber nicht mit denen aus den Tierexperimenten. Bei den humanen Hepatozyten und in der Klinischen Studie wurden keine toxischen Effekte detektiert, wohingegen bei den Rattenexperimenten toxische Effekte zu beobachten waren. Die Studie

verdeutlicht, dass es notwendig ist artspezifische Unterschiede zu berücksichtigen. Ergebnisse aus Tierexperimenten können nicht pauschal auf eine andere Tierart oder den Menschen übertragen werden (Jover *et al.*, 1992; Silkworth *et al.*, 2005; Dickens *et al.* 2008). Artspezifische Abweichungen werden u. a. durch Unterschiede in den Metabolismuswege oder der Enzymausstattung hervorgerufen (Smith, 2000). Jones *et al.* (2000) fanden beispielsweise artspezifische Sequenz-Unterschiede in einem Rezeptor (*pregnane X receptor*), der eine Schlüsselrolle beim Fremdstoffmetabolismus einnimmt. Des Weiteren unterliegen die Enzyme des Cytochrom P450-Enzymkomplexes, über die ein Großteil des Schadstoffabbaus erfolgt, häufig phänotypischen und genotypischen Veränderungen (Ingelman-Sundberg, 2005). Dadurch werden individuelle oder artspezifische Reaktionen hervorgerufen. Darüber hinaus konnten artspezifische Unterschiede in der Induktion der Enzyme nachgewiesen werden (LeCluyse, 2001; Gibson *et al.*, 2002; Vignati *et al.*, 2004; Graham und Lake, 2008).

Aus diesen Gründen ist es unerlässlich, zur Erforschung des Schadstoffeinflusses auf Seehunde Seehund-Hepatozyten für das Zellkulturmodell zu verwenden. Zu diesem Schluss kommt auch Korff (2010), die in unserer Arbeitsgruppe Seehund- und Schweine-Hepatozyten mit PCB bzw. PFOS inkubierte und den Schadstoffeinfluss anhand von Vitalitätstests analysierte. Auf eine Inkubation mit PCB und PFOS reagierten die Seehund-Hepatozyten z. B. mit einer verringerten Harnstoffproduktion, wohingegen die Schweine-Hepatozyten verstärkt Harnstoff bildeten.

Trotz der guten Übertragbarkeit der *in vitro* Reaktion von primären Zellen auf die *in vivo* Situation muss beachtet werden, dass es sich um ein Model handelt. In der Zellkultur lassen sich die *in vivo* Gegebenheiten nicht exakt nachahmen. Dies betrifft besonders die dreidimensionale Struktur der Organe und den damit verbundenen Zell-Zellkontakt sowie die Versorgung mit spezifischen Hormonen (Freshney, 2005). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Kultivierungsparameter (z. B. Wahl des Mediums) untersucht (s. Kapitel 3.4), um optimale Bedingungen für die Hepatozyten-Kultur zu ermöglichen und zugleich eine Kompatibilität mit der Proteomanalyse zu gewährleisten.

3.2.2 HepG2-Zellen

Die humane Zelllinie HepG2 wurde 1975 von Aden und Kollegen aus dem Lebertumor eines Kindes etabliert (Aden *et al.*, 1979). Die Zellen haben trotz ihrer langen Kultivierungsdauer viele Funktionen beibehalten, die für primäre humane Hepatozyten charakteristisch sind. Sie sezernieren u. a. Plasmaproteine wie z. B. Albumin, Fibrinogen, α -Fetoprotein und Apolipoproteine (Knowles *et al.*, 1980) und sind in der Lage, bei ausreichend hoher Glucosemenge im Medium Glykogen und Collagen I, III und IV zu produzieren (Bouma *et al.*, 1989). Hinsichtlich der Expression verschiedener Enzyme, die am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind, unterscheiden sich HepG2-Zellen zum Teil jedoch deutlich von primären Hepatozyten (Pascussi *et al.*, 2001; Gerbal-Chaloin *et al.*, 2006). HepG2-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit als Vergleichszellen zu den primären See- und Schweine-Hepatozyten verwendet und zur Methodenetablierung eingesetzt. Aufgrund genereller Unterschiede zwischen permanenten Zelllinien und primären Hepatozyten (s. o.) sowie artspezifischer Unterschiede lassen sich die Reaktionen allerdings nicht direkt vergleichen.

3.3 Isolierung primärer Hepatozyten

Im folgenden Kapitel wird ein kurzer Überblick über die Isolierung von Hepatozyten gegeben und die in der Arbeit angewendeten Isolierungsmethoden vorgestellt.

Zwischen 1940 und 1965 wurden vermehrt Versuche zur Hepatozyten Isolierung unternommen (Berry *et al.*, 1997). Hierzu wurden Leberdünnschnitte aus Rattenleber verwendet, die in einem calciumfreien Medium inkubiert wurden, jedoch war der Großteil der isolierten Hepatozyten stark geschädigt, was einen Verlust des Großteils der intrazellulären Enzyme zur Folge hatte. Erst 1967 gelang es Howard und seiner Arbeitsgruppe, vitale Hepatozyten aus Rattenleber zu isolieren (Howard *et al.*, 1967), indem sie die Leber mit einer Enzymlösung aus Collagenase und Hyaluronidase außerhalb des Körpers entbluteten. Das Lebergewebe wurde anschließend in kleine Stücke geschnitten und in der Enzymlösung unter Schütteln 60 min inkubiert. Die

erhaltenen Zellen waren zu 75% vital. Die Ausbeute betrug jedoch nur 5% der in der Leber enthaltenen Hepatozyten.

Eine Verbesserung der Methode wurde 1969 von Berry und Friend eingeführt. Sie verwendeten keine Leberdünnschnitte, sondern vollzogen an der kompletten Rattenleber *in vivo* eine einstufige Collagenase-Perfusion (Berry und Friend, 1969). Mit Verwendung dieser Methode konnte die Zellausbeute versechsfacht werden. In einigen Fällen konnten 50% der in der Leber vorhandenen Hepatozyten isoliert werden.

Eine Weiterentwicklung der Methode erfolgte 1976 von Seglen (Seglen, 1976). Er führte die bis heute verwendete zweistufige Collagenase-Perfusion ein. Hierbei wird der Tatsache Rechnung getragen, dass im ersten Schritt Calcium aus dem Gewebe entfernt werden muss, um den Zell-Zellkontakt irreversibel zu lösen. Da die Collagenase für ihre optimale Aktivität Calcium benötigt, wird die Leber in einem zweiten Schritt mit einem Calcium- und Collagenase-haltigen Puffer perfundiert (Seglen, 1972).

Da die Perfusion einer kompletten Leber in der Regel an narkotisierten Ratten und Mäusen direkt vor der Tötung vorgenommen wird, ist sie bei Schweinen eingeschränkt und beim Menschen gar nicht möglich. Um in diesen Fällen dennoch eine gute Ausbeute an vitalen Hepatozyten zu erhalten, wird die Perfusion an einem Stück der Leber *in vitro* durchgeführt und als Leberbiopsie Perfusion bezeichnet (Reese und Byard, 1981; Clement *et al.*, 2001, Bakala *et al.*, 2003). Die Leberbiopsie Perfusion wird in dieser Arbeit angewendet, um Hepatozyten aus Seehunden und Schweinen zu isolieren. Prinzipiell wäre es möglich, die gesamte Leber zur Isolierung zu verwenden, allerdings würden dabei erhebliche Mengen Puffer benötigt (ca. 30-40 Liter). Eine Verwendung der kompletten Seehundleber kommt jedoch auch deshalb nicht in Betracht, da alle Tiere pathologisch untersucht werden und dafür ebenfalls Leberproben zur Verfügung stehen müssen. Des Weiteren werden Leberproben zur Messung der Schadstoffbelastung benötigt.

Es gibt zahlreiche weitere Methoden, um Hepatozyten und andere Zellen zu isolieren, wobei man zwischen mechanischen und enzymatischen Methoden unterscheidet. Einige der hier vorgestellten Methoden, kamen bei der Etablierung des Zellkulturmodells zum Einsatz. Es sollte evaluiert werden, welche Methode sich am

besten zur Isolierung der primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten eignet. Als Kriterien wurden die Ausbeute und die Vitalität zu Grunde gelegt.

Eine weitere Methode ist das Anlegen einer Explantatkultur. Dies ist eine schonende, aber zeitintensive Methode, um Hepatozyten ohne Enzymbehandlung zu isolieren. Das Lebergewebe wird hierzu in sehr kleine Stücke (1 mm^3) geschnitten und in Petrischalen oder Gewebekulturflaschen ausgebracht. Die Stücke werden mit 1 ml Medium überschichtet und im Brutschrank kultiviert (Freshney, 2005). Aus dem Explantat wachsen nach mehrwöchiger Kultivierung die Zellen aus (Freshney, 2005). In der Regel werden zur Kultivierung von Hepatozyten keine Explantate, sondern Zellsuspensionen verwendet. Diese können durch mechanische Desintegration des Gewebes gewonnen werden. Das Lebergewebe wird dafür nacheinander sehr vorsichtig durch Metallsiebe mit unterschiedlich großer Maschenweite gedrückt (Kaltenbach, 1954; Freshney, 2005) und das erhaltene Filtrat in Medium aufgenommen. Die Zellsuspension kann anschließend in gewünschter Konzentration ausgesät werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Suspension einen hohen Anteil an geschädigten Zellen aufweist (Freshney, 2005).

Der Gewebeaufschluss kann enzymatisch auch ohne Perfusion erfolgen. Zur Isolierung von Hepatozyten wird meist das Enzym Collagenase verwendet (Berry *et al.*, 1997). Teilweise werden auch andere Enzyme wie z. B. Trypsin oder Pronase zur Isolierung verwendet. Sie führen zu einer schnelleren und vollständigen Zersetzung des Gewebes, verursachen aber eine höhere Zellschädigung (Freshney, 2005). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit für die Isolierung der Hepatozyten ausschließlich Collagenase eingesetzt. Dafür wird die Leber zunächst in möglichst kleine Stücke geschnitten (1 mm^3). Die Stücke werden in Zellkulturmedium aufgenommen, welches mit Collagenase versetzt ist. In der Literatur werden unterschiedlich lange Inkubationszeiten angegeben, die von 5 min bis 48 h reichen (Integra Biosciences, 2003; Freshney 2005; Spotorno *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedlich lange Inkubationszeiten getestet. Nach Abschluss der Desintegration wird die Zellsuspension filtriert, zentrifugiert und in gewünschter Konzentration ausgesät.

3.4 Kultivierung primärer Hepatozyten

Bei der Kultivierung der primären Hepatozyten ist es je nach Fragestellung wichtig, dass die *in vivo* Eigenschaften der Zellen möglichst gut konserviert werden. Vor allem die Zusammensetzung des Zellkulturmediums ist dabei ausschlaggebend (Skett, 1994; Dabos *et al.*, 2004). Es muss eine ausgewogene Zusammensetzung verschiedenster Komponenten vorliegen, um eine optimale Versorgung der Zellen zu gewährleisten. Besonders die Verfügbarkeit von Aminosäuren, Glucose und Vitaminen ist von entscheidender Bedeutung. Aminosäuren sind Ausgangsstoffe für die Proteinbiosynthese. Essentielle Aminosäuren können von den Zellen nicht synthetisiert werden und müssen deshalb dem Zellkulturmedium zugesetzt werden. Glucose ist die Hauptenergiequelle des zellulären Stoffwechsels in Säugetierzellen. Kommt es zu einer Glucose-Unterversorgung, hat dies einen erheblichen Einfluss auf den Zellstoffwechsel. Vitamine fungieren als Katalysatoren im Zellstoffwechsel und müssen ebenfalls dem Medium zugesetzt werden. Stoffwechselprodukte führen generell zu einer Versauerung des Zellkulturmediums. Um den pH-Wert konstant zu halten, wird das Medium mit Phosphaten und Hydrogencarbonaten gepuffert (z. B. NaH_2PO_4 , NaHCO_3) (Schmitz, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Zellkulturmedien hinsichtlich ihrer Eignung für das Zellkulturmodell untersucht. Zur Kultivierung der primären Seehund-Hepatozyten wurden die Medien Opti-MEM[®], Hepatozyme-SFM und Williams Medium E (WME) verwendet. Damit die primären Seehund-Hepatozyten im Zellkulturmodell eingesetzt werden können, müssen sie in serumfreiem Medium kultiviert werden (s. Kapitel 1). Das Medium Hepatozyme-SFM wurde für eine serumfreie Hepatozyten-Kultivierung entwickelt (Invitrogen, 2001). Opti-MEM[®] erlaubt nach Herstellerangaben eine Reduzierung des Serums um mindestens 50% (bezogen auf das Volumen). Bei dem dritten Medium handelt es sich um WME, welches mit speziellen Zusätzen angereichert wurde und ebenfalls für die serumfreie Kultivierung verwendet werden kann. Diese Rezeptur wurde bereits erfolgreich in pharmakologischen Studien mit primären Schweine-Hepatozyten eingesetzt (Clement *et al.*, 2001; Fröhlich, 2004; Wundt, 2008). In den Studien konnte u. a. nachgewiesen werden, dass die Hepatozyten ihre *in vivo* Eigenschaften, wie den Cytochrom P450-Metabolismus, beibehielten. Das Cytochrom P450-Enzymsystem

ist maßgeblich am Fremdstoffmetabolismus beteiligt (z. B. oxidativer Abbau von PCBs) und aus diesem Grund für das Zellkulturmodell von Bedeutung. Es ist somit wichtig, dass die Aktivität der Cytochrom P450-Enzyme während der Kultivierung aufrechterhalten wird.

Das WME wird mit folgenden Zusätzen versetzt: Glucagon, Prednisolon, Insulin, L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin und Fötale Kälberserum. (genaue Konzentrationsangaben s. Tabelle 8-4 und 8-5 im Anhang). Glucagon ist ein Peptidhormon, welches in Kombination mit Prednisolon (Glucocorticoid) und Insulin spezifische Stoffwechselfunktionen der Hepatozyten aufrechterhält (z. B. Albuminsynthese) (Dich *et al.*, 1988). Insulin verbessert zudem das Adhärenzverhalten der primären Hepatozyten am Substrat (Berry *et al.*, 1991). L-Glutamin ist eine essentielle Aminosäure für Hepatozyten und muss dem Zellkulturmedium zugesetzt werden (Lindl und Gstrunthaler, 2008). Des Weiteren wird Fötale Kälberserum (FCS) zugesetzt. Es wird aus dem Blut von Rinderföten zwischen dem 3. und 7. Trächtigkeitsmonat gewonnen (Lindl und Gstrunthaler, 2008). Bei dem Serum handelt es sich um ein komplexes Gemisch aus verschiedensten Proteinen, Hormonen und noch nicht näher charakterisierten Bestandteilen (Lindl und Gstrunthaler, 2008). Im Serum sind verschiedene Wachstumsfaktoren enthalten, die sich positiv auf die Kultivierung der Zellen auswirken. Allerdings gelangen beim Einsatz von FCS ebenfalls eine Vielzahl unbekannter Komponenten in die Kultur. Die in WME kultivierten See- und Schweine-Hepatozyten, erhielten lediglich während der ersten 24 h FCS. Anschließend wurde ein Mediumwechsel mit serumfreiem WME durchgeführt.

Um zu jedem Zeitpunkt eine optimale Nährstoffversorgung der Hepatozyten zu gewährleisten, ist ein regelmäßiger Mediumwechsel notwendig. Hierbei werden nicht nur neue Nährstoffe zugeführt, sondern zugleich tote Zellen und toxische Stoffwechselprodukte entfernt. Ist der Anteil an abgestorbenen Zellen in den Kulturen zu hoch, verschlechtern sich die Bedingungen für die vitalen Zellen (Freshney, 2005). Aus diesem Grund, wird bei den primären See- und Schweine-Hepatozyten alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Um eine Verkeimung der Kultur mit Bakterien zu verhindern, werden die Antibiotika Streptomycin und Penicillin eingesetzt.

Die kritische Phase bei der Etablierung einer Kultur aus primären Hepatozyten, ist die Anheftung der Zellen an das Substrat. Um das Adhären zu erleichtern, können primäre Hepatozyten z. B. in collagenbeschichtete Zellkulturgefäße ausgesät werden (Jauregui *et al.*, 1986). Eine Kultivierung der primären Hepatozyten auf collagenbeschichteten Gefäßen ermöglicht eine längere Kultivierungsdauer und führt zu einer besseren Erhaltung leberspezifischer Prozesse wie z. B. der Albuminsynthese (Michalopoulos und Pitot, 1975). Für die Kultivierung der primären See- und Schweine-Hepatozyten wurden in dieser Arbeit collagenbeschichtete Zellkulturflaschen und Mikrotiterplatten verwendet.

Die verwendete Zellzahl sollte in der vorliegenden Arbeit zum einen gut für die Kultivierung der Hepatozyten sein und zum anderen eine ausreichend hohe Proteinmenge für die 2D-Gelelektrophorese liefern. Für das Zellkulturmodell wurde eine Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm² ($3,8 \times 10^6$ pro Zellkulturflasche (25 cm²)) gewählt. Die eingesetzte Zellzahl ermöglicht eine gute Kultivierung der Zellen, wie andere Studien an primären Schweine-Hepatozyten zeigen (Koebe *et al.*, 1995, ($1,4 \times 10^5$ /cm²); Dabos *et al.*, 2004 ($1,5 \times 10^5$ /cm²), Fröhlich 2004 ($1,4 \times 10^5$ /cm²)). Zugleich erlaubt diese Zellzahl die Extraktion einer ausreichend hohen Proteinmenge (450 µg/Gel) für die 2D-Gelelektrophorese. Die Schweine-Hepatozyten wurden in zusätzlichen Experimenten mit einer Zellzahl von $1,6 \times 10^6$ Zellen/Zellkulturflasche ($6,4 \times 10^4$ Zellen/cm²) ausgesät. Diese geringere Zellzahl ermöglichte eine bessere mikroskopische Betrachtung der Zellen.

Die primären See- und Schweine-Hepatozyten wurden für insgesamt vier Tage kultiviert. Während der Kulturdauer wurde alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt und Aliquote des Mediums für die Zelltests abgenommen (s. Kapitel 4.5).

3.5 Optimierungsversuche zur Leberbiopsie Perfusion

Zur Erhöhung der Zellausbeute und Vitalität wurden Optimierungsversuche mit der Leberbiopsie Perfusion an Schweinelebern durchgeführt. Da einige Studien einen Zusammenhang zwischen der verwendeten Collagenase und der Zellvitalität herstellen (Bakala *et al.*, 2003), wurden im Rahmen der Doktorarbeit verschiedene Collagenasen getestet. Die Etablierung der Leberbiopsie Perfusion erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit der Collagenase CLS IV. Für die Optimierungsversuche

wurden die Collagenasen (NB4, NB8) eingesetzt, die laut Hersteller gut für die Isolierung von Hepatozyten geeignet sind. Bei den drei getesteten Collagenasen handelt es sich um Enzymgemische, die sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung unterscheiden.

Da die Transportdauer (Zeitspanne zwischen Leberentnahme und Beginn der Zellisolierung) der Schweineleber mit durchschnittlich 90 min relativ lang war, sollte getestet werden, ob sich Ausbeute und Vitalität der Hepatozyten durch den Transport in einer Konservierungslösung erhöhen lassen. Verwendet wurde hierfür die *University of Wisconsin* Lösung (UW-Lösung), die zum Transport von humanen Lebertransplantaten verwendet wird (Todo *et al.*, 1989). Die positive Wirkung auf die Vitalität der Hepatozyten wurde in zahlreichen Studien beschrieben (Southard und Belzer, 1995; Abdennebi *et al.*, 2002; Bakala *et al.*, 2003; Franco-Gou *et al.*, 2007). Statt der in der Original-Rezeptur eingesetzten Stärke (Viastarch) wird von einigen Autoren die Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) empfohlen, um die Viskosität der Lösung herabzusetzen und damit das Risiko einer Zellschädigung weiter zu verringern (Abdennebi *et al.*, 2002; Franco-Gou *et al.*, 2007, Teoh und Hartley, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund statt Stärke PEG verwendet (s. Kapitel 4.8).

3.6 Kultivierung der HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit zur Etablierung- und Optimierung der Vitalitätstests eingesetzt. Außerdem sollten sie dazu dienen, die Ergebnisse aus den Tests mit primären Hepatozyten besser einschätzen zu können. Die Zellen wurden wie die Seehund- und Schweine-Hepatozyten mit $1,6 \times 10^6$ und $3,8 \times 10^6$ Zellen/Zellkulturflasche ausgesät (Wachstumsfläche: 25 cm^2). Zur Kultivierung der HepG2-Zellen wurde RPMI Medium verwendet, welchem Antibiotika und FCS zugesetzt wurde. Das RPMI Medium wurde vom *cell culture service* (Bezugsquelle der HepG2-Zellen) für die Kultivierung der HepG2-Zellen empfohlen.

3.7 Vitalitätstests

Die Vitalität von Zellen kann mit Hilfe verschiedener Parameter ermittelt werden. Am häufigsten wird die Zellintegrität oder die allgemeine Stoffwechselaktivität bestimmt. Auch der ATP-Gehalt einer Zelle kann Aufschluss über die Vitalität geben.

Eine erste Einschätzung der Vitalität erlauben Tests, mit denen Aussagen zur Integrität der Zellmembran getroffen werden können (z. B. Trypanblau Ausschlusstest, LDH-Freisetzung s. Kapitel 3.7.1 und 3.7.4) (Schmitz, 2009). Diese Tests eignen sich zwar für eine erste Einschätzung der Vitalität, lassen aber keinen Rückschluss auf die Stoffwechselaktivität zu. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zellen eine intakte Zellmembran haben, der Stoffwechsel aber beeinträchtigt ist (Schmitz, 2009). Der XTT-Test erlaubt eine Analyse der allgemeinen Stoffwechselaktivität von Zellen und wird in der vorliegenden Arbeit hierzu verwendet (s. Kapitel 3.7.2). Da mit Hilfe des Zellkulturmodells Aussagen zum spezifischen Fremdstoffmetabolismus gemacht werden sollen, ist es für das Modell unerlässlich, dass die Zellen ihren spezifischen Stoffwechsel aufrecht erhalten. Zur Beurteilung des spezifischen Stoffwechsels stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Beispielsweise können Tests angewendet werden, bei denen direkt der Fremdstoffmetabolismus untersucht wird. Beim EROD- (Ethoxyresorufin-O-Deethylase) und PROD (Pentoxyresorufin-O-Deethylase)-Assay wird das Maß der Induktion des Cytochrom P450-Systems bzw. der davon abhängigen Monooxygenasen bestimmt. Diese Enzyme spielen eine entscheidende Rolle im Fremdstoffmetabolismus nahezu aller Organismen und haben daher auch für die Ökotoxikologie eine große Bedeutung (Fent, 2007). Trotz größter Bemühungen ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gelungen die beiden genannten Assays zu etablieren. Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der spezifischen Stoffwechselaktivität bieten Tests, die die Synthese charakteristischer Stoffe untersuchen. Für Hepatozyten ist die Produktion von Albumin und Harnstoff spezifisch (Dabos *et al.*, 2004; Hamel *et al.*, 2006) (s. Kapitel 3.7.3).

Im folgenden Kapitel werden die in der Arbeit verwendeten Vitalitätstests (XTT-, Harnstoff- und LDH-Test) beschrieben. Mit Hilfe der Vitalitätstests sollte zum einen ermittelt werden, ob die isolierten Zellen vital sind und zum anderen untersucht werden, ob die verwendeten Schadstoffe in den applizierten Konzentrationen

(Isooctan, 1 μM bzw. 50 μM oder DMSO, 30 nM bzw. 300 nM PFOS) zu einem Verlust der Zellvitalität in den drei Assays führen. Diese Zielsetzung wurde auch in der Diplomarbeit von Korff (2010) verfolgt.

Zusätzlich wurde an primären Schweine-Hepatozyten die Vitalität in Abhängigkeit von zwei verschiedenen Isolierungsmethoden (Gewebedissoziation in Medium; Leberbiopsie Perfusion) und zwei unterschiedlicher Kulturmedien (Hepatozyme-SFM; WME) evaluiert. Mit diesen Versuchen sollte ermittelt werden, ob die beiden Isolierungsmethoden und die getesteten Medien einen Einfluss auf die Vitalität der Hepatozyten haben.

3.7.1 Bestimmung der Zellzahl (Trypanblau-Ausschlusstest)

Der Trypanblau-Ausschlusstest wird zur Ermittlung der Vitalität von Zellsuspensionen verwendet. Der Farbstoff Trypanblau kann nur in Zellen eindringen, deren Zellmembran geschädigt ist und färbt diese blau an. Zellen mit intakter Zellmembran bleiben ungefärbt. Der Trypanblau-Ausschlusstest ist kein Vitalitätstest im engeren Sinne, da er keinen Rückschluss auf den Stoffwechsel der Zellen zulässt (Seglen, 1976; Lindl und Gstraunthaler, 2008). Er detektiert jedoch abgestorbene Zellen und wird als Standardmethode zur Beurteilung einer Zellsuspension nach der Isolierung oder Subkultivierung verwendet, um eine erste Aussage zur Vitalität der Zellsuspension treffen zu können (Pappenheimer, 1917; Hoskins *et al.*, 1956; Lindl und Gstraunthaler, 2008; Schmitz 2009). Die genaue Durchführung des Tests wird in Kapitel 4.6 beschrieben.

3.7.2 Bestimmung der Stoffwechselaktivität (XTT-Test)

Der XTT-Test lässt Aussagen über die allgemeine Stoffwechselaktivität der Zellen zu und ist eine Weiterentwicklung des MTT-Tests (Roehm *et al.*, 1991). Er beruht auf dem Prinzip, dass von metabolisch aktiven Zellen das gelbe Tetrazolium-Salz XTT (Natrium 3'-[1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium]-bis (4-Methoxy-6-Nitro)-Benzen-Sulfonsäurehydrat) zu orangefarbenem Formazan gespalten wird (s. Abbildung 3-3).

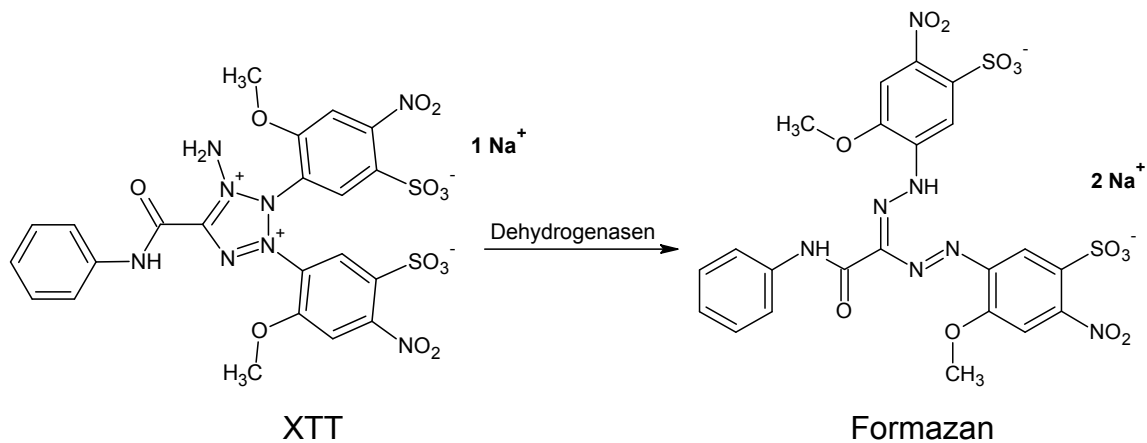


Abbildung 3-3: Spaltung von XTT zu Formazan (Scudiero *et al.*, 1988)

Diese Reaktion läuft nur in vitalen Zellen mit aktiven mitochondrialen oder cytosolischen Dehydrogenasen ab (Scudiero *et al.*, 1988). Der Nachweis des entstandenen Formazan erfolgt spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm im Platten-Reader (die Farbintensität ist proportional zur Aktivität der Zellen). Die Referenzwellenlänge, zur Messung unspezifischer Reaktionen, beträgt 650 nm. Die Messwerte der Referenzwellenlänge werden von den 450 nm-Werten subtrahiert. Die genaue Durchführung des XTT-Tests wird in Kapitel 4.9.1 beschrieben.

Der XTT-Test bietet gegenüber vergleichbaren Vitalitätstests verschiedene Vorteile. So kommen bei diesem Test beispielsweise keine radioaktiven Substanzen zum Einsatz (z. B. Proliferationstest mit [³H]-Thymidin). Das im XTT-Test gebildete Formazan ist wasserlöslich. Dadurch muss, im Gegensatz zum MTT-Test, nach Ende der Reaktion kein zusätzlicher Lösungsschritt erfolgen. Der XTT-Test lässt sich dadurch schneller und einfacher durchführen. Dies ist besonders wichtig, da in der vorliegenden Arbeit häufig viele Proben (100-200 *wells*) gleichzeitig behandelt werden mussten. Der XTT-Test liefert verlässliche Ergebnisse, wie Ponsoda *et al.*, (1998) zeigen konnten. Ponsoda *et al.* (1998) zeigte bei der Kultivierung primärer Ratten-Hepatozyten, dass die Ergebnisse sehr gut mit dem Protein- und DNA-Gehalt der Zellen (Parameter zur Abschätzung der Zellzahl) sowie mit den Ergebnissen aus dem MTT-Test korrelierten. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass PCBs die Vitalität primärer Hepatozyten negativ beeinflussen, was mit Hilfe der vorgestellten Testsysteme erfasst werden kann. Beispielsweise konnten Aly und Domènech (2009) im MTT-Test eine signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität

primärer Ratten-Hepatozyten nach einer 24stündigen Inkubation mit 30 μM Aroclor 1254 nachweisen.

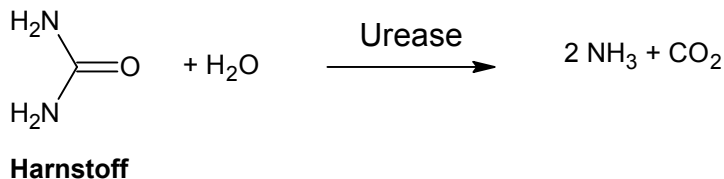
3.7.3 Nachweis spezifischer Stoffwechselaktivität (Harnstoff-Test)

Um die primären Hepatozyten für das Zellkulturmodell einsetzen zu können, sind neben Aussagen über die allgemeine Stoffwechselaktivität solche zum spezifischen Stoffwechsel der Zellen erforderlich.

Eine Möglichkeit, den charakteristischen Metabolismus primärer Hepatozyten zu analysieren, ist ein Nachweis der Albuminsynthese (Hamel *et al.*, 2006). Dieser Nachweis erfolgt über eine spezifische Antikörper-Reaktion. Da für den Seehund keine Albumin Antikörper zur Verfügung stehen, kommt diese Methode in der vorliegenden Arbeit nicht in Betracht.

Zu den spezifischen Stoffwechselreaktionen der Leber gehört auch die Synthese von Harnstoff (Dabos *et al.*, 2004). Beim hepatischen Abbau von Aminosäuren entsteht Ammoniak, welches durch die Bildung von wasserlöslichem Harnstoff über die Niere ausgeschieden wird (Müller-Esterl, 2004). Das Testprinzip zum Nachweis von Harnstoff ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

1.)



2.)

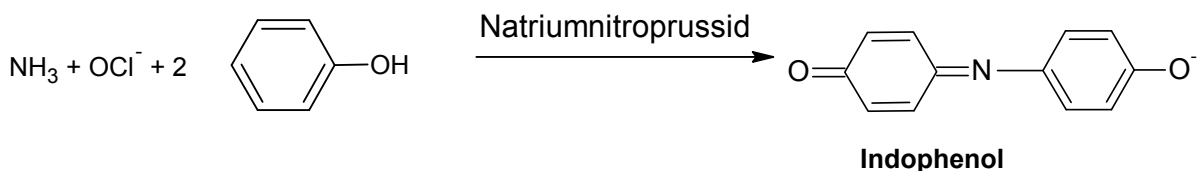


Abbildung 3-4 Harnstoff-Nachweis

Das Enzym Urease katalysiert die Umwandlung von Harnstoff und Wasser zu Ammoniak und Kohlendioxid. In Gegenwart von Natriumnitroprussid reagiert

Ammoniak mit alkalischem Hypochlorit und Phenol zu dem blauen Farbstoff Indophenol (Absorptionsmaximum: 570 nm). Die Intensität der Blaufärbung lässt sich spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmen (Horn *et al.*, 1967).

Anhand des Harnstoff-Tests sollte ermittelt werden, ob die in den Inkubationsexperimenten eingesetzten Schadstoffkonzentrationen einen Einfluss auf die Harnstoffsynthese der primären Seehund-Hepatozyten haben. Thomé *et al.* (1995) stellten eine signifikante Abnahme der Harnstoffproduktion bei primären Ratten-Hepatozyten nach einer Inkubation mit 25 µM Aroclor 1254 fest. In der Literatur werden unterschiedliche Angaben zur Veränderung der Harnstoffsynthese im Verlauf einer mehrtägigen Kultivierungsdauer gemacht. Es werden sowohl eine Abnahme der Harnstoffproduktion (Gómez-Lechón *et al.*, 1990; Katsura *et al.*, 2002) als auch eine Zunahme (Dabos *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 2006) derselbigen beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Harnstoffsynthese von primären Schweine-Hepatozyten im Verlauf einer 14tägigen Kultivierung untersucht, um zu analysieren wie die mit der Leberbiopsie Perfusion isolierten Hepatozyten reagieren.

3.7.4 Beurteilung der Membranschädigung (LDH-Test)

Der Nachweis intrazellulärer Enzyme im Zellkulturmedium wird ebenfalls als Vitalitätstest angewandt. Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazelluläres Enzym, welches sich bei vitalen Zellen im Cytoplasma befindet. Nur bei einer starken Schädigung der Zellmembran tritt LDH aus der Zelle aus und lässt sich im Zellkulturmedium nachweisen. Die Menge des Enzyms ist direkt proportional zum Grad der Zellschädigung (Decker *et al.*, 1988; Schmitz, 2009). Der Nachweis erfolgt enzymatisch über die Bildung eines Formazan-Farbstoffes. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab (s. Abbildung 3-5)

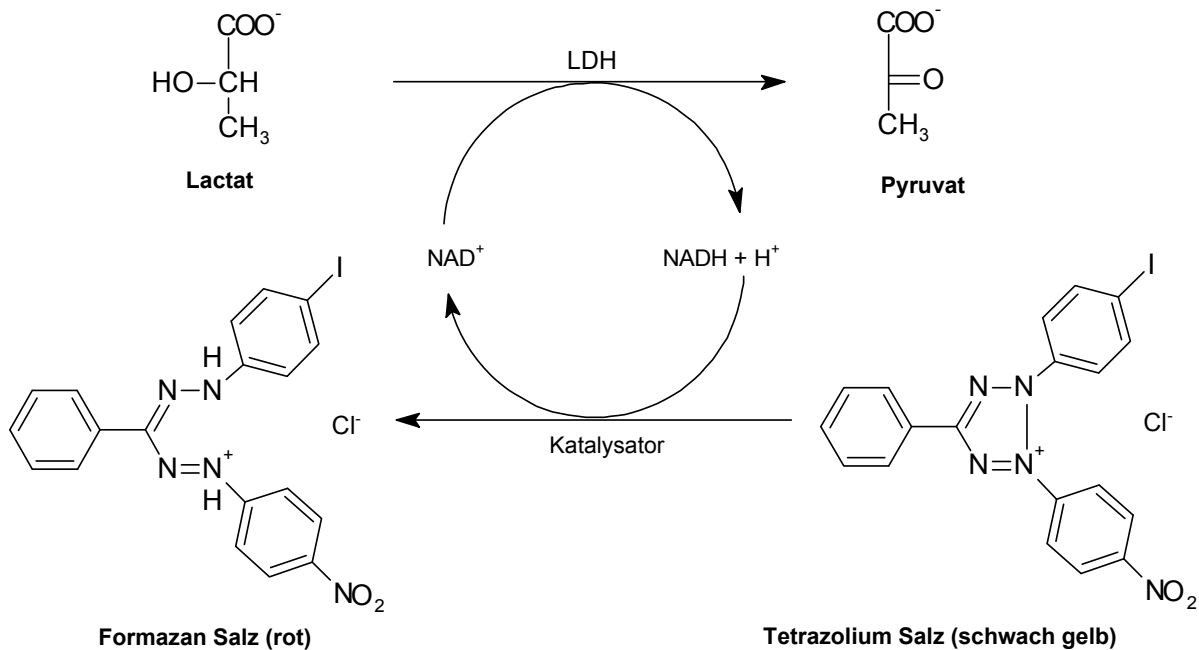


Abbildung 3-5: LDH-Nachweis (Roche, 2006)

LDH setzt unter Verbrauch von NAD^+ Lactat zu Pyruvat um. Der Katalysator Diaphorase überträgt die zwei Wasserstoffatome vom $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), das durch die Reduktion zum roten Formazan-Salz umgesetzt wird (Schmitz, 2009). Der LDH-Test wurde als Vitalitätstest gewählt, da er u. a. die Möglichkeit bietet, die Integrität der Zellen zu ermitteln ohne die Zellen direkt zu verwenden, da die Messung nur anhand des Zellkulturmediums erfolgt. Dies ist besonders in Bezug auf die Seehund-Hepatozyten von entscheidender Bedeutung, da hier das Zellmaterial sehr begrenzt vorliegt.

Aly *et al.* (2009) stellten in ihrer Studie an primären Ratten-Hepatozyten fest, dass eine Inkubation der Zellen mit 30 μM Aroclor 1254 zu einer Membranschädigung führte (LDH-Test). Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen zu einer Schädigung der Zellmembran von primären Seehund-Hepatozyten führen. In der Literatur wird eine ansteigende LDH-Freisetzung mit zunehmender Kultivierungsdauer beschrieben (Clement *et al.*, 2001; Jasmund *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die LDH-Freisetzung von primären Schweine-Hepatozyten im Verlauf einer 14tägigen

Kultivierung untersucht, um festzustellen wie die mit der Leberbiopsie Perfusion isolierten Hepatozyten reagieren.

3.8 Schadstoffe

Im folgenden Abschnitt werden die Schadstoffe vorgestellt, die im Zellkulturmodell zur Anwendung kamen. Die primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten sowie die HepG2-Zellen wurden mit polychlorierten Biphenylen (PCB) und Perfluorooctansulfonat (PFOS) inkubiert. Beide Schadstoffe sind persistent und reichern sich dadurch in der marinen Nahrungskette an. Als Top-Prädatoren sind marine Säuger stark mit diesen Schadstoffen belastet. Die Schadstoffbelastung hat zum Teil erheblichen Einfluss auf die Gesundheit der Tiere. Die bisher bekannten Auswirkungen werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert. Da für PCB der Toxizitätsmechanismus aufgeklärt ist, bieten Inkubationsexperimente mit PCB zudem die Möglichkeit die Funktionsweise des Zellkulturmodells zu überprüfen (s. Kapitel 3.9).

3.8.1 Polychlorierte Biphenyle (PCB)

Als polychlorierte Biphenyle (PCB) werden alle chloresubstituierten Biphenyle bezeichnet (allgemeine Strukturformel s. Abbildung 3-6). Insgesamt gibt es 209 mögliche Kongenere.

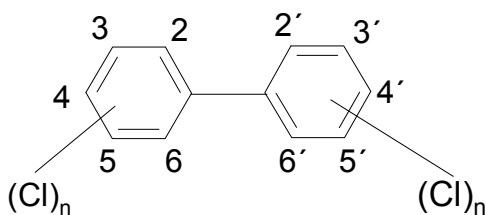


Abbildung 3-6: Allgemeine Strukturformel für Polychlorierte Biphenyle

3.8.1.1 Verwendung und Eigenschaften von PCB

PCBs zeichnen sich unter anderem durch ihre Stabilität, eine hohe Temperaturbeständigkeit und eine geringe elektrische Leitfähigkeit aus. Aufgrund dieser Eigenschaften fanden PCBs in der Industrie eine vielseitige Verwendung und wurden beispielsweise als Hydraulikflüssigkeiten, Industriefette und -öle, Wärmeaustauscher, Dielektrika, Papierbeschichtungen, Flammschutzmittel sowie als Weichmacher in Lacken eingesetzt (Landesamt für Umweltschutz, Baden-Württemberg, 1995; Fent 2007). PCBs wurden von vielen Herstellern als komplexe Gemische vertrieben. Zu den bekanntesten Handelsnamen gehören Aroclor (Monsanto, USA), Chlophen (Bayer, Deutschland) und Kanechlor (Kanegafuchi, Japan).

Seit 1978 ist der Einsatz von PCBs nur noch in geschlossenen Systemen, wie z. B. in Hydraulik- oder Kühlsystemen zulässig. Seit PCBs 2001 in die Stockholmer Konvention aufgenommen wurden, ist die Herstellung und Verwendung von PCBs verboten. Die Stockholmer Konvention ist ein Abkommen über rechtlich bindende Verbots- und Beschränkungsmaßnahmen für bestimmte langlebige organische Schadstoffe (*persistent organic pollutants* = POPs) (Stockholmer Konvention, 2009). PCBs sind ubiquitär verteilt und können inzwischen auch in Umweltproben aus der Arktis und Antarktis nachgewiesen werden (Muir *et al.*, 1988; Mössner *et al.*, 1997; Skaare *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2009). Die Schadstoffe werden in die Atmosphäre freigesetzt, verteilen sich dadurch weltweit und gehen im (Meer-) Wasser in Lösung (Tanabe *et al.*, 1994; Fent, 2007).

In Umweltproben werden eine Vielzahl unterschiedlicher PCB-Kongenere nachgewiesen (Fent, 2007), weshalb für das Zellkulturmodell die Aroclor-Lösungen 1254, 1260 und 1262 eingesetzt werden. Die Ziffern 12 bezeichnen das Biphenylgerüst. Die beiden letzten Ziffern der Aroclor-Gemische geben den Chlorgehalt nach Gewichtsprozenten an. Aroclor 1260 enthält demnach 60% Chlor. Die Verwendung der Aroclor-Gemische erlaubt die Konstruktion möglichst realistischer Versuchsbedingungen, da die Seehunde in der Nordsee ebenfalls mit zahlreichen PCB-Kongeneren belastet sind (Vagts, 1992). Mit den drei ausgewählten Aroclor-Lösungen wird ein breites Spektrum an PCBs mit einem unterschiedlichen Chlorierungsgrad und sowohl coplanare als auch planare PCB-Kongenere erfasst

(Landesamt für Umweltschutz, Baden-Württemberg, 1995). Des Weiteren wird besonders Aroclor 1254 in zahlreichen Studien an primären Hepatozyten eingesetzt, was den Vergleich eigener Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur ermöglicht (Roelandt *et al.*, 1994; Thomé *et al.*, 1995; Silkworth *et al.*, 2005; Aly *et al.*, 2009).

3.8.1.2 Auswirkungen von PCBs auf marine Säugetiere

Durch ihre lipophilen Eigenschaften und ihre hohe Stabilität reichern sich PCBs in der Nahrungskette an (Muir *et al.*, 1988; Fisk *et al.*, 2001; Sobek *et al.*, 2010). In der marinen Umwelt konnten folgende PCB-Mengen nachgewiesen werden: im Meerwasser 10^{-7} - 10^{-4} mg/kg PCB; im Sediment 10^{-3} - 1 mg/kg PCB, im Plankton bis zu 5 mg/kg PCB; in Fisch bis zu 100 mg/kg PCB; in marinen Säugern bis zu 10^3 mg/kg (Körpergewicht) (Fent, 2007). Diese Studien zeigen deutlich, dass marine Säugetiere als Endglieder der Nahrungskette besonders stark mit PCBs belastet sind. Diese Belastung hat u. a. einen Einfluss auf die Gesundheit der marinen Säuger. In der Literatur werden immun- und reproduktionstoxische sowie kanzerogene Wirkungen beschrieben. Des Weiteren werden DNA-Schädigungen und verminderte Knochendichte mit einer PCB-Belastung in Zusammenhang gebracht. Im folgenden Abschnitt wird eine Auswahl der Arbeiten vorgestellt.

Viele Studien untersuchen eine immuntoxische Wirkung von PCBs. Ross *et al.* (1996a) konnten in einem Fressexperiment mit Seehunden einen Zusammenhang zwischen PCB-Belastung und Immunsuppression feststellen (De Swart *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1996a). Die Aktivität der natürlichen Killerzellen und der T-Lymphozyten war nach einer Fütterung mit PCB-haltigem Fisch signifikant herabgesetzt. Beide Zelltypen sind vor allem für die Abwehr von Viruserkrankungen wichtig. Ein Zusammenhang zwischen PCB-Belastung und einer Anfälligkeit für Viruserkrankungen ist daher wahrscheinlich (Kannan *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 1994; De Guise *et al.*, 1998; Harvell *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1996b, 2000, 2002; Sørmo *et al.*, 2009). Diese Hypothese wird auch von einem *in vivo* Experiment mit Ratten gestützt (Ross *et al.*, 1997). Die Autoren konnten zeigen, dass eine Exposition

trächtiger Tiere mit PCBs zu einer verringerten Immunfunktion bei den Nachkommen führt. Dies ist besonders besorgniserregend, da PCBs auch in marinen Säugern von der Mutter auf das Jungtier übertragen werden. Dieser Transport findet zum einen plazentar und zum anderen über die Muttermilch statt. Wolkers *et al.* (2004) konnten einen PCB-Transfer über die Muttermilch bei Seehunden nachweisen. Ein Vergleich der PCB-Muster aus der Milch und dem Fett der Jungtiere lässt den Schluss zu, dass die Jungtiere noch nicht in der Lage sind, die aufgenommenen Schadstoffe zu metabolisieren (Wolkers *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen an Mutter-Jungtier-Paaren bei anderen Spezies der marinen Säugetiere belegen den vertikalen PCB-Transfer von Mutter zu Jungtier (Debier *et al.*, 2003; Sørmo *et al.*, 2003; Borrell und Aguilar, 2005; Wolkers *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2007; Vanden Berghe *et al.*, 2010).

Obwohl allgemein ein immunsuppressiver Einfluss der PCBs auf marine Säuger angenommen wird (Aguilar *et al.*, 1994; De Guise *et al.*, 1998; Sørmo *et al.*, 2009), können die Auswirkungen bei verschiedenen Arten unterschiedlich stark sein. Hammond *et al.* (2005) untersuchten den respiratorischen Burst (Freisetzung von Sauerstoffradikalen von den Immunzellen während der Phagozytose zur Beseitigung von Krankheitserregern), die Phagozytoseaktivität und die Aktivität der Leukozyten aus Seehunden und Kegelrobben. Die Leukozyten wurden mit Aroclor 1242 und 1260 inkubiert. Die Leukozyten aus den Seehunden reagierten empfindlicher auf die Aroclor-Inkubation als die Leukozyten aus den Kegelrobben (Hammond *et al.*, 2005). Dies lässt vermuten, dass eine PCB-Belastung in Seehunden zu einer höheren Anfälligkeit gegenüber Krankheiten führt als bei Kegelrobben.

Die Fähigkeit, PCBs zu metabolisieren und auszuscheiden, ist bei Robben und Walen unterschiedlich stark ausgeprägt. Hierin könnte eine ungleich hohe Anfälligkeit für Krankheiten begründet sein, wie z. B. Tanabe *et al.* (1988) zeigten. Diese Studie verglich das Vorkommen verschiedener PCB-Kongenere in diversen Wal- und Robbenarten. In allen untersuchten Walarten war die Anzahl der PCB-Kongenere höher als in den untersuchten Robben. Dazu gehörten auch geringer chlorierte Verbindungen, die leichter zu metabolisieren sind (Tanabe *et al.*, 1988; Fent, 2007). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Wale eine andere metabolische Kompetenz haben als die übrigen untersuchten Säuger. Zu demselben Ergebnis

kommen auch Weijs *et al.* (2009a,b). Sie verglichen unter anderem die metabolische Kompetenz von Seehunden (*Phoca vitulina*) und Schweinswalen (*Phocoena phocoena*) hinsichtlich der Metabolisierung von PCBs und polybromierten Diphenylethern (PBDEs). Es zeigte sich, dass die Seehunde in der Lage waren, gering chlorierte PCBs effizienter zu metabolisieren und auszuscheiden, als die Schweinswale. Der gleiche Trend konnte für die PBDEs festgestellt werden. Dies ist vermutlich auf weniger effiziente Enzyme des Cytochrom P450-Systems beim Schweinswal zurückzuführen (Weijs *et al.*, 2009a,b). Die genannten Untersuchungen unterstreichen die Notwendigkeit, artspezifische Biomarker-Muster einzusetzen. Die Entwicklung artspezifischer Biomarker, die die Auswirkungen einer Schadstoffbelastung bei Seehunden anzeigen, ist das Ziel unserer Arbeitsgruppe. Hierfür liefert das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Zellkulturmodell die Grundlage.

Eine Belastung mit PCBs hat nicht nur Einfluss auf das Immunsystem der marinen Säuger, sondern auch auf die Reproduktion. Ein Fressexperiment von Reijnders (1986) an Seehunden, bei dem 24 Tiere zweieinhalb Jahre mit PCB belastetem Fisch aus der westlichen Nordsee gefüttert wurden, führte zu einem signifikant geringeren Reproduktionserfolg im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fütterung mit gering belastetem Fisch aus dem Atlantik) (Reijnders, 1986). Die genaue Ursache konnte in der Studie nicht ermittelt werden. Es konnte keine Veränderung der Hormonkonzentrationen im Blut festgestellt werden. Die Autoren nahmen an, dass die Einnistung des Keimes die sensibelste Phase darstellt und PCBs diesen Prozess beeinflussen. Diese Hypothese könnte mit einer Untersuchung an Kaninchen gestützt werden. Seiler *et al.* (1993) konnten in einer Studie an trächtigen Kaninchen zeigen, dass PCBs embryotoxisch wirken. Untersucht wurde der Zeitraum von Tag 1 bis Tag 6 nach der Empfängnis. Dass PCBs den Reproduktionszyklus auf hormoneller Ebene beeinflussen, konnte in zahlreichen Studien an Ratten demonstriert werden (z. B. Brezner *et al.*, 1984; Sager *et al.*, 1993; Muto *et al.*, 2003; Steinberg *et al.*, 2008). Muto *et al.* (2003) verabreichten trächtigen Rattenweibchen PCB-haltiges Futter am 13-19 Tag nach der Empfängnis und untersuchten verschiedene Reproduktionsparameter bei den weiblichen Nachkommen. Die Autoren stellten eine signifikante Verzögerung der Geschlechtsreife fest. Des

Weiteren war die Zahl der Follikel reduziert, was zu einer verminderten Produktion von Gelbkörperhormon, Estradiol und Progesteron führte. Diese Hormonveränderungen können die Wahrscheinlichkeit eines Aborts erhöhen oder eine Trächtigkeit verhindern. Eine pränatale Exposition mit PCBs kann somit erhebliche Auswirkungen auf die Reproduktion der Nachkommen haben (Muto *et al.* 2003). Für verschiedene PCB-Kongenere konnten sowohl östrogene und androgene als auch antiöstrogene und antiandrogene Wirkungsweisen detektiert werden (Ulbrich und Stahlmann, 2004).

PCBs greifen nicht nur auf hormoneller Ebene in den Reproduktionszyklus der Tiere ein, sondern verursachen möglicherweise auch pathologische Veränderungen, die zu einem geringeren Reproduktionserfolg führen (Helle *et al.*, 1976). Bereits 1976 stellten Helle und Kollegen einen Zusammenhang zwischen der PCB-Belastung und pathologischen Veränderungen im Uterus von Ringelrobben (*Pusa hispida*) her (Helle *et al.*, 1976). Von 109 untersuchten Weibchen wiesen 64% einen Uterusverschluss auf. Außerdem konnten sie eine hohe Fehlgeburtenrate feststellen. In einer anderen Studie konnte bei Kegelrobbenweibchen allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer PCB-Belastung und Wucherungen in der Gebärmuttermuskulatur (Leiomyom) festgestellt werden (n=257) (Bredhult *et al.* 2008).

In der Literatur werden weitere Effekte einer PCB-Belastung bei marinen Säugetieren beschrieben. So stellten Martineau *et al.* (1987, 2002) ein erhöhtes Auftreten von Tumoren bei Belugawalen (*Delphinapterus leucas*) fest, die stark mit PCBs, PAHs und DDT belastet waren. Gauthier *et al.* (1999), konnten eine Schädigung der DNA nach PCB-Exposition bei Lymphozyten aus Belugawal, Großem Tümmler, Kegel- und Sattelrobbe (*Phoca groenlandica*) nachweisen. Sonne *et al.* (2004) fanden einen Zusammenhang zwischen verminderter Knochendichte und hoher PCB-Belastung bei Eisbären (*Ursus maritimus*).

Die vorgestellten Studien zeigen, dass PCBs die Gesundheit der marinen Säuger beeinträchtigen und sich die Effekte auf unterschiedlichen Ebenen zeigen. Es konnten u. a. immunsuppressive, reproduktionsschädigende und kanzerogene Wirkungen festgestellt werden.

3.8.2 Perfluorooctansulfonat (PFOS)

PFOS ($C_8F_{17}SO_3^-$) gehört zur Stoffklasse der perfluorierten Verbindungen (Lau *et al.*, 2007, Thieme Römpf online, 2006). Bei perfluorierten Verbindungen sind die Wasserstoffatome am Kohlenstoffgerüst vollständig durch Fluoratome ersetzt. Als Perfluortensid besteht PFOS aus einer hydrophoben Kohlenstoffkette und einer hydrophilen Sulfonat-Gruppe (s. Abbildung 3-7).

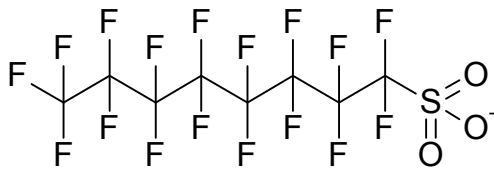


Abbildung 3-7: Strukturformel von PFOS

3.8.2.1 Verwendung und Eigenschaften von PFOS

Aufgrund der energiereichen, kovalenten Bindung zwischen den Kohlenstoff- und Fluoratomen, sind perfluorierte Verbindungen thermisch und chemisch außerordentlich stabil. Zudem sind sie, bedingt durch ihren amphipatischen Charakter, sowohl stark wasser- als auch fettabweisend. Diese Eigenschaften machen perfluorierte Verbindungen für viele Anwendungen in der Industrie interessant. Verwendung finden sie z. B. in Feuerlöschschäumen, Beschichtungen für Lebensmittelverpackungen, Imprägniermitteln von Textilien, Insektiziden, Schmiermitteln und Antihafbeschichtungen (Teflon®) (Fent, 2007).

Bedingt durch ihre hohe Stabilität lässt sich ein Großteil der perfluorierten Verbindungen nicht durch herkömmliche Abwasserbehandlung in Klärwerken entfernen (Schultz *et al.*, 2006; Vecitis *et al.*, 2008). Dies trifft vor allem für PFOS und die Perfluorooctansäure (PFOA) zu. Sie werden nicht durch Bakterien abgebaut und können weder durch Photo- noch durch Hydrolyse gespalten werden (Key *et al.*, 1998; Hatfield, 2001a,b; Schröder *et al.*, 2005). Sie gelangen somit ungehindert in den Wasserkreislauf und werden mittlerweile weltweit in Wasser-, Sediment-, und

Biotaprobennachgewiesen (Giesy und Kannan, 2001; Kannan *et al.*, 2001; Houde *et al.*, 2006, Ahrens *et al.*, 2010).

Die außerordentlich hohe Persistenz von PFOS und die damit verbundene Bioakkumulation sowie die toxischen Eigenschaften führten 2009 zur Aufnahme von PFOS in die Stockholmer Konvention und damit zu einer Restriktion der Produktion und Verwendung (Stockholmer Konvention, 2009).

3.8.2.2 Toxizität von PFOS

Perfluorierte Verbindungen reichern sich aufgrund ihrer Persistenz in der Nahrungskette an (Martin *et al.*, 2004; Tomy *et al.*, 2004; Powley *et al.*, 2008; Butt *et al.*, 2010). So fanden Kelly *et al.* (2009) für verschiedene Verbindungen Werte von 0,01-0,1 ng/g Trockengewicht in Sedimentproben und 0,1-40 ng/g Nassgewicht in Biotaprobennachgewiesen aus der Arktis. Van de Vijver *et al.* (2005) detektierten in einer Studie an Seehunden aus dem niederländischen Wattenmeer PFOS-Belastungen in der Leber von 2724 ng/g Nassgewicht. Ahrens *et al.* (2009a) wiesen mit 1665 ng/g Nassgewicht geringere PFOS-Werte für Seehunde aus der Deutschen Bucht nach. Da perfluorierte Verbindungen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften an Blutproteine binden (Jones *et al.*, 2003) und sich nicht im Fettgewebe anreichern, werden die höchsten Konzentrationen in Blut- und Leberproben gefunden (Ahrens *et al.*, 2009a; Kelly *et al.*, 2009). Die Konzentrationen von PFOS übertreffen in sämtlichen Biota-Proben die Konzentrationen der übrigen perfluorierten Verbindungen (Kannan *et al.*, 2002; Ahrens *et al.*, 2009b; Shaw *et al.*, 2009).

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften und der möglichen Toxizität analysieren viele Arbeitsgruppen den Einfluss von PFOS auf Organismen. Der Großteil der Studien wird an Labortieren *in vivo* oder *in vitro* auf zellulärer Ebene durchgeführt. Die Datenerhebung bei marinen Säugern beschränkt sich bisher hauptsächlich auf Konzentrationsmessungen von perfluorierten Verbindungen. Um den Einfluss der Schadstoffe auf den Organismus besser abschätzen zu können, besteht auch in diesem Zusammenhang ein dringender Bedarf für die Entwicklung artspezifischer Biomarker (Letcher *et al.*, 2010). Bisher wurden erst vereinzelt Arbeiten in der Literatur beschrieben, die sich mit der Identifizierung von Biomarkern hinsichtlich des Einflusses von perfluorierten Verbindungen auf marine Säugetiere befassen.

Ishibashi *et al.* (2008) zeigten, dass in Baikalrobben (*Pusa sibirica*) perfluorierte Verbindungen das Expressionslevel des PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*) beeinflussen und postulieren eine Eignung als Biomarker.

Im folgenden Abschnitt werden einige Arbeiten vorgestellt, die den Einfluss von PFOS auf die Gesundheit von Organismen untersuchen. Die Literaturstellen geben ein breites Spektrum der durchgeführten Studien wieder. PFOS gilt als *endocrine disruptor* also als Substanz, die den Hormonhaushalt beeinflusst. Dies konnten Austin *et al.*, (2003) mit Experimenten an Ratten nachweisen. Nach 14tägiger PFOS-Gabe wurde in 66% der Ratten eine Störung des Sexualzyklus festgestellt. Des Weiteren konnten sie eine Anreicherung von PFOS im Hypothalamus der Ratten beobachten. PFOS ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Austin *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2009).

In Inkubationsexperimenten konnte eine zelltoxische Wirkung von PFOS gezeigt werden. Liu *et al.*, (2007) inkubierten primäre Hepatozyten aus Buntbarschen (*Oreochromis niloticus*) mit PFOS. Bedingt durch die Inkubation kam es in den Zellen zu oxidativem Stress und gesteigerter Apoptose.

Ein weiteres Anzeichen für eine cytotoxische Wirkung von Schadstoffen ist die Peroxisomen-Proliferation. Peroxisomen sind Zellorganellen, die Zellgifte abbauen. Wird nach einer Schadstoff-Inkubation von Zellen eine starke Erhöhung der Peroxisomen-Anzahl (Peroxisomen-Proliferation) festgestellt, wird dies als Hinweis gewertet, dass die applizierte Substanz zytotoxisch ist. Sowohl Berthiaume und Wallace (2002) als auch Martin *et al.* (2007) wiesen in *in vivo* Experimenten an Ratten nach, dass PFOS und PFOA Peroxisomen-Proliferation in der Leber auslösen. PFOS verursacht zudem Veränderungen in der Genexpression. Mollenhauer *et al.* (2009) inkubierten isolierte Hautzellen aus dem Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*) mit PFOS. Bereits nach einer einstündigen Inkubation konnten signifikante Änderungen in der Genexpression festgestellt werden. Die veränderte Genexpression ging einher mit einer Abweichung des Zellzyklus, einer verlangsamten Zellproliferation und führte zu einer reduzierten Proteinsynthese. Die Autoren vermuten, dass derartig einschneidende Veränderungen des Zellzyklus, wie sie in der Studie beobachtet wurden, Einfluss auf die Gesundheit der Tiere haben (Mollenhauer *et al.*, 2009).

Eine kanzerogene Wirkung von PFOS wiesen Hu *et al.* (2002) in Versuchen an einer Leberepithelzelllinie (WB-F344) aus der Ratte und einer Zelllinie aus Nierenepithelzellen (CDK) aus dem Großen Tümmler nach. Sie untersuchten den Einfluss einer PFOS-Inkubation auf die interzelluläre Kommunikation (*gap junctional intercellular communication* = GJIC) der Zellen. Schon nach kurzer Inkubationszeit konnte ein Rückgang der GJIC festgestellt werden. Ein Verlust der GJIC wird mit der Induktion von Tumorwachstum in Verbindung gebracht (Upham *et al.*, 1998).

Es gibt des Weiteren Hinweise darauf, dass eine Belastung mit PFOS zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führt. Kannan *et al.* (2006) untersuchten 80 weibliche Seeotter (*Enhydra lutris nereis*), die zwischen 1992 und 2002 an der kalifornischen Küste (USA) tot aufgefunden wurden und stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher PFOS- sowie PFOA-Belastung und dem Auftreten von Infektionskrankheiten fest. Eine immunsuppressive Wirkung von PFOS konnten ebenfalls sowohl Fang *et al.* (2008) als auch Peden-Adams *et al.* (2008) in *in vivo* Experimenten an Ratten nachweisen. Keil *et al.* 2008 gelang der Nachweis einer Immunsuppression nach PFOS-Gabe an Mäusen. Trächtigen Mäusen wurde PFOS-haltiges Futter verabreicht und die Funktion der natürlichen Killerzellen der Nachkommen vier bzw. acht Wochen nach der Geburt untersucht. Die Autoren konnten eine signifikante Abnahme der Aktivität der natürlichen Killerzellen detektieren.

Die oben genannten Studien zeigen, dass eine PFOS-Belastung vielfältige Auswirkungen auf den Organismus haben kann. Um den Einfluss von PFOS auf die Gesundheit mariner Säugetiere besser beurteilen zu können, bedarf es weiterer Anstrengungen (Letcher *et al.*, 2010). Es besteht ein großer Bedarf an Studien, in denen der Einfluss von PFOS an marinen Säugern statt an Labortieren untersucht wird (Letcher *et al.*, 2010). Eine Übertragung der Ergebnisse von Labortieren auf marine Säugetiere ist wie bereits erwähnt schwierig, da die meisten Reaktionen artspezifisch sind. Aus diesem Grund liefert das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Zellkulturmodell einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung der Auswirkungen einer PFOS-Belastung auf Seehunde.

3.9 Inkubationsexperimente

Wesentlicher Bestandteil des Zellkulturmodells sind die Inkubationsexperimente. Zur Untersuchung der Auswirkungen des Schadstoffeinflusses wurden in der vorliegenden Arbeit primäre Seehund- und Schweine-Hepatozyten sowie HepG2-Zellen mit PCB bzw. PFOS inkubiert. Die beiden Schadstoffe wurden ausgewählt, da allgemein ein Zusammenhang zwischen einer Belastung mit PCB bzw. PFOS und der Beeinträchtigung der Gesundheit mariner Säugetiere hergestellt wird (Ross, 2002; Kannan *et al.*, 2006; Mollenhauer *et al.*, 2009; Sørmo *et al.*, 2009). Sie reichern sich in der Nahrungskette an (Tanabe *et al.*, 1984; Powley *et al.*, 2008; Butt *et al.*, 2010; Sobek *et al.*, 2010) und werden auch in Seehunden aus der Nordsee nachgewiesen (Vagts, 1992; Van de Vijver *et al.*, 2005; Ahrens *et al.*, 2009a).

Ein weiterer sehr entscheidender Grund für die Auswahl von PCB als Schadstoff für die Inkubationsexperimente begründet sich in der Tatsache, dass der Toxizitätsmechanismus von PCB aufgeklärt ist (Poland *et al.*, 1976; Bandiera *et al.*, 1982; Safe, 2001). Dieser Umstand bietet die Möglichkeit, die Funktionsweise des Zellkulturmodells zu überprüfen. Koplanare PCBs binden an den Arylhydrocarbon Rezeptor (Ah-Rezeptor) und lösen dadurch eine ganze Reihe biochemischer und zellulärer Reaktionen aus. Es kommt u. a. zu einer vermehrten Bildung von Cytochrom P450-Enzymen in der Leber. Wenn es möglich ist, nach der Inkubation mit PCB, eine Veränderung der Expressionslevel der Cytochrom P450-Enzyme mittels 2D-Gelelektrophorese nachzuweisen, würde das die Funktionalität des Zellkulturmodells bestätigen.

Für die Inkubationsexperimente wurden die Schadstoffe in umweltrelevanten Konzentrationen eingesetzt (genaue Durchführung s. Kapitel 4.10). Da das Zellkulturmodell der Identifizierung von Biomarkern dienen soll ist es wichtig, dass die eingesetzten Schadstoffmengen in derselben Größenordnung liegen wie die tatsächliche Belastung der Tiere. Bei den in der Literatur angegebenen Schadstoffkonzentrationen in Seehunden aus der Nordsee handelt es sich um Konzentrationsbereiche (Vagts, 1992; Ahrens *et al.*, 2009a). Für die Inkubationsexperimente sollten die Schadstoffmengen so gewählt werden, dass die obere und die untere Grenze der nachgewiesenen Konzentrationen abgedeckt wird. Um feststellen zu können, ob die Schadstoffinkubation eine Veränderung im Proteinexpressionsmuster hervorruft

müssen Referenzzellen zur Verfügung stehen. Als Referenzzellen dienten Hepatozyten, die mit den Lösungsmitteln der Schadstoffe inkubiert wurden. Alle Inkubationsexperimente (Lösungsmittel, niedrige und hohe Schadstoffkonzentration) wurden in dreifacher Ausführung (je drei Zellkulturflaschen) durchgeführt. Daraus ergab sich eine benötigte Zahl an Zellkulturflaschen von neun (Abbildung 3-8 und Kapitel 4.10). Es wäre durchaus wünschenswert gewesen alle Experimente in einer höheren Stückzahl durchzuführen oder weitere Schadstoffkonzentrationen zu untersuchen. Eine Aufstockung der Experimente war jedoch zum einen dadurch begrenzt, dass in der 2D-Gelelektrophorese lediglich zwölf Gele gleichzeitig behandelt werden konnten und zum anderen durch die Zellausbeute bei der Isolierung. Um pro Gel eine ausreichend hohe Proteinmenge für die 2D-Gelelektrophorese einsetzen zu können, musste jedes Gel mit einer Proteinmenge von 450 µg beladen werden. Diese Proteinmenge wurde bei einer Zellzahl von $3,8 \times 10^6$ Zellen pro Zellkulturflasche (Wachstumsfläche: 25 cm²) erreicht. Für einen vollständigen Inkubationsansatz, bestehend aus neun Zellkulturflaschen, wird somit eine Zellzahl von $3,5 \times 10^7$ Zellen benötigt. Diese Zellausbeute ist realistisch. Mit einer höheren Ausbeute wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gerechnet, da für die Isolierung der Seehund-Hepatozyten lediglich eine limitierte Menge an Lebergewebe zur Verfügung stand.

Die Schadstoffgabe erfolgte an Tag 2 nach der Isolierung, um den Zellen zuvor eine ausreichende Akklimatisierung an die Kulturbedingungen zu ermöglichen. Eine hinreichende Gewöhnung der Zellen und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten sind notwendig für den Erhalt des differenzierten Phänotyps sowie für die Expression und Induktion von Enzymen des Cytochrom P450-Enzymkomplexes (Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983). Als Dauer für die Akklimatisierung wird bei humanen Hepatozyten eine Zeitspanne von 24-48 h angegeben (Corlu *et al.*, 1991; Maurel, 1996). Mit fortschreitender Kultivierungsdauer konnte in der Literatur eine Verringerung der Enzymaktivität bei Hepatozyten festgestellt werden (Gómez-Lechón *et al.*, 1990; Skett, 1994; Bayliss und Somers, 2005). Durch den Verlust von Enzymaktivität kommt es zu einem Abweichen der Zellen von der *in vivo* Situation, was für die Fragestellung in der vorliegenden Arbeit nicht erwünscht ist.

Der mögliche Verlust der Enzymaktivität spielte ebenfalls eine Rolle bei der Wahl der Inkubationsdauer. Als Dauer für die Schadstoffinkubation wurde ein Zeitraum von 24 h festgesetzt. Durch die insgesamt kurze Kultivierungszeit von 72 h (von der Isolierung bis zur Proteinextraktion) sollte ein Absinken der Enzymaktivität verhindert werden. Eine Inkubationszeit von 24 h wird in zahlreichen Studien an HepG2-Zellen und primären Hepatozyten eingesetzt, um die Auswirkungen einer PCB-Inkubation zu analysieren. In den Studien wurde sowohl die Zytotoxizität der PCBs evaluiert als auch die Induktion von Cytochrom P450 Enzymen untersucht (Thomé *et al.*, 1995; Sanderson *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2006; Aly und Domenech, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Eine Inkubationszeit von 24 h wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit als geeignet angesehen.

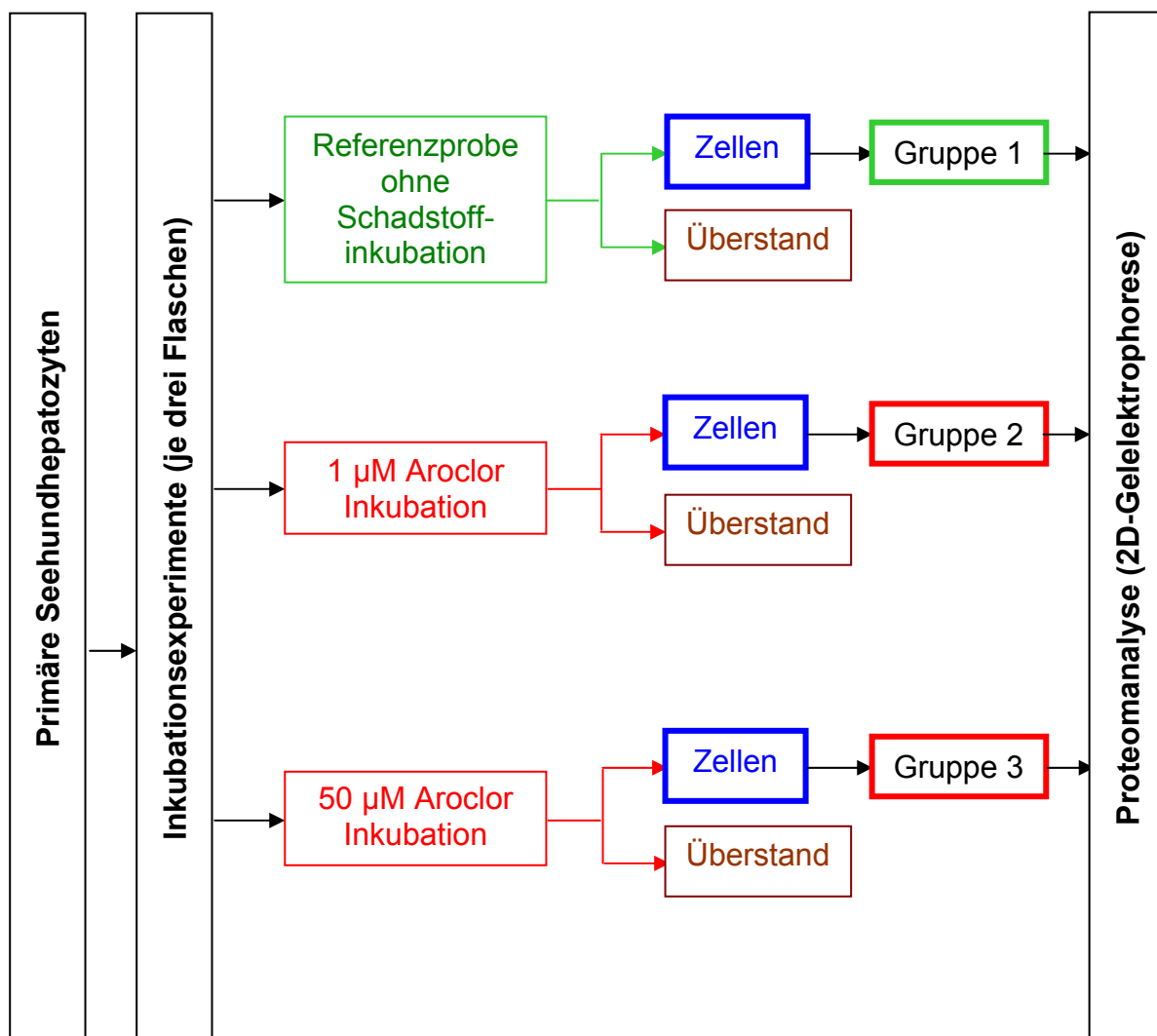


Abbildung 3-8: Übersicht über einen vollständigen Inkubationsansatz mit PCB (nach Behr 2008a)

3.9.1 Inkubationsexperimente mit PCB

Die von Vagts (1992) gemessenen PCB-Mengen (48-51.900 µg/kg Fett, Vagts, 1992) bei Seehunden aus der Nordsee dienten als Grundlage für die Berechnung der eingesetzten Schadstoffmengen (genaue Berechnung s. Kapitel 4.10). Für die Inkubationsexperimente wurden die Konzentrationen 1 µM und 50 µM PCB verwendet. Die gewählten PCB-Konzentrationen sind damit zwar etwas höher als die berechneten Schadstoffmengen (0,023 µM bzw. 24,9 µM), sie liegen aber in einer vergleichbaren Größenordnung. Zudem ermöglichen sie eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Werten aus der Literatur, da diese Konzentrationen häufig in Toxizitätsstudien an primären Hepatozyten eingesetzt werden (Kremers *et al.*, 1993; Dubois *et al.*, 1995; Aly *et al.*, 2009).

3.9.2 Inkubationsexperimente mit PFOS

Die Inkubationsexperimente mit PFOS wurden mit 30 nM bzw. 300 nM PFOS durchgeführt, da die mittleren PFOS-Werte in Seehundlebern aus der Nordsee 100-1000 ng/g Nassgewicht (Ahrens *et al.*, 2009a) betragen (genaue Durchführung und Rechnung s. Kapitel 4.10).

3.10 Proteinextraktion

Im Anschluss an die Inkubationsexperimente erfolgte die Proteinextraktion. Bei der Wahl der Methode kam es u. a. darauf an, dass die Extraktion in möglichst wenigen Schritten abläuft, um das Risiko potentieller Veränderungen des Proteoms zu minimieren (Görg *et al.*, 2004). Des Weiteren war es wichtig, dass die Proteine in einem Extraktionspuffer extrahiert wurden, der direkt ohne weitere Behandlung für die 2D-Gelelektrophorese verwendet werden konnte. Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe ergaben, dass der Rehydrierungspuffer, der ebenfalls für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt wird, für die Proteinextraktion am besten geeignet ist (Behr, 2006; Kurenbach, 2008).

Die Bestandteile des Rehydrierungspuffers sind: Harnstoff, Ampholyte, CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat) und Bromphenolblau (Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers s. Tabelle 8-6 im Anhang). Harnstoff und CHAPS dienen dazu, die Proteine zu denaturieren und in Lösung zu bringen. Ampholyte stabilisieren während der isoelektrischen Fokussierung, dem ersten Schritt der 2D-Gelelektrophorese, den pH-Gradienten. Um den Fortschritt der isoelektrischen Fokussierung zu verfolgen, wird dem Puffer Bromphenolblau hinzugefügt (O'Farrell, 1975; Görg *et al.*, 2004). Die genaue Durchführung der Proteinextraktion wird in Kapitel 4.11 beschrieben.

3.11 Zusammenfassung des Zellkulturmodells

Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, artspezifische Biomarker für Seehunde zu identifizieren, die die Auswirkungen einer Schadstoffbelastung anzeigen. Um artspezifische Biomarker ermitteln zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das vorgestellte Zellkulturmodell entwickelt.

Das Prinzip des Zellkulturmodells begründet sich darauf, dass Schadstoffe zu Veränderungen im Proteinexpressionsmuster führen, die mittels 2D-Gelelektrophorese dargestellt werden können (Brenz *et al.*, 2004). Die Proteine, deren Expression nach Schadstoffeinfluss verändert ist, können mittels massenspektrometrischer Methoden (MALDI-TOF/TOF-MS, 4000 QTrap) analysiert werden. Die Arbeiten auf Proteomebene waren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, sondern erfolgen in weiterführenden Studien in der Arbeitsgruppe.

Mit Hilfe des Zellkulturmodells sollen Aussagen zum Fremdstoffmetabolismus getroffen werden. Hierfür ist es wichtig, dass die verwendeten Zellen den *in vivo* Zustand möglichst gut widerspiegeln. Deshalb wurden im Zellkulturmodell primäre Seehund-Hepatozyten eingesetzt (s. Kapitel 3.2.1). Da in der Literatur bisher noch keine Isolierung primärer Seehund-Hepatozyten beschrieben wurde, musste zunächst eine geeignete Isolierungsmethode etabliert werden (s. Kapitel 3.3). An die Isolierungsmethode waren einige Bedingungen geknüpft. Sie musste die Isolierung vitaler Hepatozyten aus frischtoten Seehunden in ausreichender Menge ermöglichen, wobei für die Isolierung keine ganzen Organe sondern nur Leberproben zu Verfügung standen (s. Kapitel 3.3). Des Weiteren musste die Isolierungsmethode gut

vorzubereiten und schnell einsatzbereit sein, da die Beprobungen der Seehunde nicht planbar war. Die Parameter bei der Kultivierung der Hepatozyten mussten so gewählt sein, dass zum einen eine optimale Kultivierung der Zellen möglich war und zum anderen mussten die Proben mit der sich anschließenden Proteomanalyse kompatibel sein. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit einer Zellzahl von $3,8 \times 10^6$ Zellen pro Zellkulturflasche kultiviert (Wachstumsfläche: 25 cm^2) (s. Kapitel 3.3). Die Kultivierung der Zellen musste in serumfreiem Medium erfolgen, damit die Proteine aus dem Serum nicht zu einer Überlagerung relevanter Proteine in der 2D-Gelelektrophorese führen. (s. Kapitel 3.3). Um die Hepatozyten für das Zellkulturmodell einsetzen zu können, müssen sie ihre Vitalität auch nach der Isolierung und während der Kultivierung beibehalten. Dies wurde mit den drei Vitalitätstests XTT-, Harnstoff- und LDH-Test überprüft. Mit den genannten Vitalitätstests sollte außerdem untersucht werden, ob die in den Inkubationsexperimenten eingesetzten Schadstoffkonzentrationen die Vitalität der Zellen beeinflussen. Für das Zellkulturmodell ist es entscheidend, dass die Schadstoffe zwar eine Änderung auf Proteinebene hervorrufen, es aber nicht zu einem Absterben der Zellen oder anderen sichtbaren morphologischen Veränderungen kommt. In den Inkubationsexperimenten wurden die primären Seehund-Hepatozyten mit PCB und PFOS in umweltrelevanten Konzentrationen inkubiert (s. Kapitel 3.9 und 4.10). Die Verwendung von PCB für die Inkubationsexperimente ermöglicht eine Überprüfung der Funktionsweise des Zellkulturmodells (s. Kapitel 3.9). Nach Abschluss der Inkubationsexperimente erfolgte die Proteinextraktion. Hierbei war es wichtig, dass die extrahierten Proteine in einem Medium vorlagen, welches mit der 2D-Gelelektrophorese kompatibel ist (s. Kapitel 3.10).

Der zeitliche Ablauf der Hepatozyten-Kultivierung und der Vitalitätstests ist in Abbildung 3-9 schematisch dargestellt. Die Hepatozyten wurden insgesamt für 72 h kultiviert (Tag 0 – Tag 3). In dieser Zeit wurde alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem Aliquote des Zellkulturmediums für den Harnstoff- und den LDH-Test abgenommen wurden (genaue Durchführung s. Kapitel 4.5). Begleitend wurde in einer Mikrotiterplatte der XTT-Test durchgeführt. Die Schadstoffinkubation der Zellen wurde an Tag 2 durchgeführt. Nach 24 h wurden die Hepatozyten geerntet und die Proteine isoliert.

Das Zellkulturmodell weist einige Limitationen auf. Die Anzahl der Tiere, die pro Jahr beprobt werden können ist recht gering (ca. 10 Tiere). Bei den Tieren handelt es sich fast ausschließlich um erkrankte Tiere, was die Daten möglicherweise beeinflussen kann. Trotzdem können mit Hilfe des Zellkulturmodells wichtige Aussagen zum Schadstoffeinfluss auf Seehunde gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal Hepatozyten aus einem marinen Säugetier isoliert werden. Dadurch ist es erstmals möglich Studien durchzuführen, die die Auswirkungen einer Schadstoffbelastung direkt am Zielorgan (Leber) untersuchen.

Basierend auf der in der vorliegenden Arbeit etablierten Leberbiopsie Perfusion, wurde in der Arbeitsgruppe eine Diplomarbeit (Korff, 2010) durchgeführt. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde die Eignung des Zellkulturmodells evaluiert. Hierfür wurden primäre Seehund- und Schweine-Hepatozyten mit PCB und PFOS in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und mögliche toxische Effekte auf zellulärer Ebene untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden die eigenen Ergebnisse mit denen von Korff (2010) in Beziehung gesetzt.

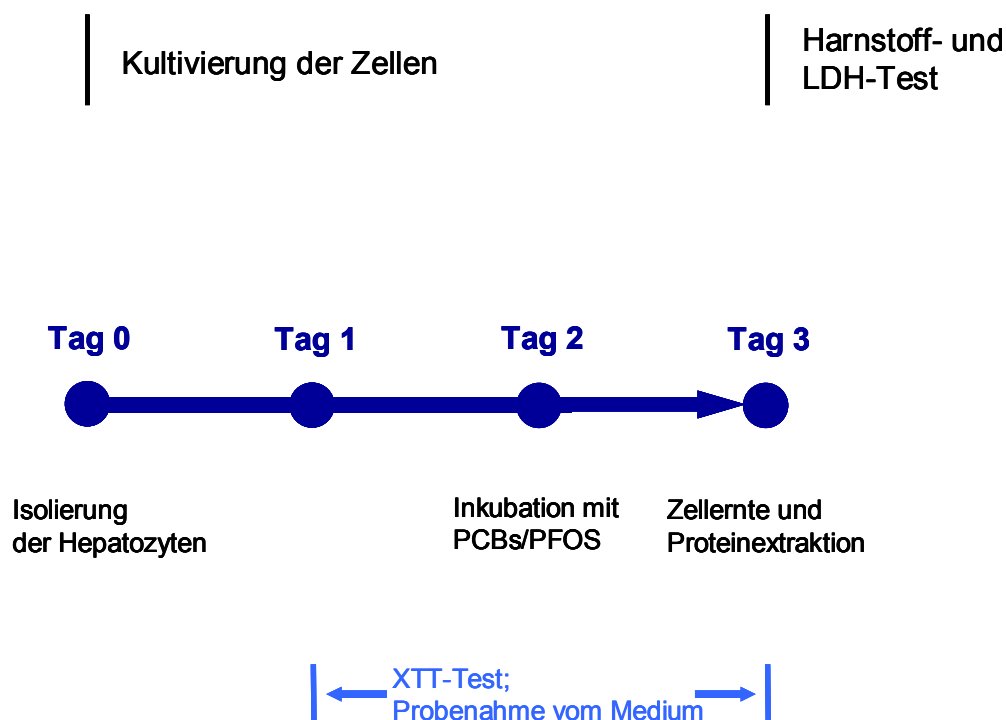


Abbildung 3-9: Schematische Darstellung der Hepatozyten Kultivierung (nach Korff, 2010)

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Chemikalien

| Substanz | Hersteller |
|--|-------------------|
| Adenosin | Sigma |
| Allopurinol | Sigma |
| Antibiotika (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) | Sigma |
| <i>Aroclor high concentration mixture</i> (1254, 1260, 1262) | Supelco |
| BioLyte | Biochrom |
| Bromphenolblau | Sigma |
| Calciumchlorid | Sigma |
| CHAPS | Fluka |
| <i>Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}</i> (LDH-Test) | Roche Diagnostics |
| Collagen | Serva |
| Collagenase NB4 und NB8 | Serva |
| Collagenase CLS IV | Biochrom |
| DMSO | Merck |
| DNase | Sigma |
| EDTA | Sigma |
| EMEM | Lonza |
| Ethanol | Merck |
| Fötale Kälberserum | PAA |
| Glucagon | Sigma |
| Glucoronidase | Sigma |
| Glucose | Sigma |
| Glutamin | Sigma |
| Harnstoff | Fluka |
| Hepatozyme-SFM | Gibco |
| HEPES | Sigma |
| Hypochlorid Lösung | Sigma |
| Insulin | Sigma |
| Isooctan | Merck |
| Isopropanol | Merck |
| Kaliumchlorid | Merck |
| KOH | Merck |
| K ₂ HPO ₄ | Merck |

Material und Methoden

| | |
|-------------------------|-------------------|
| Lactobionsäure | Fluka |
| MgSO ₄ | Sigma |
| NaOH | Sigma |
| Natriumchlorid | Merck |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck |
| Nitroprusside Lösung | Sigma |
| Opti MEM | Gibco |
| PBS | Gibco |
| PEG | Sigma |
| PFOS | ABCR |
| Prednisolon | Sigma |
| Pursept A | Merz |
| Raffinose | Sigma |
| RPMI 1640 | Lonza |
| Trypanblau | Fluka |
| Trypsin-EDTA 25% | Gibco |
| Urease | Sigma |
| WME | Lonza |
| XTT-Kit | Roche Diagnostics |

4.2 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial

4.2.1 Verwendete Geräte in Geesthacht

| Geräte | Hersteller |
|--|---|
| Analysenwaage AG285 | Mettler Toledo |
| Aquarienpumpe Elite 801 | Elite |
| Arbeitsbank mit Abzug | ABB |
| Aufrechtmikroskop BX51/BX52 | Olympus |
| Autoklav | Systemec |
| Dampfsterilisator Varioklav | Thermo scientific |
| Blockthermostat TCR 200 | Roth |
| Büchner Trichter | Schott Duran |
| CO ₂ -Inkubator | Sanyo |
| Magnetrührer MR 3001 | Heidolph |
| Mehrkanalpipette | Plastibrand |
| Mikrobiologische Sicherheitswerkbank der Klasse II | Biowizard |
| Minishaker MS 2 | Ika® |
| pH-Meter | Knick |
| Plattenphotometer 1420 Multilabel Counter Victor | Perkin Elmer |
| Reinstwasser-Systeme | SG Wasseraufbereitung u. Regenerierstation, Millipore |
| Schlauchpumpe | Ismatec |
| Ultraschalldesintegrator | Heinemann |
| Umkehrmikroskop IX71/IX51 | Olympus |

4.2.2 Verwendete Geräte in Büsum

| Geräte | Hersteller |
|--|------------|
| Autoklav 3850 EL | Systemec |
| Analysenwaage R300 S | Sartorius |
| CO ₂ -Inkubator MCO-17AC | Sanyo |
| Camedia Digital Camera C4040ZOOM | Olympus |
| Mikroskop CKX41 | Olympus |
| Reinstwasser-System Milli-Q Biocel A10 | Millipore |
| pH-Meter | inoLab |
| Sterilbank der Klasse II | Nuaire |

Material und Methoden

| Geräte | Hersteller |
|--|-------------------|
| Photometer Multiscan Ascent (Model Nr. 354) | Labsystems |
| Vortex-Mixer 7-2020 | NeoLab |
| Wasserbad (DC1) | Haake |
| Mehrkanalpipette | Plastibrand |
| Zentrifuge Multifuge 3 S-R | Heraeus |
| Ultraschalldesintegrator | Heinemann |
| Umkehrmikroskop IX71/IX51 | Olympus |
| Variable Eppendorf-Pipetten der Volumina 0,1-2,5µl, 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl | Eppendorf |

4.3 Verbrauchsmaterial

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|--|---------------------|
| Mikrotiterplatten (96 wells, steril, PE) | Sarstedt |
| Petrischalen (Ø 60mm, steril, PE) | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße: 0,5; 1; 2 ml | Eppendorf, Sarstedt |
| Sterilfilter Express Plus (0,22 µm) | Milipore |
| Serologische Pipetten (5; 10; 25 ml) | TPP |
| Zellkulturflaschen (unbehandelt und cell ⁺ , 25 cm ² , PE) | Sarstedt |
| Zellsiebe (Maschengröße 100 µm, Nylon) | BD |
| Zentrifugenröhrchen (15; 50 ml) | Sarstedt |

4.4 Probenahme

4.4.1 Seehunde

Alle in dieser Arbeit untersuchten Seehunde stammten aus der deutschen Bucht. Insgesamt wurden 23 Tiere beprobt. Davon wurden 16 Tiere an verschiedenen Stellen im Nationalpark Schleswig-Holsteinisches Wattenmeer gefunden. 7 Tiere kamen von der Insel Helgoland. Bei allen Tieren handelte es sich ausschließlich um solche Individuen, die aufgrund ihres sehr schlechten Gesundheitszustandes von Seehundjägern oder vom Tierarzt getötet werden mussten (Amtsblatt Schleswig-Holstein, 1997). Im Nationalpark Schleswig-Holsteinisches Wattenmeer gibt es vom Nationalparkamt beauftragte Seehundjäger, die kranke und verletzte Seehunde tierschutzgerecht töten, wenn eine Überlebenschance nicht gegeben ist. In Fällen, in denen das nicht zweifelsfrei entschieden werden kann wird ein Tierarzt hinzugezogen, der die Tiere ggf. einschläfert. Als überlebensfähig eingestufte Heuler werden zur Rehabilitation in die Seehundstation Friedrichskoog gebracht. Da sie sich häufig in einem schlechten gesundheitlichen Zustand befinden, versterben vereinzelt Tiere während der Rehabilitation. Solche Tiere wurden ebenfalls in der vorliegenden Arbeit zur Isolierung der Seehund-Hepatozyten verwendet. Die Leberentnahme und sämtliche Zellkulturarbeiten wurden in den Laboren des FTZ in Büsum durchgeführt. Eine Übersicht über die beprobten Tiere gibt die Tabelle 4-1. Alle Tiere wurden am FTZ in der Arbeitsgruppe von PD Ursula Siebert „Ökologie der Vögel und Säugetiere“ vollständig seziiert (Siebert *et al.*, 2007) und in Zusammenarbeit mit der Tierärztlichen Hochschule in Hannover pathologisch untersucht (Übersicht über die Befunde s. Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3).

Tabelle 4-1: Beprobte Seehunde 2006-2008

| Tier-nummer | Datum | Geschlecht | Alter (geschätzt) | Fundort | Todesumstände | Isolierungsmethode |
|-------------|------------|------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| Pv 1 | 13.06.2006 | ♀ | < 1 Monat | in Seehundst. geboren | in Seehundst. gestorben | EpK, GdP |
| Pv 2 | 22.06.2006 | ♂ | < 1 Monat | St. Peter-Ording | in Seehundst. gestorben | EpK, GdP |
| Pv 3 | 23.06.2006 | ♀ | nicht bestimmt | nicht bekannt | eingeschläfert | GdS, EpK, GdP |
| Pv 4 | 27.06.2006 | ♀ | < 1 Monat | Eider-sperwerk | eingeschläfert | GdS, EpK, GdP |
| Pv 5 | 03.01.2007 | ♂ | 8 Monate | Eider-sperwerk | geschossen | GdM |
| Pv 6 | 15.02.2007 | ♂ | 9 Monate | Helgoland | geschossen | GdM |
| Pv 7 | 12.03.2007 | ♂ | 11 Monate | Helgoland | geschossen | GdM |
| Pv 8 | 17.06.2007 | ♀ | 1 Monat | Hörnum | in Seehundst. gestorben | GdM |
| Pv 9 | 27.06.2007 | ♂ | 1 Monat | Pellworm | eingeschläfert | GdM |
| Pv 10 | 11.07.2007 | ♂ | 1 Monat | List | in Seehundst. gestorben | GdM |
| Pv 11 | 26.11.2007 | ♂ | 5 Monate | Helgoland | geschossen | GdM |
| Pv 12 | 05.12.2007 | ♀ | 6 Monate | Helgoland | geschossen | GdM |
| Pv 13 | 05.12.2007 | ♂ | 6 Monate | Helgoland | geschossen | GdM |
| Pv 14 | 29.01.2008 | ♀ | 7 Monate | Helgoland | geschossen | LbP |
| Pv 15 | 29.01.2008 | ♂ | 7 Monate | Helgoland | geschossen | LbP |
| Pv 16 | 31.01.2008 | ♂ | 7 Monate | Friedrichs-koog | eingeschläfert | LbP |
| Pv 17 | 14.02.2008 | ♂ | 8 Monate | List | geschossen | LbP |
| Pv 18 | 13.06.2008 | ♂ | < 1 Monat | Büsum | in Seehundst. gestorben | LbP |

GdS: Gewebedissoziation mittels Sieb; EpK: Explantat Kultur; GdP: Gewebedissoziation in PBS; GdM: Gewebedissoziation in Medium; LbP: Leberbiopsie Perfusion

Fortsetzung Tabelle 4-1: Beprobte Seehunde 2006-2008

| Tiernummer | Datum | Geschlecht | Alter (geschätzt) | Fundort | Todesumstände | Isolierungsmethode |
|------------|------------|------------|-------------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| Pv 19 | 14.06.2008 | ♂ | < 1 Monat | Norderheverkoog | in Seehundst. gestorben | LbP |
| Pv 20 | 17.06.2008 | ♀ | < 1 Monat | St. Peter-Ording | eingeschläfert | LbP |
| Pv 21 | 18.06.2008 | ♂ | < 1 Monat | Pellworm | eingeschläfert | LbP |
| Pv 22 | 27.06.2008 | ♂ | < 1 Monat | Büsum | in Seehundst. gestorben | LbP |
| Pv 23 | 02.09.2008 | ♂ | 3 Monate | Süderoog | geschossen | LbP |

GdS: Gewebedissoziation mittels Sieb; EpK: Explantat Kultur; GdP: Gewebedissoziation in PBS; GdM: Gewebedissoziation in Medium; LbP: Leberbiopsie Perfusion

Zur Entnahme der Leberproben wurden die Tiere ausgestreckt auf den Rücken gelegt und die Bauchseite mit Desinfektionsmittel gereinigt. Auf der rechten Körperhälfte wurde ca. 2 cm rechts von der gedachten Mittellinie aus Brustbein und Nabel unterhalb der Rippen mittels Skalpell vorsichtig (ohne das Bauchfell zu verletzen) ein ca. 20 cm langer Schnitt gesetzt (s. Abbildung 4-1). Vor dem Durchtrennen des Bauchfells wurde eine neue, sterile Skalpellklinge verwendet. Der Schnitt wurde so erweitert und mit sterilen Klemmen gespreizt, dass die Leber gut sichtbar war. Mit einer neuen, sterilen Skalpellklinge und einer sterilen Pinzette wurde das Ende eines Leberlappens entnommen und in eiskaltes Zellkulturmedium oder Präperfusionspuffer (Zusammensetzung s. Tabelle 8-2 im Anhang) überführt.

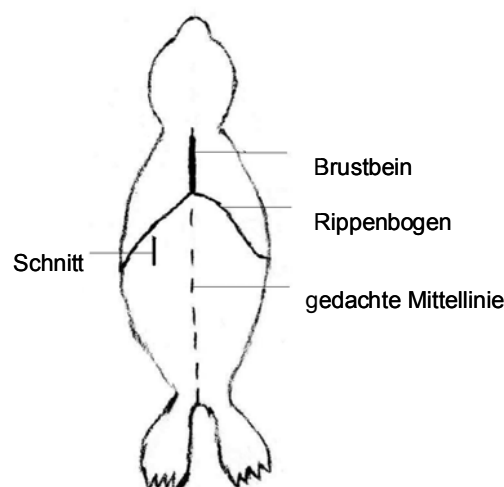


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Leberentnahme

4.4.2 Schweine

Zur Isolierung der Schweine-Hepatozyten wurde Leber von frisch geschlachteten, ca. 4 Monate alten Kreuzungsschweinen (DanBred x Piétran) verwendet. Die Leber wurde in einer Schlachtereier bezogen und direkt nach der Schlachtung abgeholt. Der Transport erfolgte in Medium, Präperfusionspuffer oder in UW-Lösung auf Eis (s Tabelle 4-2). Die Tabelle 4-2 gibt einen Überblick über die beprobten Schweine.

Tabelle 4-2: Beprobte Schweine

| Tiernummer | Datum | Geschlecht | Zeitspanne zwischen Leberentnahme und Perfusion | Transportmedium | Isolierungsmethode |
|------------|-------------|------------|---|---------------------|--------------------|
| S 1 | 27.11.2006 | n.b. | 90 | OptiMEM | GdM |
| S 3 | 07.05.2007 | n.b. | 95 | OptiMEM | GdM |
| S 4 | 21.05.2007 | n.b. | 100 | OptiMEM | GdM |
| S 6 | 10.09.2007 | n.b. | 95 | OptiMEM | GdM |
| S 8 | 07.01.2008 | n.b. | 90 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 9 | 14.01.2008 | n.b. | 90 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 10 | 21.01. 2008 | n.b. | 90 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 11 | 28.01. 2008 | ♀ | 90 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 12 | 25.02. 2008 | ♀ | 90 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 15 | 14.04. 2008 | ♂ | 80 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 20 | 01.09. 2008 | ♀ | 120 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 21 | 27.10. 2008 | ♀ | 90 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 22 | 03.11. 2008 | ♂ | 105 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 23 | 10.11. 2008 | ♂ | 100 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 24 | 17.11. 2008 | ♂ | 90 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 25 | 08.12. 2008 | ♀ | 95 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 26 | 15.12. 2008 | ♀ | 105 | Präperfusionspuffer | LbP |
| S 27 | 12.01. 2009 | ♀ | 95 | Präperfusionspuffer | GdM, LbP |
| S 28 | 19.01. 2009 | ♀ | 80 | Präperfusionspuffer | GdM, LbP |
| S 29 | 26.01. 2009 | ♂ | 100 | Präperfusionspuffer | GdM, LbP |

n.b.= nicht bestimmt

4.5 Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten

Zur Isolierung der primären Hepatozyten wurden verschiedene Methoden getestet (s. Kapitel 3.3). Die Tabellen 4.1 und 4.2 geben Aufschluss darüber, mit welcher Methode die Hepatozyten aus den jeweiligen Tieren isoliert wurden. In den folgenden Kapiteln wird die genaue Durchführung der verschiedenen Isolierungsmethoden beschrieben. Die Isolierung der Seehund- und Schweine-Hepatozyten erfolgte analog und wird daher zusammen dargestellt. Zur Isolierung der Schweine-Hepatozyten wurden allerdings nur die beiden Methoden Gewebedissoziation in Medium und die Leberbiopsie Perfusion verwendet. Im Rahmen der Methoden-etablierung wurden die Hepatozyten in unterschiedlichen Zellzahlen ausgesät.

4.5.1 Mechanische Isolierungsmethoden

4.5.1.1 Gewebedissoziation mittels Sieb (GdS)

Ein kleines Stück der Seehundleber wurde in eine sterile Petrischale mit 5 ml PBS (1x) überführt und klein geschnitten (ca. 5x5 mm). Die Leberstücke wurden anschließend sehr vorsichtig durch ein steriles Rundsieb (Maschengröße: 1 mm) gestrichen (Kaltenbach *et al.*, 1954; Freshney, 2005). Hierfür wurde der Kolben einer sterilen 10 ml Einmalspritze als Stempel verwendet. Die Zellen wurden mit ca. 10 ml Opti MEM Medium (+ 10% FCS, + 1% Antibiotikum) in eine Petrischale gespült, anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 50 g und 20°C für 5 min zentrifugiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie in Kapitel 4.6 beschrieben. Zur Kultivierung wurden Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm²) verwendet und die Zellen mit einer Zelldichte von 2,7x10⁶ bzw. 5,3x10⁶ Zellen pro Flasche in 10 ml Opti MEM Medium (s. o.) ausgesät. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit 6 Wochen kultiviert. Eine mikroskopische Begutachtung erfolgte täglich (Ergebnisse s. Kapitel 5.3.1.1).

4.5.1.2 Explantat-Kultur (EpK)

In Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm²) wurden mittels einer heißen, stumpfen Pinzette acht kleine Vertiefungen geschmolzen. In jede Vertiefung wurde ein kleines Leberstück (Kantenlänge ca. 3x3 mm) gelegt und sehr vorsichtig mit 4 ml Medium überschichtet (Opti MEM, + 10% FCS, + 1% Antibiotikum) (Freshney, 2005). Die Stücke wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit 3-6 Wochen kultiviert. Nach 72 h wurde 2 ml frisches Medium hinzugefügt. Alle 7 Tage erfolgten ein Mediumwechsel und eine mikroskopische Betrachtung der Kulturen. Die mikroskopische Betrachtung erfolgte nicht täglich, um ein mögliches ablösen der Explantate vom Untergrund zu vermeiden (Ergebnisse s. Kapitel 5.3.1.2).

4.5.2 Enzymatische Isolierungsmethoden

4.5.2.1 Gewebedissoziation in PBS (GdP)

Ein Stück Seehundleber wurde wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben entnommen und in ein Becherglas mit kalter PBS (1x, 4°C) überführt. Das Leberstück wurde mehrmals mit PBS (1x) gewaschen, bis keine Blutreste mehr vorhanden waren. Anschließend wurde das Stück mittels Skalpell und Schere in möglichst kleine Stücke (Kantenlänge ca. 3x3 mm) geschnitten und in eine saubere Petrischale mit 5 ml kalter PBS (1x) überführt. Danach wurden 500 µl einer 2,5%igen (w/v) Collagenase-Lösung (NB8) hinzupipettiert und die Leberstücke bei 37°C für 5 min inkubiert (*Integra Biosciences*, 2003). Das Gemisch wurde mehrmals mit einer 10 ml Pipette resuspendiert, um die Zellen aus dem Gewebeverband herauszulösen und in den Puffer zu spülen. Der Collagenase-Verdau wurde unter dem Umkehrmikroskop begutachtet und ggf. wiederholt. Die Petrischale wurde so schräg gehalten, dass die Zellsuspension mit einer Pipette abgenommen werden konnte. Verbliebene Gewebestücke in der Suspension wurden über Nylongaze abfiltriert (Maschenweite: 100 µm). Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 50 g und 20°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand mit Zelltrümmern und Nichtparenchymzellen wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium

(Opti MEM, + 10% FCS, + 1% Antibiotikum) aufgenommen und zweimal gewaschen. Die Zellzahl wurde wie in Kapitel 4.6 beschrieben mit Trypanblau bestimmt. Die Zellen wurden mit unterschiedlicher Zelldichte ($3,25 \times 10^5$; $7,8 \times 10^5$; $0,7 \times 10^6$; $1,4 \times 10^6$ pro Flasche) in Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm^2) in Hepatozyme-SFM Medium (+ 1% Antibiotikum + 2 mM Glutamin) ausgesät. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C , 95% O_2 , 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit 4 Tage kultiviert. Die Hepatozyten-Kulturen wurden alle 24 h mikroskopisch begutachtet (Ergebnisse s. Kapitel 5.3.2.1).

4.5.2.2 Gewebedissoziation in Medium (GdM)

Ein Stück Seehund- bzw. Schweineleber (ca. $5 \times 5 \text{ cm}$) wurde wie in 4.4 beschrieben entnommen und in ein Becherglas mit kaltem Medium (EMEM + 1% Antibiotikum) überführt. Das Leberstück wurde durch Waschen mit Medium vollständig von Blutresten befreit. Anschließend wurde das Stück mittels Skalpell und Schere in einer sterilen Petrischale in kleine Würfel (Kantenlänge ca. $3 \times 3 \text{ mm}$) zerschnitten, wobei die Stücke während der gesamten Bearbeitung dauerhaft mit kaltem Medium überschichtet waren. Vier sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden mit je 10 ml kaltem Medium befüllt (Zusatz: 2 mM CaCl_2). Die Stücke wurden anschließend auf die 4 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, so dass sich in jedem Röhrchen ca. 5 g Lebergewebe befanden und auf Eis gestellt (Spotorno *et al.*, 2006). Nach Zugabe von 500 μl Collagenase (NB8: 0,8 U/ml) wurden die Röhrchen für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Suspensionen wurden über Zellsiebe oder Nylongaze (Maschengröße: $100 \mu\text{m}$) filtriert und bei 50 g und 20°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 3 ml Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie in Kapitel 4.6 beschrieben.

Die Hepatozyten wurden in unterschiedlicher Zellzahl ($1,2 \times 10^5$ - $3,8 \times 10^6$) in Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm^2) ausgesät. Als Kultivierungsmedium wurde Hepatozyme-SFM (+ 1% Antibiotikum und 2 mM Glutamin) verwendet. Die Zellen wurden 4 Tage in einem Brutschrank bei 37°C , 95% O_2 , 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 24 h erfolgte eine mikroskopische Begutachtung der Hepatozyten (Ergebnisse s. Kapitel 5.3.2.2).

4.5.2.3 Leberbiopsie Perfusion (LbP)

Die Leberbiopsie Perfusion wurde zur Isolierung primärer Seehund- und Schweine-Hepatozyten verwendet und für beide Spezies analog durchgeführt. Nach dem Transport der Leber wurde das Ende eines intakten Leberlappens abgeschnitten und gewogen (durchschnittlich 70 g für beide Spezies). Es wurde darauf geachtet, dass eine glatte Schnittkante entstand und mindestens drei große Gefäßöffnungen sichtbar waren. Da die Leberlappen der Seehunde deutlich kleiner waren als die der Schweine, wurden bei den Seehunden in der Regel zwei Leberlappen für die Isolierung verwendet. Die Isolierung wurde in einer Perfusionsapparatur durchgeführt (s. Abbildung 4-2), die in Anlehnung an die Apparatur von Christiansen (2000) entwickelt wurde. Die Leberbiopsie Perfusion besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt (Präperfusion) wird das Leberstück mit einem calcium- und magnesiumfreiem Krebs-Ringer-Puffer entblutet. Anschließend erfolgt in der Perfusion die Auflösung des Gewebeverbandes mittels collagenasehaltigen Krebs-Ringer-Puffers. Die Isolierung erfolgte in einer Zwei-Stufen-Perfusion nach der von Christiansen (2000) und Fröhlich (2004) modifizierten Methode, die in Anlehnung an Reese und Byard (1981) entwickelt wurde.

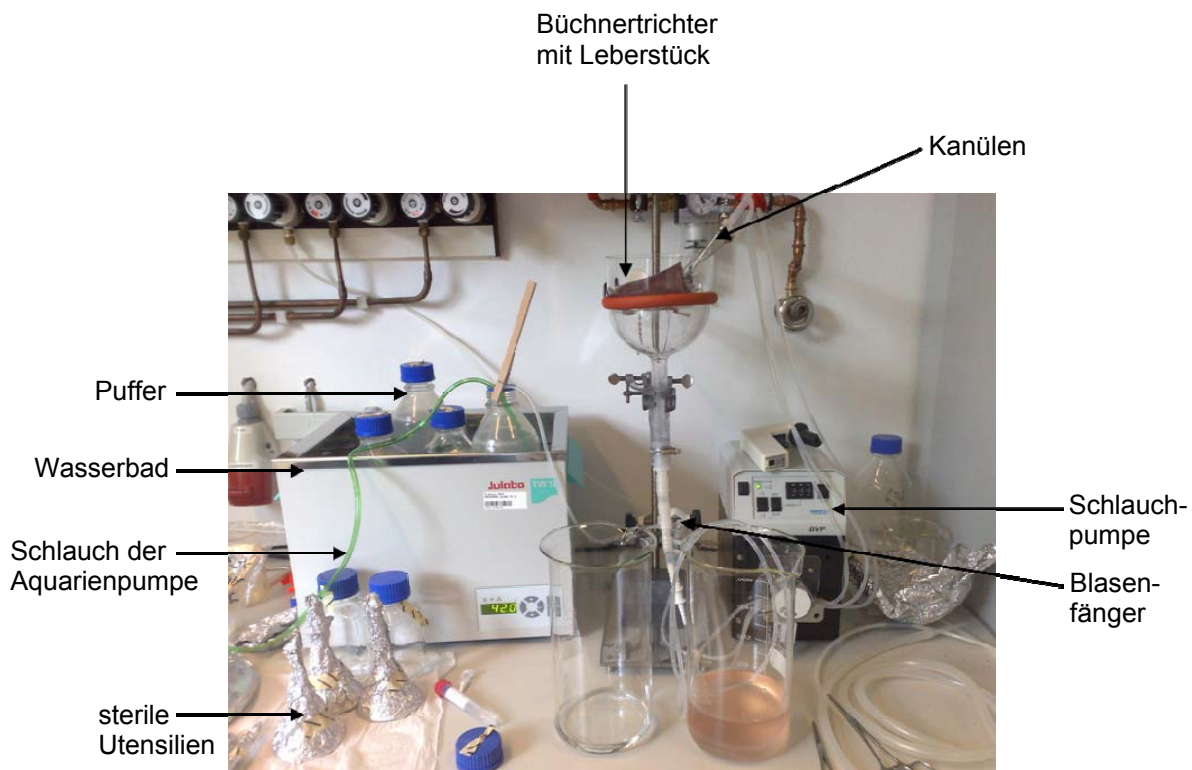


Abbildung 4-2: Perfusionsapparatur

Präperfusion

Vor Beginn der Perfusion wurden die benötigten Puffer im Wasserbad auf 42°C vorgewärmt und die gesamte Anlage mit ca. 200 ml Präperfusionspuffer gespült (Zusammensetzung: s. Tabelle 8-2 im Anhang). Anschließend wurde das Leberstück in den Büchnertrichter gelegt (s. Abbildung 4-2) und die Kanülen in den Gefäßöffnungen platziert (s. Abbildung 4-3). Waren mehr als drei große Öffnungen vorhanden, wurde die Position der Kanülen im Laufe des Experimentes mehrmals gewechselt, um ein möglichst vollständiges Durchspülen des Gewebes zu erreichen. Das Leberstück wurde zunächst mit 1,5 - 2 Litern Präperfusionspuffer so lange gespült (ca. 35 min) bis das Leberstück vollständig entblutet war. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde das Leberstück von Zeit zu Zeit mit warmem Präperfusionspuffer übergossen. Damit sich der Puffer möglichst gleichmäßig im Leberstück verteilt wurde es regelmäßig mit der Hand massiert. Der bluthaltige Puffer wurde nach dem Austritt aus der Leber verworfen. Die Durchflussrate betrug pro Kanüle 12 ml/min. Die Temperatur des Wasserbades wurde so eingestellt, dass der Puffer beim Austritt aus den Kanülen eine Temperatur von 37°C hatte (Wasserbad:

40-42°C). Während der Präperfusion wurde der Puffer mit einer Aquariumpumpe mit Raumluft begast. Es ist äußerst wichtig, dass sich zu keinem Zeitpunkt Luftblasen im System befinden und in das Leberstück gelangen. Um dies zu gewährleisten, war vor den Knopfkanülen ein Blasenfänger eingebaut. Gleichzeitig wurde das System während der gesamten Versuchsdauer überwacht und evtl. auftretende Blasen entfernt. Die Präperfusion wurde erst beendet, wenn das Leberstück vollständig entblutet war was sich durch eine gleichmäßig helle Färbung erkennen ließ (Abbildung 4-3).

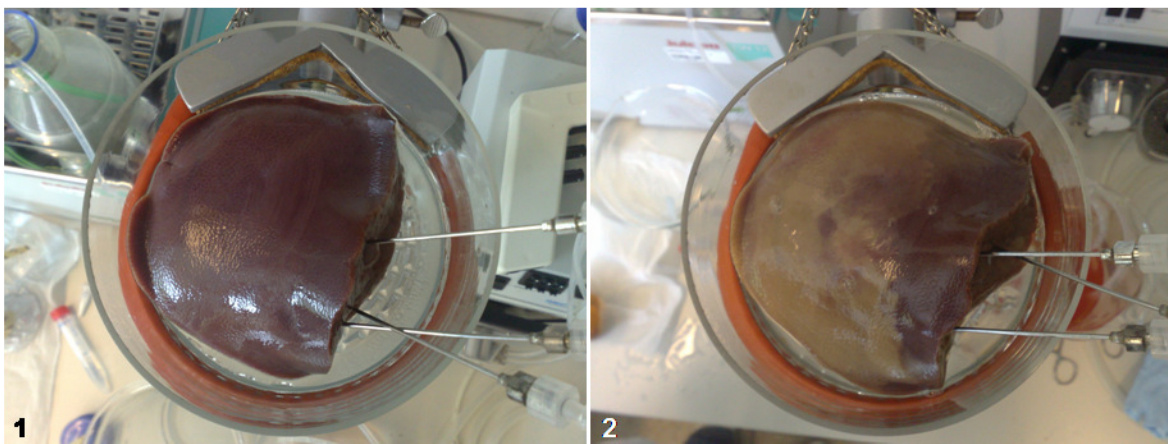


Abbildung 4-3: In der Perfusionsapparatur platziertes Stück einer Schweineleber vor der Präperfusion (1) und nach Abschluss derselbigen (2)

Perfusion

Nach der Präperfusion wurde das Leberstück zunächst für 5 min mit ca. 150 ml Perfusionspuffer (ohne Collagenase; Zusammensetzung s. Tabellen 8-1 und 8-3 im Anhang) gespült, wobei das Perfusat verworfen wurde. An diesen Schritt schloss sich die Perfusion mit dem Collagenasehaltigen Perfusionspuffer an (150 ml; Zusammensetzung s. Tabelle 8-3). Die Zu- und Ableitung des Puffers wurde dabei so geschaltet, dass ein rezirkulierendes System entstand. Die Dauer der Perfusion (ca. 20 min) richtete sich nach der Konsistenz des Gewebes und wurde abgebrochen, sobald das Gewebe angeschwollen war und sich weich anfühlte. Das Leberstück wurde in eine große Petrischale überführt, die mit ca. 80 ml DNase-haltigem Perfusionspuffer gefüllt war (Zusammensetzung s. Tabelle 8-3). Mit einem sterilen Skalpell wurde das Leberstück an verschiedenen Stellen aufgeschnitten. Hierdurch

gelangten die vereinzelt Zellen in den Puffer. Die erhaltene Zellsuspension wurde über Nylongaze mit einer Maschenweite von 100 µm filtriert (über Zellsiebe oder mit Nylongaze ausgekleidete Glastrichter). Die Suspension wurde gleichmäßig auf vier sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Ab diesem Schritt wurden alle folgenden Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Aufreinigung der Hepatozyten

Die Zellsuspension wurde bei 50 g und 20°C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in jeweils 10 ml DNase-haltigem Perfusionspuffer aufgenommen. Insgesamt wurden drei Waschschriffe durchgeführt, wobei nach jedem Schritt der Inhalt aus zwei Röhrchen vereinigt wurde, bis sich die gesamte Zellsuspension in einem Röhrchen befand. Es schloss sich ein letzter Waschschriff in vorgewärmtem (37°C) WME an (Zusammensetzung s. Tabelle 8-4 und 8-5). Das Pellet wurde erneut in 10 ml Medium aufgenommen und die Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer 10 ml Pipette vereinzelt. Die Bestimmung der Vitalität und Ausbeute erfolgte mit Trypanblau wie in Kapitel 4.6 beschrieben.

Kultivierung der Hepatozyten

Die Zellen wurden in collagenbeschichtete Zellkulturflaschen (s. Kapitel 4.7; Wachstumsfläche: 25 cm²) mit 3,8x10⁶ Zellen pro Flasche in 10 ml WME (inklusive Zusätze) (s. Tabelle 8-4 und 8-5) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im CO₂-Brutschrank (Seehund-Hepatozyten). Die Schweine-Hepatozyten wurden analog kultiviert, jedoch mit unterschiedlichen Zellzahlen (1,6x10⁶ und 3,8x10⁶). Der Kultivierungszeitraum betrug 4-14 Tage.

Pro Leber wurden idealerweise 9 Zellkulturflaschen für die Inkubationsexperimente ausgesät (s. Kapitel 3.9 und 4.10). In einigen Fällen war die Ausbeute der Seehund-Hepatozyten jedoch zu gering (Pv 9; Pv 18 und Pv 20) und es konnten lediglich 6 Zellkulturflaschen ausgesät werden. Zusätzlich wurden für den XTT-Test Hepatozyten mit 1x10⁴/well (in 100 µl WME) in eine Mikrotiterplatte (96 wells) ausgesät (s. Kapitel 4.9.1).

24 h nach der Isolierung wurden bei beiden Spezies Aliquote des Zellkulturmediums zur Bestimmung des LDH- und Harnstoff-Gehaltes abgenommen und bis zur Analyse

bei -20°C eingefroren (s. Kapitel 4.9.2 und 4.9.3). Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, der im Folgenden alle 24 h wiederholt wurde. Das neue WME enthielt kein FCS, wurde ansonsten aber nach derselben Rezeptur wie in Tabelle 8-4 und 8-5 beschrieben hergestellt.

4.6 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests wurde die Zellzahl bestimmt und die Vitalität der Zellsuspension ermittelt (Pappenheimer, 1917; Lindl und Gstrunthaler, 2008). Dafür wurde die Zellsuspension mit einer Pipette gründlich gemischt und 25 μl Zellsuspension abgenommen. Diese wurden mit 225 μl Trypanblau (0,4%ig) versetzt. Nach einer Minute Einwirkzeit wurden die Zellen nochmals gründlich resuspendiert und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt (Lindl und Gstrunthaler, 2008). Vitale Zellen bleiben ungefärbt, tote Zellen werden blau angefärbt.

Die Berechnung der Vitalität wurde mit folgender Formel bestimmt (Lindl und Gstrunthaler, 2008):

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Die Gesamtzellzahl bezieht sich auf alle Zellen, die in der Zählkammer gezählt wurden.

4.7 Collagenbeschichtung

Die primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten wurden in collagenbeschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Hierzu wurde 1 ml *Ready to use* Collagenlösung (2 mg/ml) laut Packungsbeilage mit 9 ml sterilem Reinstwasser gemischt. Je 1 ml dieser Lösung wurde in eine kleine Gewebekulturflasche (25 cm^2) gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Flaschen wurden über Nacht unter der Sterilbank getrocknet und konnten im Kühlschrank bis zu sechs Wochen gelagert werden. Zusätzlich wurden 96 *well plates* mit dieser Collagenlösung beschichtet. Mit einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 50 μl der Collagenlösung pro *well* pipettiert und die Platten analog zu den Zellkulturflaschen weiterbehandelt.

4.8 Optimierungsversuche zur Leberbiopsie Perfusion

Es sollte überprüft werden, ob durch den Einsatz von zwei anderen Collagenasen (NB4, NB8) die Ausbeute und Vitalität der Schweine-Hepatozyten gesteigert werden konnte. Verwendet wurden die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen: NB4 0,24 U/ml; NB8 0,8 U/ml. Die entsprechenden Mengen (NB4: 195 mg; NB8 133 mg) wurden in 150 ml Perfusionspuffer gelöst und die Leberbiopsie Perfusion ohne weitere Änderungen durchgeführt (s. Kapitel 4.5.2.3). Die Ergebnisse sind in Kapitel 5.4. dargestellt.

Da die Transportdauer der Schweineleber, aufgrund der Entfernung zur Schlachtereier, mit durchschnittlich 90 min relativ lang war, sollte getestet werden, ob sich Ausbeute und Vitalität durch den Transport in einer Konservierungslösung erhöhen lassen. Verwendet wurde hierfür die *University of Wisconsin* Lösung (UW-Lösung; s Kapitel: 3.5). Die Zusammensetzung der Lösung kann der Tabelle 8-7 im Anhang entnommen werden. Das Leberstück wurde direkt nach der Entnahme mit Hilfe einer 50 ml Spritze mit der UW-Lösung durchgespült. Anschließend wurde das Leberstück in UW-Lösung auf Eis transportiert. Vor der Präperfusion wurde das Leberstück mit warmer UW-Lösung ca. 20 min gespült (Bakala *et al.*, 2003). Die Leberbiopsie Perfusion wurde ohne weitere Änderungen durchgeführt (s. Kapitel 4.5.2.3). Die Ergebnisse sind in Kapitel 5.4 aufgeführt.

4.8.1 Kultivierung der HepG2-Zellen

Zusätzlich zu den Versuchen mit Seehund- und Schweine-Hepatozyten wurden Experimente mit der humanen Leberzelllinie HepG2 (Bezugsquelle: *Cell Culture Service*, Hamburg) durchgeführt. Die Zellen wurden in unterschiedlicher Dichte ($1,6 \times 10^6$ und $3,8 \times 10^6$) in 10 ml RPMI Medium (+ 10 ml FCS + 1 ml Antibiotikum) in Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm^2) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Wie in Kapitel 3.6 beschrieben wurde auch bei den HepG2-Zellen alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das Medium immer FCS enthielt.

4.9 Vitalitätstests

4.9.1 Bestimmung der allgemeinen Stoffwechselaktivität (XTT-Test)

Die Zellen (Seehund- und Schweine-Hepatozyten sowie humane HepG2-Zellen) wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro *well* in sterile, collagenbeschichtete 96 *well plates* ausgesät. Pro Leber bzw. Versuchsansatz mit HepG2-Zellen wurde eine Mikrotiterplatte nach dem Schema in Abbildung 4-4 mit Zellen beladen und kultiviert. Der XTT-Test erfolgte 24, 48 und 72 h nach Isolierung bzw. Aussaat der Zellen also jeweils an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 (s. Abbildung 4-4). Jede Messung beinhaltete je 8 *wells* mit Medium sowie 8 *wells* mit unbehandelten Kontrollzellen, wobei alle Zellen nur einmal vermessen wurden. Zusätzlich zu den Kontrollzellen und dem Medium wurden an Tag 2 (48 h nach der Isolierung) Zellen mit PCBs und PFOS inkubiert und zusammen mit den Kontrollen an Tag 3 vermessen (s. Abbildung 4-4). Dabei wurden dieselben Schadstoffkonzentrationen ($1 \mu\text{M}$ PCB, $50 \mu\text{M}$ PCB, 30 nM PFOS, 300 nM PFOS) wie für die Inkubationsexperimente in den Zellkulturflaschen verwendet (s. Kapitel 4.10).

Zur Durchführung des XTT-Tests wird die Reaktionslösung laut Herstellerangaben angesetzt. Hierzu wird das XTT *labeling reagent* ((Natrium 3'-[1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium]-bis(4-Methoxy-6-Nitro)-Benzen-Sulfon-säurehydrat) 1 mg/ml , in RPMI 1640, steril) mit dem *electron coupling reagent* ((N-methyl-dibenzopyrazin Methylsulfat) $1,25 \text{ mM}$, in PBS, steril) im Verhältnis 49:1 gemischt. Pro *well* werden $50 \mu\text{l}$ dieser Lösung appliziert (finale Konzentration $0,3 \text{ mg/ml}$). Nach einer Inkubationszeit von 4 h wird die Bildung des orangefarbenen Formazans analysiert. Die zu untersuchenden *wells* werden bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm (FTZ Büsum) bzw. 630 nm (GKSS) vermessen.

| | Tag 1 | | Tag 2 | | Tag 3 | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|----------|-----------|-------------|---|---|-------------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | Isooctan | 50 µM PCB | 30 nM PFOS | | | 50 µM PCB | | |
| B | | | | | Isooctan | 50 µM PCB | 30 nM PFOS | | | 50 µM PCB | | |
| C | | | | | Isooctan | 50 µM PCB | 30 nM PFOS | | | 50 µM PCB | | |
| D | | | | | Isooctan | 50 µM PCB | 30 nM PFOS | | | 50 µM PCB | | |
| E | | | | | 1 µM PCB | DMSO | 300 nM PFOS | | | 300 nM PFOS | | |
| F | | | | | 1 µM PCB | DMSO | 300 nM PFOS | | | 300 nM PFOS | | |
| G | | | | | 1 µM PCB | DMSO | 300 nM PFOS | | | 300 nM PFOS | | |
| H | | | | | 1 µM PCB | DMSO | 300 nM PFOS | | | 300 nM PFOS | | |

Abbildung 4-4: Belegungsplan für den XTT-Test. gelbe Felder: 1×10^4 Zellen; blaue Felder: Medium

4.9.2 Nachweis der spezifischen Stoffwechselaktivität (Harnstoff-Test)

Mit Hilfe des Harnstoff-Tests wurde die von den Zellen synthetisierte Harnstoffmenge bestimmt. Dafür wurde von jeder Zellkulturflasche ein Aliquot (1 ml) des Zellkulturmediums abgenommen und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Bei sämtlichen Flaschen wurde alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Als Kontrolle diente Zellkulturmedium aus beschichteten (bei HepG2-Zellen unbeschichteten Flaschen), welches ohne Zellen für 24 h inkubiert wurde. Die Proben wurden in Mikrotiterplatten (96 wells) vermessen.

Auf jeder Platte wurde eine Kalibration mitgeführt. Für die Herstellung der Standardreihe wurden 50 mg Harnstoff in 50 ml FCS-freiem Zellkulturmedium (bei HepG2 mit FCS) im Messkolben gelöst. Aus der Stammlösung wurden folgende Konzentrationen angesetzt: 0; 50; 80; 100; 150 und 200 µg/ml. Von den Proben und den Standards wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden pro well je 5 µl Probe bzw. Standard in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 15 µl Urease-Lösung (10%ig) gemischt. Die Platten wurden für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 30 µl Phenolnitroprusside-Lösung (50 g/l), 30 µl alkalische Hypochlorit-Lösung (0,2%ig) und 130 µl destilliertes Wasser nacheinander in dieser Reihenfolge hinzugefügt. Bei jeder Zugabe wurden die Proben gut

gemischt. Die Platte wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Intensität der Blaufärbung anschließend bei 595 nm im Plattenreader vermessen.

4.9.3 Beurteilung der Membranschädigung (LDH-Test)

Zur Messung der LDH-Werte wurde von jeder Zellkulturflasche ein Aliquot (1 ml) des Zellkulturmediums abgenommen und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Bei sämtlichen Flaschen wurde alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Bestimmung der Proben erfolgte in dreifacher Ausführung. Die Durchführung erfolgte mit dem Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} von der Firma Roche in einer Mikrotiterplatte. Im Test-Kit sind folgende Lösungen enthalten: Färbelösung ((2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid) INT [Iodo Tetrazoliumchlorid], Katalysator (Diaphorase/NAD⁺ Mix) und Stopp-Lösung (1 M HCl) (Reaktionsgleichung s. Kapitel 3.7.4). Zunächst wurde eine Reaktionslösung angesetzt bestehend aus 11,25 ml Färbelösung und 250 µl Katalysator. Pro *well* wurden 100 µl Probe appliziert und mit 100 µl Reaktionslösung vermischt. Die Platte wurde für 10 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde pro *well* 50 µl Stopp-Lösung zugefügt. Die Proben wurden bei 492 nm und 630 nm (GKSS) bzw. 650 nm (FTZ) vermessen. Als Kontrolle diente Zellkulturmedium aus beschichteten (bei HepG2-Zellen aus unbeschichteten) Zellkulturflaschen, welches ohne Zellen für 24 h inkubiert wurde.

4.10 Durchführung der Inkubationsexperimente

Um in den Inkubationsexperimenten die *in vivo* Situation einer Schadstoffbelastung möglichst gut wiederzugeben, wurden die Schadstoffe in umweltrelevanten Konzentrationen eingesetzt (s. Kapitel 3.9). Im folgenden Abschnitt werden die Herleitung der verwendeten Schadstoffkonzentrationen und die Durchführung der Experimente beschrieben.

4.10.1 Durchführung der Inkubationsexperimente mit PCB

Die Berechnung der eingesetzten PCB-Konzentrationen erfolgte auf der Grundlage der von Vagts (1992) gemessenen PCB-Werte in Seehunden. Untersucht wurden die

PCB-Gehalte im Fettgewebe von Seehunden aus der deutschen Nordsee. Vagts (1992) konnte eine PCB-Konzentration von 48-51900 µg/kg Fett (Nassgewicht) nachweisen. Für die Berechnung der Schadstoffkonzentrationen musste zunächst ermittelt werden, welcher Lebermenge (in Gramm) die Zellen in einer Zellkulturflasche entsprechen. Die ersten Inkubationsexperimente wurden in der vorliegenden Arbeit mit Zellen durchgeführt, die mit der Methode Gewebedissoziation in Medium (GdM) isoliert wurden. Bei dieser Methode können aus einem Isolierungsansatz (5 g Leber werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Collagenase desintegriert s. Kapitel 4.5.2.2) drei Zellkulturflaschen (Volumen des Mediums: 10 ml) angesetzt werden. Somit entsprechen die Zellen in einer Zellkulturflasche 1,6 g Leber. Diese Werte wurden auf die Leberbiopsie Perfusion übertragen. Da es sich bei den Aroclor-Lösungen um technische Gemische handelt, ist die exakte Molmasse nicht bekannt. Für die Berechnung wurde daher der Mittelwert aus allen PCB-Kongeneren gebildet ($M_{\text{PCB}} = 332,17 \text{ g/mol}$).

$$48 \text{ ng/g} \cdot 1,6 \text{ g} = 76,8 \text{ ng/Flasche}$$

$$51900 \text{ ng/g} \cdot 1,6 \text{ g} = 83040 \text{ ng/Flasche}$$

$$M_{\text{PCB}} = 332,17 \text{ g/mol}$$

$$\frac{1 \text{ nmol}}{332,17 \text{ ng}} = \frac{x}{76,8 \text{ ng}} \quad x = 0,23 \text{ nmol} \quad \Rightarrow x = 0,023 \text{ } \mu\text{M}$$

$$\frac{1 \text{ nmol}}{332,17 \text{ ng}} = \frac{x}{83,04 \text{ ng}} \quad x = 249 \text{ nmol} \quad \Rightarrow x = 24,9 \text{ } \mu\text{M}$$

In Anlehnung an diese Werte wurden für die Schadstoffinkubation PCB-Konzentrationen von 1 µM bzw. 50 µM eingesetzt. Verwendet wurde der Aroclor *high concentration* Mix von Supelco, wobei nur die Aroclor-Lösungen 1254, 1260, 1262 (je Lösung 1000 µg/ml, in Isooctan) eingesetzt wurden (s. Kapitel 3.9).

Um eine Konzentration von 50 µM PCB in den Zellkulturflaschen (10 ml Medium) zu erreichen, wurden von jeder Aroclor-Lösung (je 1000 µg/ml) 55,3 µl in die Flaschen

pipettiert. Jede Zellkulturflasche enthält somit 166 µl Isooctan. Die Applikation erfolgte direkt nach dem Mediumwechsel an Tag 2.

Für die Inkubationsexperimente mit 1 µM PCB wurde aus den Originallösungen (je 1000 µg/ml) jeweils eine 1:10 (v/v) Verdünnung mit Isooctan angesetzt. Pro Zellkulturflasche (10 ml Medium) wurden von jeder Verdünnung 10 µl appliziert. Damit die Konzentration von Isooctan in allen Flaschen (unabhängig von der Schadstoffkonzentration) gleich hoch ist wurden zusätzlich 136 µl Isooctan zugegeben. Als Kontrolle dienen Zellen, die nur mit Isooctan inkubiert wurden. Pro Flasche wurden 166 µl Isooctan eingesetzt.

Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung angesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

Zusätzlich zu den Experimenten in den Zellkulturflaschen, wurden Hepatozyten in Mikrotiterplatten (96 wells) ausgesät (1x10⁴/well in 100 µl Medium, XTT-Test). Die Zellen wurden ebenfalls für 24 h mit Isooctan, 1 µM bzw. 50 µM PCB inkubiert (s. Kapitel 4.9.1).

4.10.2 Durchführung der Inkubationsexperimente mit PFOS

Die für die PFOS-Inkubationsexperimente eingesetzten Schadstoffkonzentrationen wurden auf der Grundlage der von Ahrens nachgewiesenen PFOS-Konzentrationen in Seehunden aus der Nordsee berechnet. Ahrens *et al.* (2009a) wiesen in Seehunden aus der Nordsee PFOS-Konzentrationen in der Leber von 100-1000 ng/g Nassgewicht nach. Ausgehend von der Annahme, dass sich in einer Zellkulturflasche (Wachstumsfläche: 25 cm²) 1,6 g Leber befinden (s. o. Inkubationsexperimente mit PCB) wurden die Werte folgendermaßen berechnet:

$$100 \text{ ng/g} \cdot 1,6 \text{ g} = 160 \text{ ng/Flasche} \qquad 1000 \text{ ng/g} \cdot 1,6 \text{ g} = 1600 \text{ ng/Flasche}$$

$$M_{\text{PFOS}} = 500 \text{ ng/nmol}$$

$$\frac{1 \text{ nmol}}{500,07 \text{ ng}} = \frac{x}{160 \text{ ng}} \qquad x = 0,32 \text{ nmol} \qquad \Rightarrow x = 32 \text{ nM}$$

$$\frac{1 \text{ nmol}}{500,07 \text{ ng}} = \frac{x}{1600 \text{ ng}} \qquad x = 3,2 \text{ nmol} \qquad \Rightarrow x = 320 \text{ nM}$$

Zur Herstellung der Stammlösungen (0,3 und 3 mmol) wurde PFOS in DMSO gelöst. Für die Inkubationsexperimente bei den Seehund-Hepatozyten wurden die Verdünnungen in DMSO hergestellt. Die finale DMSO-Konzentration von 0,1% in den Zellkulturflaschen führte allerdings zu einer Störung der Urease Aktivität im Harnstofftest. Aus diesem Grund konnten die entsprechenden Tests nicht ausgewertet werden. Bei den später erfolgten Experimenten mit HepG2-Zellen wurden die Verdünnungen in Zellkulturmedium vorgenommen, um die DMSO-Konzentration zu verringern (finale DMSO-Konzentration im Medium: 0,01%).

Die Zellen wurden mit einer finalen PFOS-Konzentration von 30 bzw. 300 nM für 24 h in den Zellkulturflaschen (10 ml Medium) inkubiert. Als Kontrollzellen dienten Hepatozyten, die mit DMSO inkubiert wurden. Die eingesetzte DMSO-Konzentration war in allen Flaschen identisch (s. o. bei Seehund-Hepatozyten: 0,1% (v/v); bei HepG2-Zellen: 0,01% (v/v)).

Zusätzlich zu den Experimenten in den Zellkulturflaschen wurden Hepatozyten in Mikrotiterplatten (96 wells) ausgesät (1×10^4 /well in 100 µl Medium, XTT-Test). Die Zellen wurden ebenfalls für 24 h mit DMSO, 30 nM bzw. 300 nM PFOS inkubiert (s. Kapitel 4.9.1) und mit dem XTT-Test vermessen. Die DMSO-Konzentration betrug bei den Seehund-Hepatozyten 0,1% (v/v) und bei den Schweine-Hepatozyten und HepG2-Zellen 0,01% (v/v).

In Tabelle 4-3 sind die mit Seehund-Hepatozyten durchgeführten Inkubationsexperimente angegeben. Idealerweise wurden für die Inkubationsexperimente neun Zellkulturflaschen verwendet. Dabei wurden drei Flaschen mit dem Lösungsmittel (Isooctan; DMSO), drei Flaschen mit der niedrigen Schadstoffkonzentration und drei Flaschen mit der hohen Schadstoffkonzentration inkubiert (s. Kapitel 3.9 und Abbildung 3-8). Die Zellmenge, die aus den Lebern der Seehunde Pv 9, Pv 18 und Pv 20 isoliert wurde, reichte lediglich für sechs Flaschen (Lösungsmittel; hohe Schadstoffkonzentration).

Tabelle 4-3: Übersicht über die mit Seehund-Hepatozyten durchgeführten Inkubationsexperimente

| Tiernummer | Schadstoffkonzentration |
|-------------------|--------------------------------|
| Pv 1 | 1 µM, 50 µM PCB |
| Pv 5 | 1 µM, 50 µM, 100 µM PCB |
| Pv 6 | 1 µM, 50 µM PCB |
| Pv 7 | 20 nM, 200 nM PFOS |
| Pv 8 | 20 nM, 200 nM PFOS |
| Pv 10 | 20 nM, 200 nM PFOS |
| Pv 11 | 1 µM, 50 µM PCB |
| Pv 12 | 1 µM, 50 µM PCB |
| Pv 13 | 1 µM, 50 µM PCB |
| Pv 14 | 20 nM, 200 nM PFOS |
| Pv 15 | 20 nM, 200 nM PFOS |
| Pv 16 | 20 nM, 200 nM PFOS |
| Pv 17 | 20 nM, 200 nM PFOS |
| Pv 18 | 50 µM PCB |
| Pv 19 | 1 µM, 50 µM PCB |
| Pv 20 | 300 nM PFOS |
| Pv 21 | 30 nM, 300 nM PFOS |
| Pv 22 | 30 nM, 300 nM PFOS |
| Pv 22 | 1 µM, 50 µM PCB |
| Pv 23 | 1 µM, 50 µM PCB |

4.11 Proteinextraktion

Im Anschluss an die Inkubationsexperimente wurde die Proteinextraktion durchgeführt. Hierzu wurde von allen Zellkulturflaschen das Zellkulturmedium vollständig abgenommen und bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand hiervon wurde abgenommen und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Die jeweiligen Pellets wurden aufgehoben. Auf die Zellen in den Zellkulturflaschen wurde je ein 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (25%ig) gegeben und für 4 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und mit den entsprechenden Pellets aus dem ersten Zentrifugationsschritt vereinigt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei welcher der Überstand verworfen wurde.

Die Pellets wurden in 2 ml Medium aufgenommen, wie in Kapitel 4.6 beschrieben gezählt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Danach wurden die Pellets direkt in 600 µl Rehydrierungspuffer aufgenommen (Zusammensetzung s. Tabelle 8-6 im Anhang) und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Der Rehydrierungspuffer wird für die anschließende Untersuchung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese benötigt (Behr 2008a). Zunächst mussten die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen werden. Die Proben wurden aufgetaut, mit 25 µl DNase (150 U) versetzt und für 10 bzw. 15 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von DNase und die anschließende Inkubation sind notwendig, um die aus den Zellen ausgetretene DNA zu spalten. Diese hat im Puffer eine zähe Konsistenz und erschwert die Weiterverarbeitung der Probe. Nach der Inkubation wurde die Probe im Ultraschall-Desintegrator für 1 min bei 40% Impulsstärke behandelt, um die Zellmembran zu zerstören und die Proteine im Puffer zu lösen. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird dann mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (Behr *et al.*, 2008b).

4.12 Statistik

Die Ergebnisse aus den täglichen Messungen wurden hinsichtlich einer signifikanten ($p < 0,05$) Veränderung der Vitalität miteinander verglichen. Die Vergleiche erfolgten dabei innerhalb der einzelnen Gruppen (Seehund- und Schweine-Hepatozyten sowie HepG2-Zellen) und zwischen den Gruppen. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm WinSTAT[®] durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft. Da in allen Fällen eine Normalverteilung vorlag, wurden die Daten mit der Varianzanalyse (ANOVA) analysiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ausarbeitung und Etablierung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung des Schadstoffeinflusses auf Seehunde (s. Kapitel 1 und 3). Dafür musste zunächst eine Methode etabliert werden, die eine Isolierung von Seehund-Hepatozyten aus frischtoten Tieren ermöglicht. Zu dem Zweck wurden verschiedene Isolierungsmethoden getestet. Die Beurteilung der Methoden erfolgte anhand der Parameter Zellausbeute und Vitalität nach Trypanblau-Ausschlusstest (s. Kapitel 3.7), da diese beiden Parameter einen guten Vergleich der Methoden ermöglichten und für die Kultivierung der Hepatozyten entscheidend waren. Um sicherzustellen, dass die primären Hepatozyten ihre Vitalität während der gesamten Kultivierungsdauer sowie nach der Inkubation mit Schadstoffen beibehalten, wurden drei verschiedene Vitalitätsassays angewendet (XTT-, Harnstoff- und LDH-Test). Zur besseren Einordnung der Ergebnisse und zur Etablierung der Methoden wurden zusätzlich Untersuchungen an primären Schweine-Hepatozyten und an der humanen Zelllinie HepG2 durchgeführt.

Zunächst werden die Krankheitsbilder der Seehunde vorgestellt und die Beprobung der Seehunde beurteilt (s. Kapitel 5.1 und 5.2). Anschließend werden die verschiedenen Isolierungsmethoden evaluiert (s. Kapitel 5.3). Zum Abschluss werden die Ergebnisse aus den Vitalitätstests dargelegt und die Schlussfolgerungen diskutiert (s. Kapitel 5.6). Mit Hilfe der Vitalitätstests sollte zudem an Schweinehepatozyten ermittelt werden, welche Isolierungsmethode die vitalsten Zellen liefert und welches Medium für die Kultivierung geeignet ist. Des Weiteren wurde an Schweine-Hepatozyten die Veränderung der Harnstoffsynthese und LDH-Freisetzung im Verlauf einer 14tägigen Kultivierung untersucht (s. Kapitel 5.6).

Die Ergebnisse der Vitalitätstests werden für jeden Test einzeln (Reihenfolge: XTT-, Harnstoff- und LDH-Test) für die verschiedenen Zelltypen vorgestellt (Reihenfolge: Seehund- und Schweinehepatozyten und HepG2-Zellen) und einzeln diskutiert. In Kapitel 5.6.4 werden die Ergebnisse zusammenfassend über alle Tests und Zelltypen diskutiert.

Die Tabelle 5-1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Vitalitätstests mit primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten sowie HepG2-Zellen. Anhand der Tabelle kann nachvollzogen werden, welche Vitalitätstests mit den einzelnen Zellpräparationen durchgeführt wurden.

Tabelle 5-1: Übersicht über die durchgeführten Vitalitätstests mit Seehund-, Schweine-Hepatozyten und HepG2-Zellen. Pv = Seehund; S = Schwein; H = HepG2; X = XTT-Test; H = Harnstoffsynthese; H+ Iso = Harnstoffsynthese bei verschiedenen Isolierungsmethoden (Gewebedissoziation in Medium, Leberbiopsie Perfusion); H+ Med. = Harnstoffsynthese in 2 verschiedenen Medien (Hepatozyme-SFM, WME); L = LDH-Freisetzung; L+ Iso = LDH-Freisetzung bei verschiedenen Isolierungsmethoden (Gewebedissoziation in Medium, Leberbiopsie Perfusion); L+ Med. = LDH-Freisetzung in 2 verschiedenen Medien (Hepatozyme-SFM, WME)

| Tier | Test | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|--------|---------|---|--------|---------|-------------|--------|---------|---|--------|---------|-------------|--------|---------|
| | X | X+ PCB | X+ PFOS | H | H+ PCB | H+ PFOS | H+ Langzeit | H+ Iso | H+ Med. | L | L+ PCB | L+ PFOS | L+ Langzeit | L+ Iso | L+ Med. |
| Pv 19 | x | x | | | x | | | | | | x | | | | |
| Pv 20 | x | | x | | | x | | | | | | x | | | |
| Pv 21 | x | | | | | | | | | | | | | | |
| Pv 22 | x | x | x | | x | x | | | | | x | x | | | |
| Pv 23 | x | x | x | | x | x | | | | | x | x | | | |
| S 23 | x | x | x | | | | | | | | | | | | |
| S 25 | x | x | x | x | | | | | x | | | | | | x |
| S 26 | x | | | x | | | | | | | | | | | |
| S 27 | x | | | x | | | x | x | x | | | | x | x | x |
| S 28 | x | | | x | | | x | x | | | | | x | x | |
| S 29 | x | x | x | x | | | x | x | | | | | x | x | |
| H 1 | x | | | x | | | | | | x | | | | | |
| H 2 | x | | | x | | | | | | x | | | | | |
| H 3 | x | x | x | | x | x | | | | | x | x | | | |
| H 4 | x | x | x | x | | | | | | x | | | | | |
| H 5 | x | x | x | | x | x | | | | | x | x | | | |

5.1 Krankheitsbilder der beprobten Seehunde

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Seehunde beprobt, die eines natürlichen Todes gestorben sind oder aufgrund einer schweren Erkrankung gemäß tierschutzrechtlicher Grundlagen von Seehundjägern getötet werden mussten (Amtsblatt Schleswig-Holstein, 1997) (s. Kapitel 4.4.1).

Die häufigsten Gründe für die gezielte Tötung von Heulern waren: starke Dehydrierung, starker Durchfall, deutliche Schwächung und Lethargie (kein Abwehrverhalten). Bei den älteren Tieren (3-11 Monate) kamen als weitere Kriterien Blutungen aus dem Maul, Absonderung von der Gruppe, fehlendes Fluchtverhalten, auffällige Atemgeräusche und ein schlechter Allgemeinzustand hinzu. In die vorliegende Arbeit flossen auch Daten von Tieren mit ein, die während der Rehabilitation in der Seehundstation Friedrichskoog verstarben. Sämtliche beprobten Seehunde wurden von Mitarbeitern des FTZ vollständig sezziert (Siebert *et al.*, 2007). Die Befunde sind in den Tabellen 5-2 und 5-3 zusammengefasst.

Insgesamt konnten 12 Heuler (7 Männchen, 5 Weibchen) im Alter von 3 Stunden-1 Monat und 11 Jungtiere (9 Männchen, 2 Weibchen) im Alter von 3-11 Monaten beprobt werden. Bei einem Drittel der untersuchten Heuler lag eine *Escherichia coli* Sepsis vor. Ein Lungenödem konnte bei 4 Tieren diagnostiziert werden. Zudem waren verschiedene Organe von Entzündungen betroffen (s. Tabelle 5-2). Die Erkrankungen der Jungtiere waren sehr vielfältig. Als häufigste Erkrankung (7 von 11 Tieren) wurde eine Lungenentzündung diagnostiziert. Am zweit- und dritthäufigsten (5 bzw. 4 von 11 Tieren) wurden eine Endoparasitose bzw. eine Hepatitis festgestellt (s. Tabelle 5-3).

Zusätzlich zu den Erkrankungsursachen sind in den Tabellen 5-2 und 5-3 die von Ahrens *et al.* (2009a,b) nachgewiesenen PFOS-Konzentrationen angegeben. Mit Hilfe der gemessenen Werte können Aussagen zur Belastung der Tiere mit PFOS getroffen werden und ggf. die Ergebnisse aus den Vitalitätstests damit korreliert werden. Daten zur Belastung der Tiere mit PCBs liegen nicht vor. Es sind Proben vorhanden mit denen die PCB-Belastung zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden kann.

Tabelle 5-2: Befunde der Heuler (Erläuterung der medizinischen Fachbegriffe s. Tabelle 8-8 im Anhang)

| Tiernummer | Datum | Erkrankungsursache | PFOS-Werte der Leber (ng/g Nassgewicht)* |
|------------|------------|--|--|
| Pv 1 | 13.06.2006 | Verdacht auf Aneurysma oder Thrombose im Gehirn | 1019 |
| Pv 2 | 22.06.2006 | Scc Sepsis | 1683 |
| Pv 3 | 23.06.2006 | <i>E. coli</i> Sepsis | 866 |
| Pv 4 | 27.06.2006 | Enteritis mit finaler Sepsis | 439 |
| Pv 8 | 17.06.2007 | Enteritis mit finaler Sepsis | 303 |
| Pv 9 | 27.06.2007 | <i>E. coli</i> Sepsis | 2723 |
| Pv 10 | 11.07.2007 | Augen- und Nierenentzündung | 204 |
| Pv 18 | 13.06.2008 | Meningoenzephalitis | n.b. |
| Pv 19 | 14.06.2008 | Meningoenzephalitis | 741 |
| Pv 20 | 17.06.2008 | Kachexie | 418 |
| Pv 21 | 18.06.2008 | Kachexie und <i>E. coli</i> Sepsis | 643 |
| Pv 22 | 27.06.2008 | Kachexie, Gastroenteritis, <i>E. coli</i> Sepsis | 923 |

* Die Erhebung der PFOS-Daten wurde von L. Ahrens durchgeführt (Ahrens *et al.*, 2009a,b); n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 5-3: Befunde der Jungtiere (Erläuterung der medizinischen Fachbegriffe s. Tabelle 8-8 im Anhang)

| Tiernummer | Datum | Erkrankungsursache | PFOS-Werte der Leber (ng/g Nassgewicht)* |
|------------|------------|---|--|
| Pv 5 | 03.01.2007 | Endoparasitose, Bronchopneumonie, Hepatitis | 951 |
| Pv 6 | 15.02.2007 | Endoparasitose, Phlegmone | 277 |
| Pv 7 | 13.02.2007 | Endoparasitose, Bronchopneumonie, Hepatitis, akute Brucellose | 851 |
| Pv 11 | 26.11.2007 | Kachexie mit finaler <i>E. coli</i> Sepsis | 1665 |
| Pv 12 | 05.12.2007 | Bronchopneumonie, finale Brucellen Sepsis | 594 |
| Pv 13 | 05.12.2007 | Bronchopneumonie | 1251 |
| Pv 14 | 29.01.2008 | Hepatitis, Bronchopneumonie | 495 |
| Pv 15 | 29.01.2008 | Hepatitis, Enteritis, Bronchopneumonie | 577 |
| Pv 16 | 31.01.2008 | Endoparasitose, Hepatitis | 367 |
| Pv 17 | 14.02.2008 | Brucellen, Streptokokken Sepsis | 298 |
| Pv 23 | 02.09.2008 | Rotlauf Sepsis | 431 |

*Die Erhebung der PFOS-Daten wurde von L. Ahrens durchgeführt (Ahrens *et al.*, 2009a,b)

5.2 Beprobung der Seehunde und Schweine

Bei den Seehunden variierte die Zeitspanne zwischen dem Eintritt des Todes und dem Beginn der Zellisolierung deutlich. Diese Zeitspanne wird im Folgenden als Transportdauer definiert und betrug durchschnittlich 100 min. Abhängig von der Entfernung des Fundortes der Tiere betrug die längste Transportdauer 3 h und 20 min und die kürzeste 20 min. Da möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Länge der Transportdauer und der Zellausbeute bzw. Vitalität besteht, wird die Transportdauer im Folgenden mit angegeben und diskutiert (s. Kapitel 5.3.2.3) Die Transportdauer bei den Schweinelebern dauerte im Schnitt 90 min und variierte nur leicht.

Bei der Beprobung der Seehunde und Schweine fiel die unterschiedliche Konsistenz der Leber auf, die bei der Schweineleber deutlich fester war. Eine mögliche Ursache könnte der hohe Collagen-Anteil in der Schweineleber sein (Liebich, 1990).

5.3 Ergebnisse und Diskussion der verwendeten Isolierungsmethoden

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Zellisolierung primärer Seehund- und Schweine-Hepatozyten präsentiert. Die Methoden Gewebedissoziation in Medium (GdM) und die Leberbiopsie Perfusion wurden zur Isolierung primärer Seehund- und Schweine-Hepatozyten eingesetzt. Die übrigen Methoden wurden nur zur Isolierung primärer Seehund-Hepatozyten verwendet. Die Ergebnisse werden nacheinander für jede Isolierungsmethode vorgestellt und abschließend vergleichend diskutiert (s. Kapitel 5.6.4).

5.3.1 Mechanische Isolierungsmethoden

Die mechanische Isolierung der primären Seehund-Hepatozyten wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Hierbei handelt es sich um die Gewebedissoziation mittels Sieb (GdS) und um die Explantatkultur (EpK).

5.3.1.1 Gewebedissoziation mittels Sieb (GdS)

Bei dieser mechanischen Isolierungsmethode wurde die Gewebedissoziation mit Hilfe eines Siebes durchgeführt. Hierzu wurden kleine Leberstücke vorsichtig durch ein Sieb gestrichen. Durch diese Vorgehensweise lässt sich das Lebergewebe in Einzelzellen zerlegen. Die morphologische Betrachtung der Hepatozyten nach der Zellisolierung deckte eine unregelmäßige Zellform auf (s. Abbildung 5-1). Zudem befanden sich außer den Hepatozyten viele Erythrozyten und Zelltrümmer in den Kulturen. Nach drei Tagen konnte ein leichtes Fibroblasten-Wachstum beobachtet werden, welches im Laufe der Kultivierung stark zunahm. Die Hepatozyten hefteten sich, entgegen der Erwartung, nicht am Boden der Zellkulturflasche.

Die Daten zur Ausbeute und Zellvitalität der Seehund-Hepatozyten sind in Tabelle 5-4 dargestellt. Die Zellausbeute gibt die Gesamtzahl aller isolierten, vitalen Hepatozyten an (Bestimmung der Vitalität mit Trypanblau s. Kapitel 4.6). Aufgrund der geringen Datenmenge konnte kein Zusammenhang zwischen der Zellausbeute bzw. Vitalität und der Transportdauer hergestellt werden.

Tabelle 5-4: Ausbeute und Vitalität der isolierten Seehund-Hepatozyten (Methode: GdS)

| Tiernummer | Gewicht der Leberstücke | Zellausbeute (gesamt) [$\times 10^6$] | Vitalität nach Trypanblaufärbung [%] | Transportdauer [min] |
|------------|-------------------------|---|--------------------------------------|----------------------|
| Pv 3 | n.b. | 18,4 | 89 | 30 |
| Pv 4 | n.b. | 16,0 | 99 | 170 |

n.b. = nicht bestimmt

*Transportdauer = Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Beginn der Zellisolierung

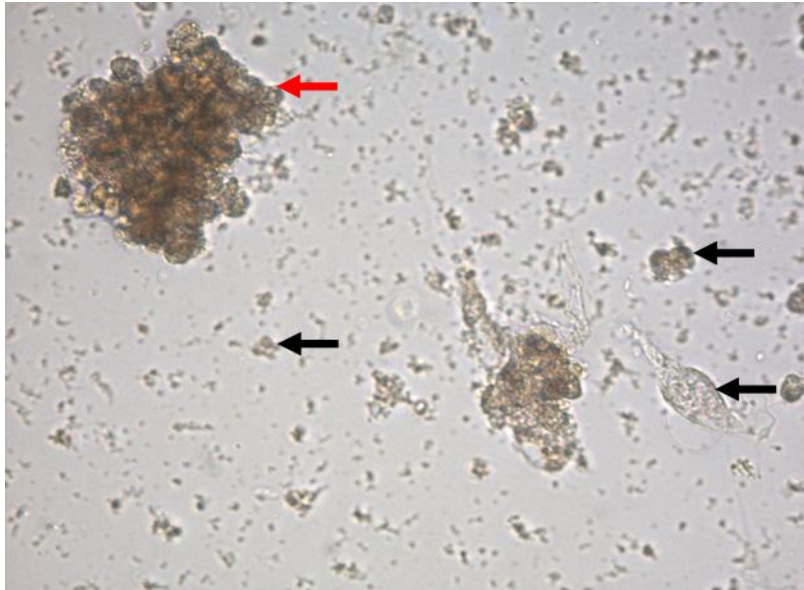


Abbildung 5-1: Primäre Seehund-Hepatozyten (Pv 4) 96 h nach der Isolierung (GdS), Medium: Opti-MEM; roter Pfeil: Hepatozyten; schwarze Pfeile: Zelltrümmer; Vergr.: 200x

5.3.1.2 Explantatkultur (EpK)

Bei der Explantatkultur wurde ein Leberstück zerkleinert und die erhaltenen Stücke in speziell präparierte Zellkulturflaschen ausgebracht (s. Kapitel 4.5.1.2). Zur Behandlung der Zellkulturflasche wurden mit einer heißen Pinzette kleine Vertiefungen in den Boden der Flasche geschmolzen. Die Gewebestücke sollten sich in den Vertiefungen festheften. Allerdings konnte keine Anheftung der Gewebestücke festgestellt werden. Ebenso wenig konnte nach sechswöchiger Kultivierung ein Auswandern von Zellen aus den Explantaten festgestellt werden. Es trat lediglich ein leichtes Fibroblasten-Wachstum auf.

5.3.2 Enzymatische Isolierungsmethoden

Für die enzymatische Isolierung der primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten wurden drei verschiedene Methoden getestet. Allen Methoden gemeinsam ist die Verwendung von Collagenase zur Dissoziation des Lebergewebes.

5.3.2.1 Gewebedissoziation in PBS (GdP)

Bei der Gewebedissoziation in PBS wurden kleine Leberstücke für 5 min in collagenasehaltigem PBS inkubiert. Die mit dieser Methode isolierten Hepatozyten wiesen eine unregelmäßige Zellform auf und adhärten nicht am Boden der Zellkulturflaschen. Des Weiteren befanden sich sehr viele Erythrozyten in den Kulturen. Nach drei Tagen ließ sich ein leichtes Fibroblasten-Wachstum feststellen, welches im Laufe der Kultivierung stark zunahm.

In Tabelle 5-5 sind Ausbeute und Vitalität der Seehund-Hepatozyten zusammengefasst, wobei sich die Ausbeute auf die Gesamtzahl aller isolierten, vitalen Zellen bezieht. Ein Zusammenhang zwischen der Transportdauer und den Parametern Zellausbeute und Vitalität konnte nicht detektiert werden.

Tabelle 5-5: Ausbeute und Vitalität der isolierten Seehund-Hepatozyten (Methode: GdP)

| Seehund | Gewicht der Leberstücke | Zellausbeute (gesamt) [x10 ⁶] | Vitalität nach Trypanblaufärbung [%] | Transportdauer* [min] |
|---------|-------------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|
| Pv 1 | n.b. | 0,9 | 90 | 180 |
| Pv 2 | n.b. | 1,3 | 90 | 170 |
| Pv 3 | n.b. | 1,6 | 94 | 30 |
| Pv 4 | n.b. | 16,0 | 99 | 170 |

n.b. = nicht bestimmt

*Transportdauer = Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Beginn der Zellisolierung

5.3.2.2 Gewebedissoziation in Medium (GdM)

Die Durchführung dieser Methode ist mit der Gewebedissoziation in PBS (GdP) vergleichbar. Allerdings wurde hier eine größere Menge Lebergewebe eingesetzt und die Inkubation mit Collagenase für drei Stunden (statt 5 min bei GdP) durchgeführt.

Seehund-Hepatozyten

Die Hepatozyten wiesen die gleiche unregelmäßige Gestalt auf wie bei den vorher beschriebenen Methoden. Eine Anheftung der Zellen an den Boden der Kulturflaschen erfolgte nicht. Vereinzelt konnte ein leichtes Fibroblasten-Wachstum beobachtet werden. Außerdem gelangten bei dieser Methode ebenfalls viele Erythrozyten und Zelltrümmer in die Kulturen (s. Abbildung 5-2). Die Ausbeute und Vitalität der isolierten Seehund-Hepatozyten können der Tabelle 5-6 entnommen

werden. Durchschnittlich konnten 9×10^5 Zellen pro Gramm Leber isoliert werden. Die Höhe der Gesamtausbeute betrug durchschnittlich $1,7 \times 10^7$ Zellen. Die mit dem Trypanblau-Ausschlusstest ermittelte Vitalität reichte von 87-99% der Gesamtzellzahl. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Zellausbeute bzw. Vitalität und der Transportdauer der Tiere festgestellt werden.

Tabelle 5-6: Ausbeute und Vitalität der isolierten Seehund-Hepatozyten (Methode: GdM)

| Seehund | Gewicht der Leberstücke [g] | Zellausbeute pro g Leber* [$\times 10^5$ /g] | Zellausbeute (gesamt) [10^7] | Vitalität nach Trypanblaufärbung [%] | Transportdauer** [min] |
|---------|-----------------------------|---|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Pv 5 | 30 | 18,0 | 5,3 | 99 | 120 |
| Pv 6 | 20 | 10,0 | 2,0 | 87 | 60 |
| Pv 7 | 30 | 3,7 | 1,7 | 99 | 60 |
| Pv 8 | 15 | 32,0 | 4,8 | 99 | 150 |
| Pv 9 | 25 | 0,6 | 1,4 | 94 | 40 |
| Pv 10 | 25 | 8,8 | 2,2 | 99 | 180 |
| Pv 11 | 20 | 3,9 | 7,8 | 97 | 120 |
| Pv 12 | 20 | 1,9 | 0,2 | 99 | 60 |
| Pv 13 | 20 | 2,0 | 0,4 | 98 | 60 |

*bezieht sich auf das zur Isolierung verwendete Leberstück

**Transportdauer = Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Beginn der Zellisolierung

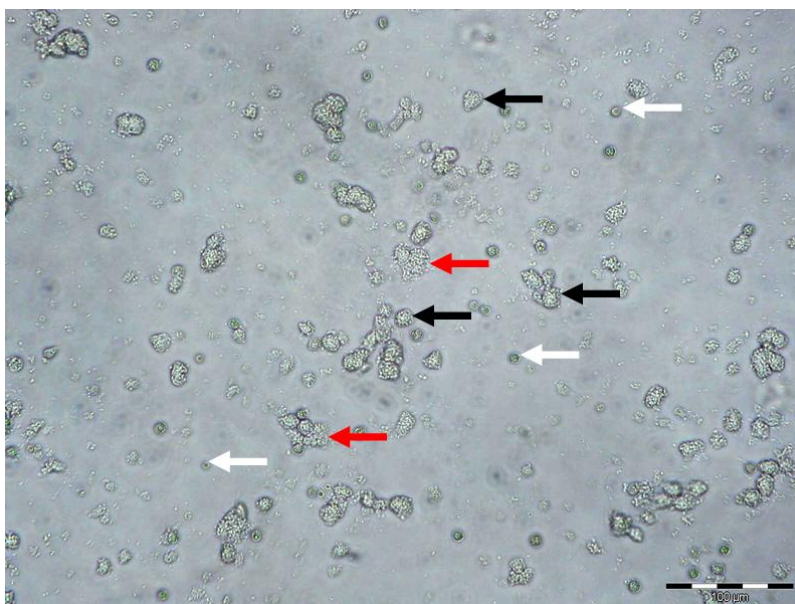


Abbildung 5-2: Primäre Seehund-Hepatozyten (Pv 13) 24 h nach der Isolierung, Medium: Hepatozyme-SFM, rote Pfeile: Hepatozyten; weiße Pfeile Erythrozyten; schwarze Pfeile: Zelltrümmer; Vergr.: 200x, Messbalken: 100 μ m

Schweine-Hepatozyten

Die Isolierung der Schweine-Hepatozyten erfolgte analog zur Isolierung der Seehund-Hepatozyten (Durchführung s. Kapitel 4.5.2.3). Wie der Abbildung 5-3 zu entnehmen ist, wiesen die Schweine-Hepatozyten morphologisch die gleiche unregelmäßige Zellform auf, wie die in Abbildung 5-2 gezeigten Seehund-Hepatozyten. Auch in diesem Fall hefteten sich die Hepatozyten nicht am Boden der Zellkulturflasche an. Wie in Abbildung 5-3 hervorgehoben, sind neben den Hepatozyten auch Erythrozyten und Zelltrümmer Bestandteil der Kultur. Die Schweine-Hepatozyten erscheinen, trotz derselben Vergrößerung, größer als die Seehund-Hepatozyten in Abbildung 5-2. Die beiden Zellfotos wurden mit zwei verschiedenen Kameras aufgenommen, die unterschiedliche Brennweiten haben, wodurch sich der Unterschied ergibt. In der Literatur sind allerdings auch artspezifische Größenunterschiede bei Hepatozyten beschrieben (Battle und Stacey, 2001). Die Informationen zur Ausbeute und Vitalität der Hepatozyten können der Tabelle 5-7 entnommen werden. Die durchschnittlich erzielte Gesamtausbeute betrug $1,7 \times 10^7$ Zellen. Pro Gramm Leber konnten im Schnitt $9,1 \times 10^7$ Zellen mit einer Vitalität von 96% isoliert werden. Die Transportdauer der Schweineleber schwankte nicht so stark wie bei Seehunden. Eine Korrelation mit der Zellausbeute und der Vitalität konnte nicht detektiert werden.

Tabelle 5-7: Ausbeute und Vitalität der isolierten Schweine-Hepatozyten (Methode: GdM)

| Schwein | Gewicht der Leberstücke [g] | Zellausbeute pro g Leber* [$\times 10^5/g$] | Zellausbeute (gesamt) [10^7] | Vitalität nach Trypanblaufärbung [%] | Transportdauer** [min] |
|---------|-----------------------------|---|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| S 1 | 40 | 1,0 | 0,4 | 95 | 90 |
| S 3 | 20 | 5,3 | 1,0 | 99 | 95 |
| S 4 | 20 | 5,4 | 1,1 | 99 | 100 |
| S 6 | 10 | 6,2 | 0,6 | 98 | 95 |
| S 27 | 20 | 11,0 | 2,2 | 90 | 95 |
| S 28 | 20 | 26,0 | 5,2 | 98 | 80 |
| S 29 | 20 | 9,0 | 1,8 | 96 | 100 |

*bezieht sich auf das zur Isolierung verwendete Leberstück

**Transportdauer = Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Beginn der Zellisolierung

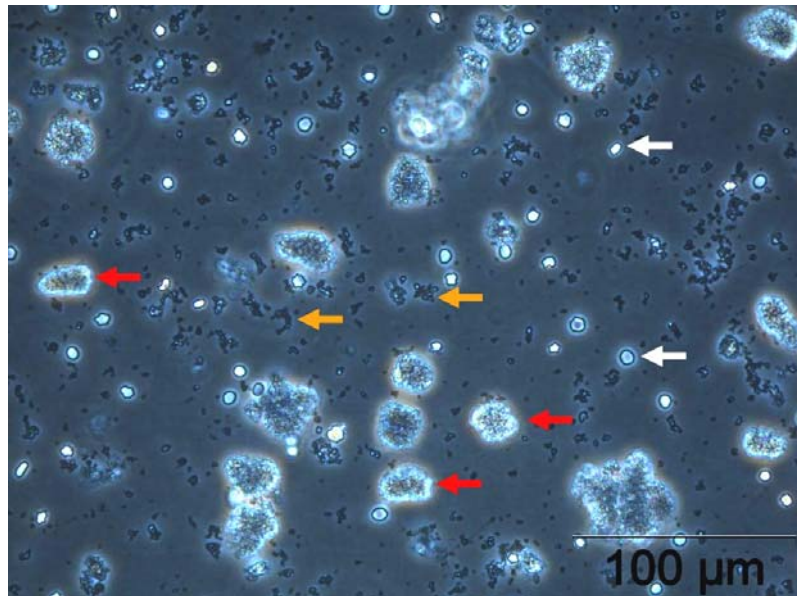


Abbildung 5-3: Primäre Schweine-Hepatozyten (S 28) 48 h nach der Isolierung, Medium: Hepatozyme-SFM, rote Pfeile: Hepatozyten; weiße Pfeile: Erythrozyten; orangefarbene Pfeile: Zelltrümmer; Vergr.: 200x, Phasenkontrast-Aufnahme

5.3.2.3 Leberbiopsie Perfusion

Bei der Leberbiopsie Perfusion wird ein Stück der entnommenen Leber mit collagenasehaltigem Puffer perfundiert und das Gewebe dadurch in Einzelzellen aufgelöst. Die Durchführung erfolgte bei Seehund- und Schweineleber analog (s. Kapitel 4.5.2.3), weshalb die Ergebnisse im nächsten Abschnitt zusammen dargestellt werden.

Seehund- und Schweine-Hepatozyten

Die Ergebnisse für die Vitalität und Ausbeute der isolierten Seehund-Hepatozyten befinden sich in Tabelle 5-8. Für die Schweine-Hepatozyten können die Ergebnisse aus Tabelle 5-9 entnommen werden. Die Hepatozyten beider Spezies besaßen in den ersten 24 h nach der Isolierung eine kreisrunde Zellform. Vitale Hepatozyten hefteten sich binnen 3 h nach der Isolierung an den Boden der Zellkulturflaschen an. Im Laufe des zweiten Kultivierungstages begannen die Hepatozyten ihre morphologische Erscheinungsform zu verändern (Abbildung 5-4). Durch die Ausbreitung der Hepatozyten kam es zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (s. Abbildung 5-5 und 5-6). Drei Tage nach der Isolierung hatte sich ein konfluent

Zellrasen ausgebildet. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus der Literatur (Reese und Byard, 1981; Koebe *et al.*, 1995). Es befanden sich deutlich weniger Erythrozyten in den Kulturen als bei den vorher beschriebenen Isolierungsmethoden. Ein Wachstum von Fibroblasten konnte nicht beobachtet werden.

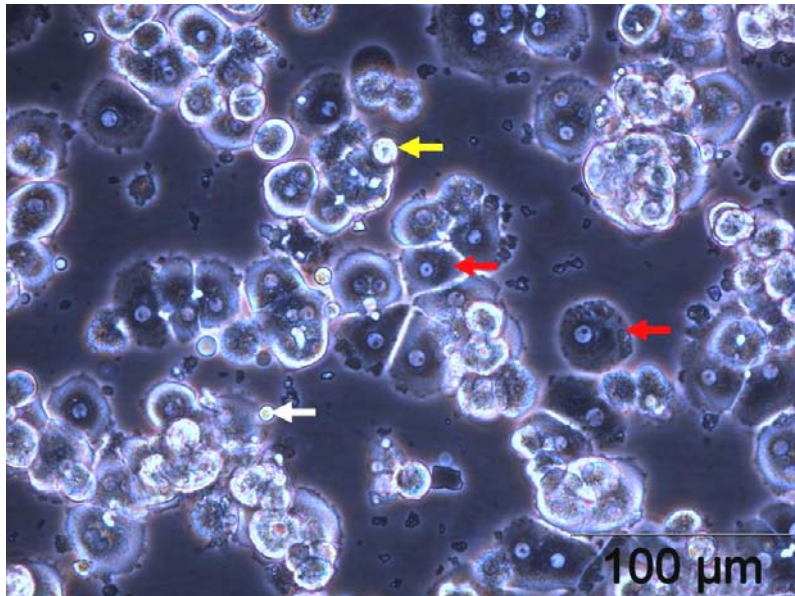


Abbildung 5-4: Primäre Schweine-Hepatozyten 3 h nach der Isolierung (S 29), Medium: WME, rote Pfeile: ausgebreitete Hepatozyten; gelbe Pfeile: nicht ausgebreitete Hepatozyten; weiße Pfeile: Erythrozyten; Verg. 200x, Phasenkontrast-Aufnahme

Mit der Leberbiopsie Perfusion konnten bei den Seehunden im Schnitt $8,3 \times 10^5$ Zellen pro Gramm Leber isoliert werden. Die durchschnittliche Gesamtausbeute betrug $3,8 \times 10^7$ bei einer Vitalität von 79-99%. Die Transportdauer schwankte stark (zwischen 40 und 180 min). Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Transportdauer und der Zellausbeute hergestellt werden. Dieser Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen aus Studien an primären Schweine-Hepatozyten (Koebe *et al.*, 2000; Transportdauer 35-60 min) sowie Pferde-Hepatozyten (Bakala *et al.*, 2003; Transportdauer: 180-350 min) und humanen Hepatozyten (Serralta *et al.*, 2003; Transportdauer max. 85 min), die mittels Perfusion isoliert wurden. Auffällig ist, dass in der vorliegenden Arbeit die Größe des Leberstücks nicht mit Zellausbeute korrelierte. Ein großes Leberstück führte nicht automatisch zu einer hohen Zellausbeute. Es konnte eher ein negativer Zusammenhang (kleines Leberstück, hohe Zellausbeute) festgestellt werden, der aber nicht immer gegeben war (s. Tabelle 5-8). Richert *et al.* (2004) machten eine ähnliche Beobachtung bei der Isolierung humaner Hepatozyten. Sie isolierten Hepatozyten aus Leberbiopsien, die 50-150 g wogen und

aus Biopsien mit einem Gewicht von mehr als 150 g. Die Zellausbeute war höher, wenn die verwendeten Leberstücke weniger als 150 g wogen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. In der Studie von Vondran *et al.* (2008) an humanen Hepatozyten konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Größe der Leberbiopsie und der Zellausbeute festgestellt werden.

Tabelle 5-8: Ausbeute der isolierten Seehund-Hepatozyten (Methode: LbP)

| Seehund | Gewicht des Leberstücks [g] | Zellausbeute pro g Leber* [$\times 10^5/g$] | Zellausbeute (gesamt) [10^7] | Vitalität nach Trypanblaufärbung [%] | Transportdauer** [min] |
|---------|-----------------------------|---|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Pv 14 | 108 | 3,1 | 3,3 | 99 | 60 |
| Pv 15 | 163 | 2,6 | 4,2 | 99 | 50 |
| Pv 16 | 87 | 3,9 | 3,4 | 99 | 70 |
| Pv 17 | 48 | 9,5 | 4,6 | 95 | 60 |
| Pv 18 | 48 | 0,5 | 0,2 | 79 | 90 |
| Pv 19 | 31 | 15,0 | 4,7 | 88 | 120 |
| Pv 20 | 52 | 5,4 | 2,8 | 97 | 45 |
| Pv 21 | 25 | 18,0 | 4,5 | 98 | 60 |
| Pv 22 | 43 | 17,0 | 7,3 | 97 | 150 |
| Pv 23 | 35 | 8,3 | 2,9 | 95 | 180 |

*bezieht sich auf das zur Isolierung verwendete Leberstück

**Transportdauer = Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Beginn der Zellisolierung

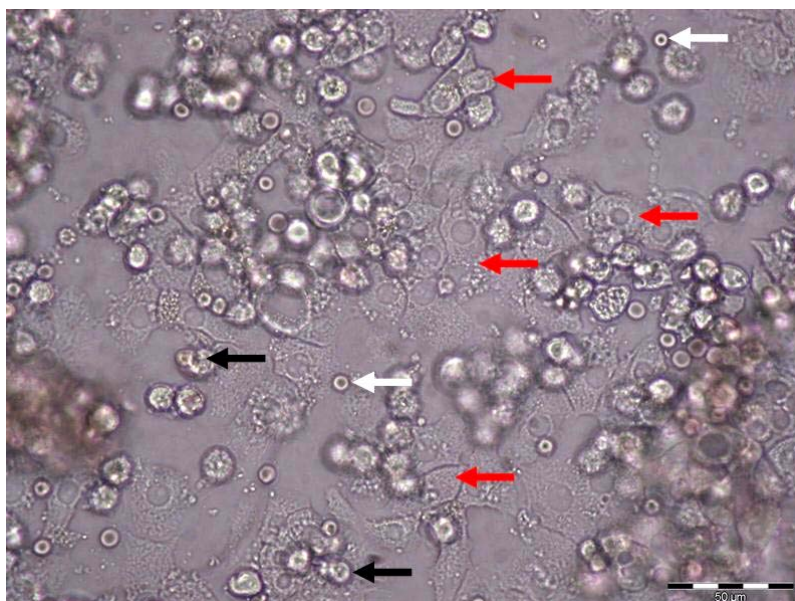


Abbildung 5-5: Primäre Seehund-Hepatozyten (Pv 22) 24 h nach der Isolierung, Medium: WME, rote Pfeile: ausgebreitete Hepatozyten; schwarze Pfeile: nicht ausgebreitete Hepatozyten; weiße Pfeile: Erythrozyten; Vergr.: 400x; Messbalken: 50 μm

Bei der Isolierung der Schweine-Hepatozyten konnte eine durchschnittliche Ausbeute von $5,7 \times 10^5$ Zellen pro Gramm Leber erzielt werden. Die Gesamtzellzahl betrug im Schnitt $3,6 \times 10^7$ Zellen. Die Schwankungsbreite der Vitalität war mit 56-99% sehr hoch. Vergleicht man die Größe des zur Isolierung verwendeten Leberstücks mit der Zellausbeute, so lässt sich kein stringenter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern herstellen. Wobei eher ein negativer Zusammenhang als ein positiver Zusammenhang beobachtet werden kann (kleines Leberstück, hohe Zellausbeute). Diese Beobachtungen decken sich mit den Angaben in der Literatur (s. o. Richert *et al.* (2004). Die Transportdauer korrelierte in der vorliegenden Arbeit nicht mit der Zellausbeute, wobei die Dauer geringe Schwankungen aufwies (90-135 min). Dies deckt sich mit Daten aus der Literatur aus Studien an primären Schweine-Hepatozyten (Koebe *et al.*, 2000; Transportdauer 35-60 min) sowie Pferde-Hepatozyten (Bakala *et al.*, 2003; Transportdauer: 180-350 min) und humanen Hepatozyten (Serralta *et al.*, 2003; Transportdauer max. 85 min), die mittels Perfusion isoliert wurden.

Tabelle 5-9: Ausbeute und Vitalität der isolierten Schweine-Hepatozyten (Methode: LbP)

| Tiernummer | Gewicht des Leberstücks [g] | Zellausbeute pro g Leber [$\times 10^5/g$]* | Zellausbeute (gesamt) [10^7] | Vitalität nach Trypanblaufärbung [%] | Transportdauer [min]** |
|------------|-----------------------------|---|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| S 8 | 124 | 0,6 | 0,8 | 92 | 90 |
| S 9 | 115 | 0,9 | 1,0 | 90 | 90 |
| S 10 | 98 | 4,9 | 4,8 | 99 | 90 |
| S 11 | 139 | 1,2 | 1,7 | 97 | 90 |
| S 12 | 94 | 0,7 | 0,7 | 94 | 90 |
| S 15 | 66 | 3,0 | 6,0 | 61 | 80 |
| S 20 | 72 | 2,4 | 1,7 | 75 | 120 |
| S 21 | 74 | 9,9 | 7,3 | 80 | 90 |
| S 22 | 63 | 2,4 | 1,5 | 78 | 105 |
| S 23 | 48 | 3,3 | 1,6 | 76 | 100 |
| S 24 | 85 | 4,8 | 4,1 | 56 | 90 |
| S 25 | 70 | 16,0 | 11 | 68 | 95 |
| S 26 | 75 | 8,0 | 6,0 | 76 | 105 |
| S 27 | 36 | 9,7 | 3,5 | 81 | 95 |
| S 28 | 48 | 8,5 | 4,1 | 79 | 80 |
| S 29 | 33 | 15,0 | 4,9 | 82 | 100 |

*bezieht sich auf das zur Isolierung verwendete Leberstück

**Transportdauer = Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Beginn der Zellisolierung

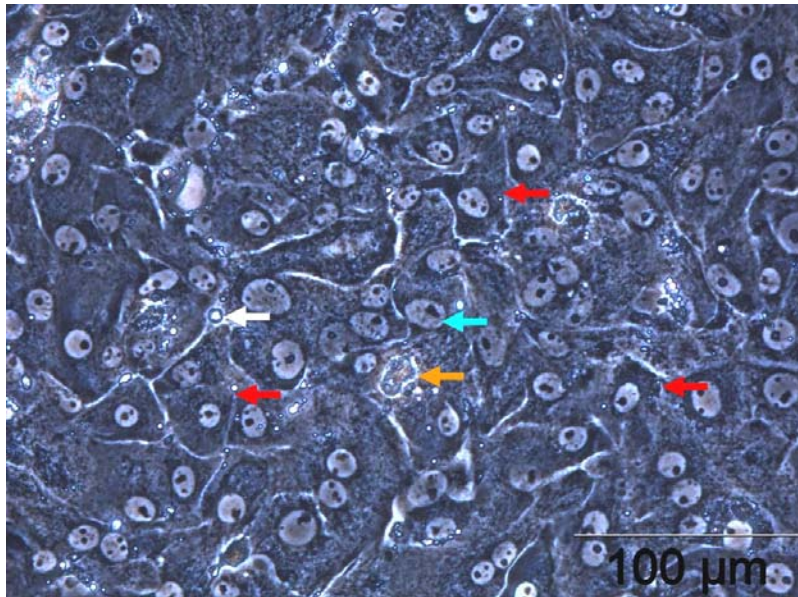


Abbildung 5-6: Primäre Schweine-Hepatozyten (S 28) 72 h nach Isolierung, Medium: WME, rote Pfeile: ausgebreitete Hepatozyten; blauer Pfeil: Zellkern; weißer Pfeil: Erythrozyt; orangefarbener Pfeil: Zelltrümmer; Vergr.: 200x, Phasenkontrast

5.3.3 Vergleichende Diskussion der Isolierungsmethoden

Zur Isolierung der primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten wurden sowohl mechanische als auch enzymatische Methoden verwendet. Überlegungen die die Wahl der Isolierungsmethode beeinflussten, waren die benötigte Vorlaufzeit bis zum Beginn der Isolierung und der Zeitbedarf für die Durchführung der Isolierung. Die Entscheidung welche Methode am besten geeignet ist, erfolgte anhand der Parameter Zellausbeute, Vitalität nach Trypanblaufärbung und Morphologie der Hepatozyten. Das Gewicht des zur Isolierung verwendeten Leberstücks wurde allerdings nicht bei allen Methoden bestimmt. Deshalb lässt sich die erzielte Ausbeute der verschiedenen Isolierungsmethoden untereinander nicht vergleichen. Dennoch kann die Gesamtausbeute als Parameter für die Beurteilung der Isolierungsmethoden herangezogen werden. Für das Zellkulturmodell wird eine Gesamtzellzahl von $3,5 \times 10^7$ Zellen benötigt (s. Kapitel 3.4). Diese Zahl ergibt sich aus der für die 2D-Gelelektrophorese benötigten Proteinmenge. Jede Zellkulturflasche muss mit $3,8 \times 10^6$ Zellen angesetzt werden, um eine ausreichend hohe Proteinmenge zu erzielen. Ein vollständiger Ansatz für das Zellkulturmodell umfasst neun Flaschen (s. Kapitel 3.9). Die erforderliche Gesamtzellzahl konnte weder mit der Methode der Gewebedissoziation mittels Sieb ($1,7 \times 10^7$ Zellen) noch mit der

Gewebedissoziation in PBS ($0,5 \times 10^7$ Zellen) bzw. in Medium ($1,7 \times 10^7$ Zellen) erreicht werden. Diese Methoden eignen sich demnach nicht, um primäre Hepatozyten für das Zellkulturmodell zu gewinnen. Mit der Leberbiopsie Perfusion konnten dagegen in beiden Spezies ausreichend hohe Zellzahlen isoliert werden (s. Tabellen 5-8 und 5-9). Die Leberbiopsie Perfusion lieferte bei den Schweinelebern mit durchschnittlich $5,7 \times 10^5$ /g Leber geringere Werte als bei den Seehunden ($8,3 \times 10^5$ /g Leber). Die Ausbeute liegt damit unter den in der Literatur angegebenen Werten für Schweineleber ($2,4 \times 10^6$ /g Leber, Christiansen 2000; 4×10^6 /g Leber, Fröhlich 2004; $1,7 \times 10^6$ /g Leber, Wundt 2009). Korff (2010) erzielte bei der Isolierung primärer Schweine-Hepatozyten mit durchschnittlich $4,3 \times 10^5$ /g Leber ebenfalls geringere Werte als in der Literatur angegeben. Es kommen mehrere mögliche Ursachen für die Abweichungen der Zellausbeute von diesen Literaturwerten in Frage. Es ist nicht auszuschließen, dass die Schweinerasse einen Einfluss auf die Ausbeute der Hepatozyten hat. In den oben genannten Literaturstellen wird nicht beschrieben, aus welcher Schweinerasse die Leber entnommen wurde. Seglen (1976) stellte bei der Isolierung primärer Ratten-Hepatozyten fest, dass die Zellen aus den beiden untersuchten Rattenarten unterschiedlich sensibel auf den Isolierungsprozess reagierten.

Ein weiterer Faktor, der die Zellausbeute beeinflusst, ist das Alter bzw. Gewicht der Schweine. Koebe *et al.* (2000) fanden heraus, dass sie die höchste Zellausbeute erzielten, wenn die Schweine ein Alter von 4-8 Wochen verwendeten. Bei älteren Tieren erhöhten sich die benötigte Collagenase Menge und die Perfusionszeit, was in beiden Fällen zu einer Verminderung der Ausbeute und Vitalität führte (Koebe *et al.* (2000). Das Alter der Schweine aus denen in der vorliegenden Arbeit die Leber verwendet wurde, betrug ca. 4-5 Monate. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Gewicht (6-40 kg) der Schweine und der erzielten Zellausbeute stellten Gerlach *et al.* (1996) fest. Sie erhielten bei leichteren Schweinen (und damit kleineren Lebern) eine höhere Ausbeute. In der vorliegenden Arbeit hatten die Schweine bei der Schlachtung ein Gewicht von ca. 100 kg. In den meisten Arbeiten wird weder das Gewicht noch das Alter der Schweine angegeben, was den Vergleich der erzielten Ausbeuten erschwert. Des Weiteren könnten eventuell Unterschiede in der zur Isolierung verwendeten Apparatur einen Einfluss auf die Ausbeute haben. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Apparatur wurde in Anlehnung an die von

Christiansen (2000) entwickelte Anlage konstruiert. Allerdings konnten nicht alle Komponenten exakt übernommen werden (s. Kapitel 4.5.2.3), da es sich z. B. bei dem Gefäß, in dem das Leberstück während der Isolierung platziert wird, um eine spezielle Einzelanfertigung handelt. Dieses Gefäß ist doppelwandig und wird von 37°C warmen Wasser durchflossen, was eine Abkühlung des rezirkulierenden Präperfusionspuffers verhindert. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Apparatur musste der Präperfusionspuffer fortlaufend im Wasserbad erwärmt werden, wodurch es zu Schwankungen in der Temperatur kommen kann. Allerdings werden ähnliche Apparaturen (ohne doppelwandiges Gefäß) auch erfolgreich von anderen Arbeitsgruppen zur Isolierung primärer Hepatozyten verwendet (Reese und Byard, 1981; Koebe *et al.*, 2000; Vondran, 2008). Die genaue Ursache für die geringere Ausbeute der Schweine-Hepatozyten konnte nicht geklärt werden.

Es ist auffällig, dass die Ausbeute der Seehund-Hepatozyten mit $8,3 \times 10^5$ /g Leber höher ausfällt als bei den Schweine-Hepatozyten ($5,7 \times 10^5$ /g). Diese Beobachtung machte auch Korff (2010). Die Ausbeute der Seehund-Hepatozyten übertraf die der Schweine-Hepatozyten um das sechsfache ($25,2 \times 10^5$ /g Leber vs. $4,3 \times 10^5$ /g Leber) (Korff, 2010). Eine mögliche Ursache könnten artspezifische Unterschiede im Aufbau des Lebergewebes sein. Vergleicht man die Beschaffenheit der Leberproben von Seehunden und Schweinen, so stellt man eine größere Festigkeit der Schweinelebern fest. Dies könnte auf den hohen Collagen-Anteil in der Schweineleber zurückzuführen sein (Liebich, 1990). Aufgrund des hohen Collagen-Anteils, müsste zur Isolierung der Schweine-Hepatozyten vermutlich eine höhere Collagenase-Konzentration eingesetzt werden, um eine bessere Zellausbeute zu erzielen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht getestet, da die Leberbiopsie Perfusion für die Isolierung primärer Seehund-Hepatozyten etabliert werden sollte und mit den verwendeten Parametern für beide Tierarten eine ausreichend hohe Zellzahl erzielt wurde.

Die durchschnittliche mit Trypanblau ermittelte Vitalität der Seehund-Hepatozyten, die in der vorliegenden Arbeit mit der Leberbiopsie Perfusion isoliert wurden, liegt bei 95%. Die von Korff (2010) ermittelte Vitalität fiel mit durchschnittlich 73% geringer aus. Die mit der Leberbiopsie Perfusion isolierten Schweine-Hepatozyten wiesen in der vorliegenden Arbeit eine durchschnittliche Vitalität von 79% auf. Die in dieser

Arbeit erzielten Vitalitäten sind mit den in der Literatur angegebenen Werten (70-98%) vergleichbar (Koebe *et al.*, 1999; Clement *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Korff, 2010). Hinsichtlich ihres Erscheinungsbildes unterschieden sich die Seehund- und Schweine-Hepatozyten nicht voneinander. Vergleicht man jedoch die Hepatozyten, die mit verschiedenen Methoden isoliert wurden, lässt sich ein Unterschied feststellen. Nur die Hepatozyten, die mit der Leberbiopsie Perfusion gewonnen wurden, hatten nach der Isolierung eine kreisrunde Zellform und bildeten im Laufe der Kultivierung einen Monolayer aus. Die Hepatozyten, die mit den übrigen Methoden isoliert wurden, scheinen durch die Prozedur geschädigt worden zu sein, auch wenn sich dies nicht mit dem Trypanblau-Ausschlusstest belegen lässt. Sie haben nach der Isolierung eine unregelmäßige Zellform und bilden keinen Monolayer aus.

Betrachtet man alle erwähnten Parameter eignet, sich nur die Leberbiopsie Perfusion zur Isolierungen primärer Seehund- und Schweine-Hepatozyten. Die Leberbiopsie Perfusion lässt sich ohne lange Vorbereitungszeit gut durchführen. Für den gesamten Ablauf werden ca. 3 h benötigt. Damit ist die Leberbiopsie Perfusion für die Gegebenheiten in der vorliegenden Arbeit (Beprobung der Seehunde nicht planbar) gut geeignet

Anhand der Ergebnisse der Leberbiopsie Perfusion wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Ausbeute bzw. Vitalität und den verschiedenen Isolierungsparametern gibt. Weder bei den Seehund- noch bei den Schweine-Hepatozyten konnte ein Zusammenhang zwischen Qualität der Zellsuspension und des Geschlechts des Tieres, der Größe des Leberstückes oder der Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und Beginn der Isolierung festgestellt werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien (Schulze-Bergkamen *et al.*, 2003; Serralta *et al.*, 2003; Vondran *et al.*, 2008). Auch zwischen der Dauer der einzelnen Perfusionsschritte und der Qualität der Zellsuspension konnte in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang detektiert werden. Ebenso wenig konnte eine Korrelation zwischen einer spezifischen Erkrankung der Tiere und der erzielten Ausbeute oder Vitalität hergestellt werden. Wobei hier berücksichtigt werden muss, dass es sich bei allen Seehunden, die in der vorliegenden Arbeit beprobt wurden, um erkrankte Tiere handelte. Zudem waren die Tiere meist von

diversen Erkrankungen gleichzeitig betroffen, so dass sich hierzu keine gesicherte Aussage treffen lässt.

Korff (2010) konnte in ihrer Arbeit eine negative Korrelation zwischen der Größe des verwendeten Leberstücks und der Zellausbeute herstellen. Kleinere Leberstücke lieferten eine höhere Zellzahl als größere Stücke. Dieser Zusammenhang besteht bei den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit ebenfalls, es werden jedoch häufig Abweichungen festgestellt. Im Gegensatz zu Korff (2010) konnte keine eindeutige Korrelation zwischen der Transportdauer und der Zellausbeute bzw. der Vitalität hergestellt werden.

5.4 Optimierungsversuche zur Leberbiopsie Perfusion

Um die Ausbeute und die Vitalität der isolierten Hepatozyten zu erhöhen, wurden Optimierungsversuche an Schweinelebern durchgeführt (s. Kapitel 3.5). Auf der Grundlage der Leberbiopsie Perfusion, wie sie in Kapitel 4.5.2.3 beschrieben wurde, sind folgende Parameter verändert worden.

Anstelle der Collagenase CLS IV wurden die Collagenasen NB4 und NB8 verwendet (s. Kapitel 3.5). In zwei weiteren Experimenten erfolgte der Lebertransport in UW-Lösung statt in Präperfusionspuffer. In Tabelle 5-10 sind die Ergebnisse der Leberbiopsie Perfusion an Schweinelebern mit den veränderten Parametern dargestellt.

Tabelle 5-10: Optimierungsversuche zur Leberbiopsie Perfusion. Ausbeute und Vitalität der isolierten Schweine-Hepatozyten.

| Tiernummer | veränderte Parameter | Gewicht des Leberstücks [g] | Zellausbeute pro g Leber ($\times 10^5$) | Vitalität nach Trypanblaufärbung [%] |
|------------|-------------------------------------|-----------------------------|--|--------------------------------------|
| S 14 | Collagenase: NB4 195 mg (0,18 U/mg) | 63 | 2,9 | 94 |
| S 17 | Collagenase: NB8 133 mg (0,9 U/mg) | 67 | 2,5 | 69 |
| S 18 | Transport in UW-Lösung | 96 | 1,8 | 63 |
| S 19 | Transport in UW-Lösung | 81 | 1,1 | 64 |

Durch den Einsatz der Collagenasen NB4 und NB8 konnte die Ausbeute nicht erhöht werden. Allerdings wiesen die Collagenasen NB4 und NB8 (laut Produktinformation) eine deutlich geringere Enzymaktivität (Faktor 1000) als die Collagenase CLS IV auf. Um dieselbe Collagenase-Aktivität im Puffer zu erhalten, hätten 250 g bzw. 50 g Collagenase verwendet werden müssen. Da dies aus experimentellen und ökonomischen Gründen nicht sinnvoll ist, wurde stattdessen die vom Hersteller empfohlene Konzentration verwendet. Anstelle von 300 U/ml (CLS IV) wurden 0,24 U/ml (NB4) bzw. 0,8 U/ml (NB8) eingesetzt. Da die mit den Collagenasen NB4 und NB8 erzielten Ausbeuten geringer ausfallen als bei den Experimenten mit der Collagenase CLS IV, scheinen die eingesetzten Enzymkonzentrationen zu gering zu sein, um eine ausreichende Dissoziation des Gewebes zu erreichen.

Da die Transportdauer der Schweineleber mit durchschnittlich 90 min relativ lang war, sollte getestet werden, ob sich Ausbeute und Vitalität durch den Transport in einer Konservierungslösung erhöhen lassen. Verwendet wurde hierfür die *University of Wisconsin Lösung* (UW-Lösung), die zum Transport von humanen Lebertransplantaten verwendet wird (s. Kapitel 3.5). Durch den Transport in der UW-Lösung konnte weder die Zellausbeute noch die Vitalität der Zellen gesteigert werden. Die Transportdauer kann hier nicht als Faktor in Frage kommen, durch den die Ausbeute und Vitalität entscheidend beeinflusst wurde. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen aus der Literatur an primären Schweine-Hepatozyten (Koebe *et al.*, 2000; Transportdauer 35-60 min) sowie Pferde-Hepatozyten (Bakala *et al.*, 2003; Transportdauer: 180-350 min) und humanen Hepatozyten (Serralta *et al.*, 2003; Transportdauer max. 85 min), die mittels Perfusion isoliert wurden.

5.5 Kultivierung der HepG2-Zellen

Zur Etablierung einiger Methoden und um die Ergebnisse der primären Hepatozyten besser einordnen zu können, wurde zusätzlich die permanente Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 kultiviert. Die HepG2-Zellen wiesen nach dem Auftauen bzw. Umsetzen eine kreisrunde Zellform auf und adhärirten binnen 3 h nach der Aussaat an den Boden der Zellkulturflaschen. Einen Tag nach der Aussaat begannen sich die

Zellen auszubreiten. Nach 3 Tagen bildeten die Zellen einen Monolayer aus (s. Abbildung 5-7).

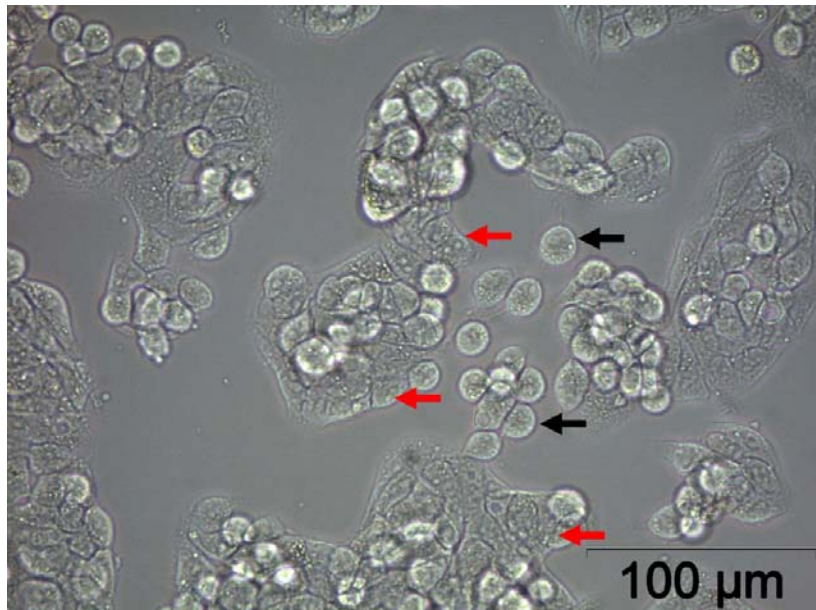


Abbildung 5-7: HepG2-Zellen 48 h nach der Aussaat (6.8.2008), Medium: RPMI, rote Pfeile: ausgebreitete Zellen; schwarzer Pfeile: nicht ausgebreitete Zellen; Vergr.: 200x

In Tabelle 5-11 kann das Datum der Aussaat der HepG2-Zellen entnommen werden.

Tabelle 5-11: Übersicht über die durchgeführten Experimente mit HepG2-Zellen

| Versuchsnummer | Datum | eingesetzte Zellzahl |
|----------------|------------|----------------------|
| H 1 | 17.02.2009 | $3,8 \times 10^6$ |
| H 2 | 24.02.2009 | $3,8 \times 10^6$ |
| H 3 | 27.05.2009 | $3,8 \times 10^6$ |
| H 4 | 22.06.2009 | $3,8 \times 10^6$ |
| H 5 | 29.06.2009 | $3,8 \times 10^6$ |

5.6 Vitalitätstests

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den drei Vitalitätstests XTT-, Harnstoff- und LDH-Test für die Seehund- und Schweine-Hepatozyten sowie für die HepG2-Zellen vorgestellt. Die Ergebnisse sind nach Test geordnet und werden innerhalb des Tests für die verschiedenen Zelltypen in der Reihenfolge Seehund- und Schweine-

Hepatozyten sowie HepG2-Zellen dargestellt. Am Ende eines jeden Kapitels der verschiedenen Vitalitätstests erfolgt eine vergleichende Diskussion über die drei Zelltypen. Zum Abschluss des Gesamtkapitels erfolgt eine umfassende Diskussion über die drei Vitalitätstests und die Zelltypen.

5.6.1 Bestimmung der allgemeinen Stoffwechselaktivität (XTT-Test)

Mit Hilfe des XTT-Tests können Aussagen zum allgemeinen Stoffwechsel der Zellen getroffen werden. Je höher die Absorptionswerte sind, desto höher ist die Stoffwechselaktivität der Zellen (s. Kapitel 3.7.2). Für die Messungen der Kontrollzellen und der Mediumkontrollen wurde eine Achtfach-Bestimmung durchgeführt. Bei den Zellen, die mit Schadstoffen inkubiert wurden, erfolgte eine Vierfach-Bestimmung. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden die Absorptionswerte der Mediumkontrolle von den Absorptionswerten der Proben abgezogen (wenn nicht anders angegeben).

5.6.1.1 Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test

Mittels XTT-Test soll die Vitalität der primären Seehund-Hepatozyten zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten (Tag 1-3 nach der Isolierung) untersucht werden. Als Datengrundlage dienten die isolierten Hepatozyten der Seehunde Pv 19, Pv 20, Pv 21, Pv 22 und Pv 23. Die Isolierung der Hepatozyten erfolgte mit der Leberbiopsie Perfusion. Als Nährmedium wurde WME eingesetzt. Von den Hepatozyten wurde zu jedem Zeitpunkt eine Achtfach-Bestimmung durchgeführt. Als Kontrollmessung diente Zellkulturmedium. Um die Werte besser vergleichen zu können, wurden die Absorptionswerte des Zellkulturmediums von denen der Proben abgezogen. Die Ergebnisse aus dem XTT-Test sind in Abbildung 5-8 dargestellt.

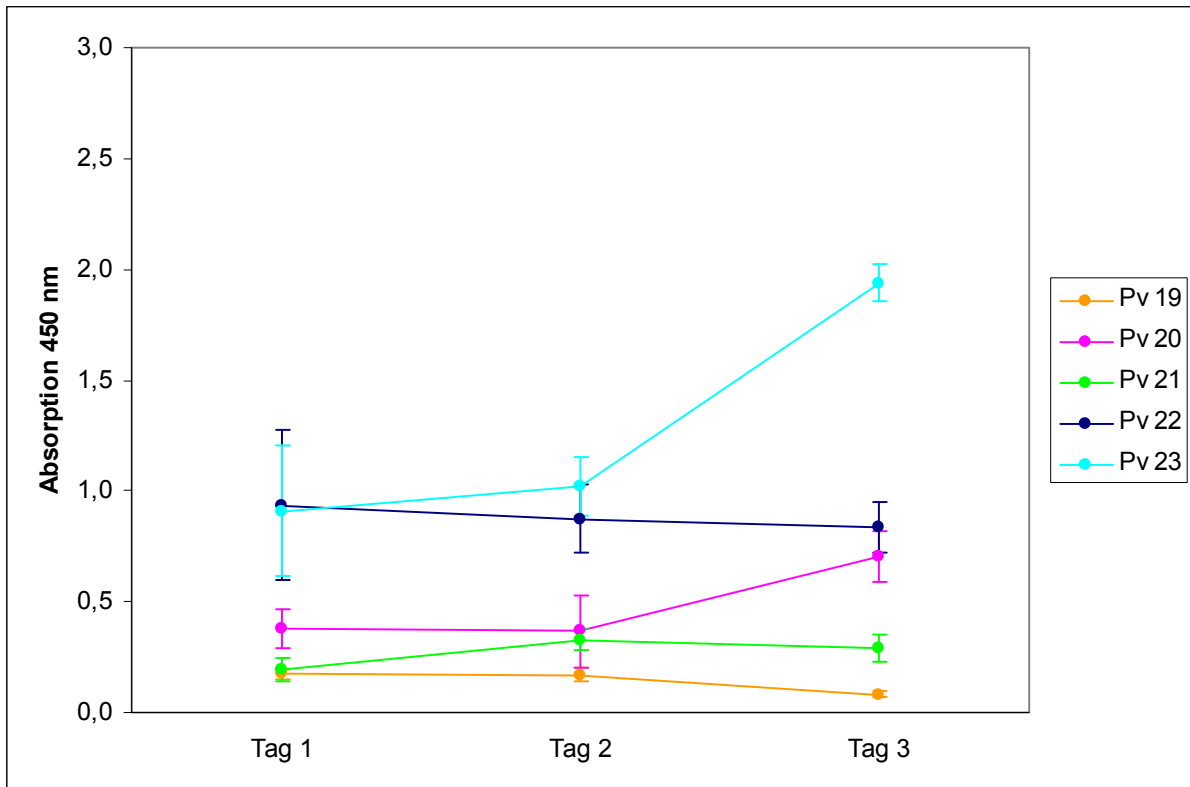


Abbildung 5-8: Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus je 8 Messungen; 1×10^4 Zellen/well. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

Dargestellt sind die Ergebnisse der XTT-Tests mit primären Seehund-Hepatozyten an den Tagen 1-3 nach der Isolierung. Die Absorptionswerte der Proben aus den einzelnen Tieren unterschieden sich am ersten Tag zum Teil deutlich voneinander und reichten von $0,2 \pm 0,02$ bei Pv 19 bis $0,9 \pm 0,03$ bei Pv 22. Sie wiesen jedoch zu jedem Zeitpunkt signifikant höhere Werte als das Medium auf ($p < 0,05$). Die Stoffwechselaktivität der primären Hepatozyten aus den Tieren Pv 20 und Pv 23 stieg im Laufe der Kultivierung an. Für die primären Hepatozyten aus den Tieren Pv 19, Pv 21 und Pv 22 konnte im Verlauf der Kultivierung eine leichte Abnahme der Stoffwechselaktivität beobachtet werden. Diese Abnahme war für Pv 19 und Pv 21 signifikant ($p < 0,05$).

5.6.1.2 Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test nach Schadstoffinkubation

Für den Erfolg des Zellkulturmodells ist es wichtig, dass die Schadstoffe bei den Hepatozyten zwar eine Veränderung auf Proteomebene hervorrufen, es aber nicht zu einem sichtbaren Verlust der Vitalität kommt (s. Kapitel 1 und 3.7).

Um zu überprüfen, ob die Inkubation mit PCB und PFOS bzw. deren Lösungsmittel (Isooctan + PCB; DMSO + PFOS) einen Einfluss auf die Vitalität der Hepatozyten hat, wurden die Zellen mit denselben Schadstoffkonzentrationen inkubiert, wie die Zellen in den Zellkulturflaschen (s. Kapitel 4.10). Die Seehund-Hepatozyten wurden hierfür an Tag 2 (48 h nach der Isolierung) mit den Schadstoffen versetzt und nach 24-stündiger Inkubation mit XTT vermessen (s. Kapitel 4.9.1). Dargestellt sind beispielhaft die Ergebnisse des XTT-Tests für Pv 22 (s. Abbildung 5-9). Weitere Ergebnisse (Pv 19, Pv 20, Pv 21 und Pv 23) sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 8-4 bis 9.7).

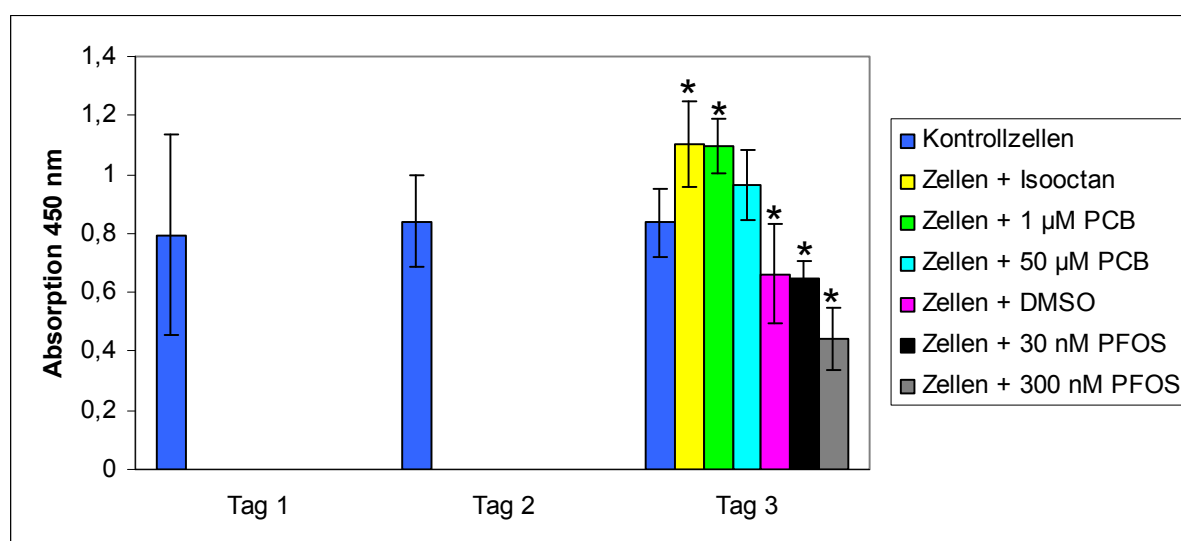


Abbildung 5-9: Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten (Pv 22) im XTT-Test nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

Auffällig war, dass die Zellen, die mit Isooctan bzw. 1 µM PCB inkubiert wurden signifikant höhere Werte aufwiesen als die Kontrollzellen an Tag 3. Bei den Tieren Pv 19 und Pv 23 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit

PCB-inkubierten Zellen und den Kontrollzellen festgestellt werden (Abbildung 8-4 und 8-7).

Die Inkubation der primären Seehund-Hepatozyten mit DMSO bzw. PFOS ergab ein anderes Bild. Die inkubierten Zellen zeigten signifikant geringere Werte als die Kontrollzellen (s. Abbildung 5-9). Die Absorptionswerte der Proben blieben aber weiterhin signifikant höher als die des Mediums. Diese Abnahme der Absorptionswerte konnte ebenfalls bei den Hepatozyten aus den Tieren Pv 20 und Pv 21 beobachtet werden (s. Abbildung 8-5 und 8-6). Die Hepatozyten aus dem Tier Pv 20 zeigten nach der Schadstoffinkubation keine Stoffwechselaktivität (kein signifikanter Unterschied zum Medium). Der Verlust der Stoffwechselaktivität lässt sich in diesem Fall auf einen Fehler bei der Schadstoffapplikation zurückführen. Statt 30 bzw. 300 nm PFOS wurden versehentlich 300 nM bzw. 3000 nM PFOS eingesetzt. Die DMSO-Konzentration betrug statt 0,1% nun 1% (v/v).

5.6.1.3 Diskussion der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test

Die Kurvenverläufe der Seehund-Hepatozyten (ohne Schadstoffinkubation) sind sehr heterogen (s. Abbildung 5-8). Während die mit dem XTT-Test ermittelte Stoffwechselaktivität bei den Hepatozyten aus Pv 20 und Pv 23 im Laufe der Kultivierung zunahm, konnte für Pv 19, Pv 21 und Pv 22 eine Abnahme der Aktivität beobachtet werden. Dahingegen stellte Korff (2010) einen einheitlichen Kurvenverlauf (Anstieg der Stoffwechselaktivität) für die von ihr untersuchten Seehund-Hepatozyten fest. Die unterschiedlich hohen Stoffwechselaktivitäten der Hepatozyten aus den einzelnen Seehunden, lassen sich weder mit minimalen Abweichungen in der Isolierung (Dauer der Präperfusion oder Perfusion), noch mit verschiedenen langen Zeitspannen zwischen Eintritt des Todes und Leberentnahme korrelieren. Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen den pathologischen Befunden oder der von Ahrens gemessenen PFOS-Belastung (Ahrens *et al.*, 2009a,b; s. Tabelle 5-2 und 5-3) und den Ergebnissen des XTT-Tests aufgedeckt werden. Es scheint sich hierbei um individuelle Unterschiede in der Stoffwechselaktivität zu handeln. Bei der Kultivierung humaner Hepatozyten konnte Modest (2009) eine ähnliche Beobachtung machen.

Die Zellpräparationen aus den einzelnen Lebern unterschieden sich sowohl in der Höhe der Stoffwechselaktivität (gemessen mit dem MTT-Test) als auch im Verlauf derselbigen. Korff (2010) stellte ebenfalls individuelle Unterschiede zwischen den Zellpräparationen aus verschiedenen Seehund-Lebern fest. Die Gründe für diese Unterschiede sind vielfältig und könnten z. B. auf den Ernährungszustand, genetische Faktoren und Umwelteinflüsse zurückzuführen sein (Bayliss und Somers, 2005).

Eine Inkubation mit Isooctan bzw. PCB führte bei den Hepatozyten aus den Tieren Pv 19 (♂) und Pv 23 (♂) zu keiner signifikanten Veränderung der Absorptionswerte. Bei Pv 22 (♂) war ein signifikanter Anstieg der Werte nach einer Inkubation mit Isooctan bzw. 1 µM PCB zu beobachten. Der Anstieg der XTT-Werte könnte durch eine Zunahme der Mitochondrien-Zahl bedingt sein. Eine Erhöhung der Mitochondrien-Zahl würde zu einem vermehrten Ablauf der Atmungskette führen und sich in höheren Absorptionswerten im XTT-Test niederschlagen. In einer *in vivo* Studie an Ratten konnten Gilroy *et al.* (1998) eine Zunahme der Mitochondrien-Zahl in den Hepatozyten von weiblichen Ratten nach oraler Aufnahme von PCB 77 detektieren. Bei männlichen Ratten konnte allerdings keine analoge Zunahme festgestellt werden. Eine Zunahme der Mitochondrien Anzahl (unabhängig vom Geschlecht) konnten Connell *et al.* (1999), ebenfalls in Fressexperimenten mit Ratten, nachweisen. In Fressexperimenten an Fischen mit PCB-haltigem Futter konnte eine Erhöhung der Mitochondrien-Zahl in beiden Geschlechtern nachgewiesen werden (Quabius *et al.*, 1997). In der Literatur sind keine *in vitro* Experimente beschrieben, in denen es nach einer Inkubation mit PCBs zu einem Anstieg der Mitochondrien-Zahl kommt bzw. in denen dies untersucht wurde. Die genaue Ursache des Absorptionsanstieges lässt sich nicht klären. Die eingesetzten PCB-Konzentrationen zeigten im XTT-Test keine zelltoxische Wirkung auf die Seehund-Hepatozyten.

Die Seehund-Hepatozyten reagierten auf eine Inkubation mit PFOS einheitlich. Bei den Hepatozyten aus den Tieren Pv 20, Pv 21 und Pv 23 kam es zu einem signifikanten Abfall der Stoffwechselaktivität (s. Abbildung 5-9; 8-5 und 8-6), wobei die Abnahme bei Pv 20 durch einen Fehler in der Schadstoffapplikation bedingt ist. Statt 1 µl DMSO (entspricht: 0,1% DMSO; 30 nM bzw. 300 nM PFOS) wurden 10 µl der entsprechenden Lösungen pro *well* eingesetzt (entspricht: 1% DMSO; 300 nM

bzw. 3000 nM PFOS). Nach der Inkubation mit den genannten Schadstoff-Konzentrationen kam es im XTT-Test zu einem vollständigen Verlust der Stoffwechselaktivität (kein signifikanter Unterschied zum Medium).

Die Hepatozyten aus den Tieren Pv 21 und Pv 23 zeigten nach der Schadstoffinkubation zwar ebenfalls ein Absinken der Stoffwechselaktivität, sie wiesen aber weiterhin signifikant höhere Absorptionswerte als das Medium auf. Da bereits eine Inkubation mit DMSO zu einer Verringerung der Absorptionswerte führte, scheint die hier gewählte Konzentration (0,1% im Medium) zu hoch zu sein. Deshalb lässt sich der Einfluss der PFOS-Konzentration in der vorliegenden nicht hinreichend beurteilen. Thomé *et al.* (1995) stellten bei einer Inkubation von Ratten-Hepatozyten mit Aroclor 1254 fest, dass eine DMSO-Konzentration im Medium von 0,2% nicht überschritten werden sollte. Da die DMSO-Konzentration in der vorliegenden Arbeit geringer ist, scheinen die Seehund-Hepatozyten sensibler auf eine Inkubation mit DMSO zu reagieren als die Ratten-Hepatozyten.

Korff (2010) konnte keine Abnahme der Stoffwechselaktivität nach einer Inkubation von Seehund-Hepatozyten mit DMSO bzw. PFOS feststellen. Selbst eine Inkubation mit 30.000 nM PFOS führte nicht zu einer Verringerung der Absorptionswerte. Die gewählten PFOS-Konzentrationen hatten somit keinen negativen Einfluss auf die mit dem XTT-Test gemessene Stoffwechselaktivität. Die in der Arbeit von Korff (2010) verwendete DMSO-Konzentration betrug in den Proben 0,01% (v/v).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme der Stoffwechselaktivität im XTT-Test der Seehund-Hepatozyten nach einer Inkubation mit DMSO bzw. PFOS scheint somit in der DMSO-Konzentration begründet zu sein, weshalb eine Beurteilung der Ergebnisse schwierig ist.

5.6.1.4 Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test

Die mit dem XTT-Test bestimmte Vitalität der primären Schweine-Hepatozyten (ohne Schadstoffinkubation) ist in Abbildung 5-10 dargestellt. Isoliert wurden die Hepatozyten mit der Leberbiopsie Perfusion. Die Kultivierung erfolgte in WME. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der Proben abgezogen.

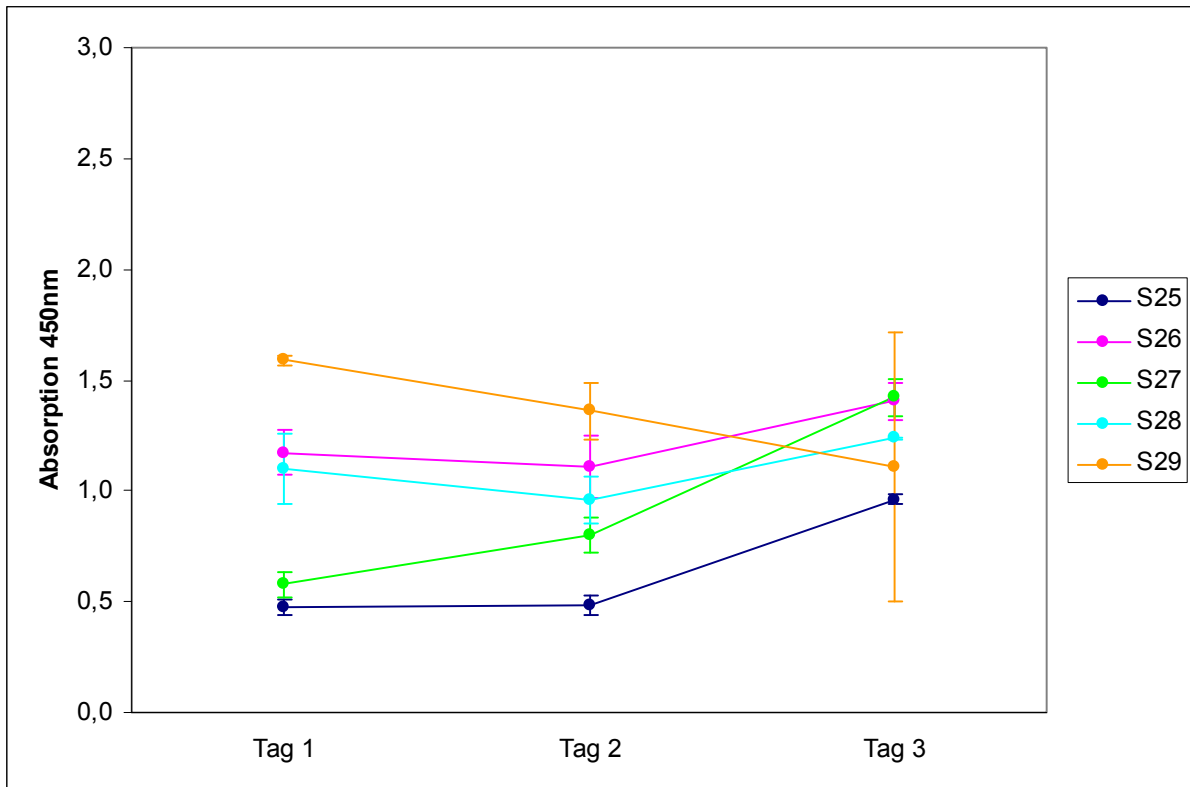


Abbildung 5-10: Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test (in WME). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus je 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

Die Absorptionswerte des von den Zellen umgesetzten Farbstoffs an Tag 1 schwankten zwischen $0,48 \pm 0,03$ (S 25) und $1,59 \pm 0,02$ (S 26). Im Laufe der dreitägigen Kultivierung nahmen die Absorptionswerte zu. Aufgrund der hohen Standardabweichung bei S 29 an Tag 3 kann hier keine Aussage hinsichtlich einer Zu- oder Abnahme der Werte gemacht werden. An allen Tagen waren die Absorptionswerte der Proben signifikant höher als die der Mediumkontrollen ($p < 0,05$).

5.6.1.5 Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test nach Schadstoffinkubation

In Abbildung 5-11 sind die Ergebnisse des XTT-Tests mit primären Schweine-Hepatozyten mit und ohne Schadstoffinkubation zu sehen. Die Hepatozyten wurden mit der Leberbiopsie Perfusion aus S 25 gewonnen und in WME kultiviert. Die Schadstoffzugabe erfolgte an Tag 2. Weitere Abbildungen befinden sich im Anhang (s. Abbildungen 8-2 und 8-3). Um zu überprüfen, ob die Schadstoffe selbst (ohne

Zellen) eine Farbreaktion hervorrufen, wurde Medium mit 50 μM PCB bzw. 300 nM PFOS inkubiert und vermessen. Es konnte kein Unterschied zum Kontrollmedium festgestellt werden.

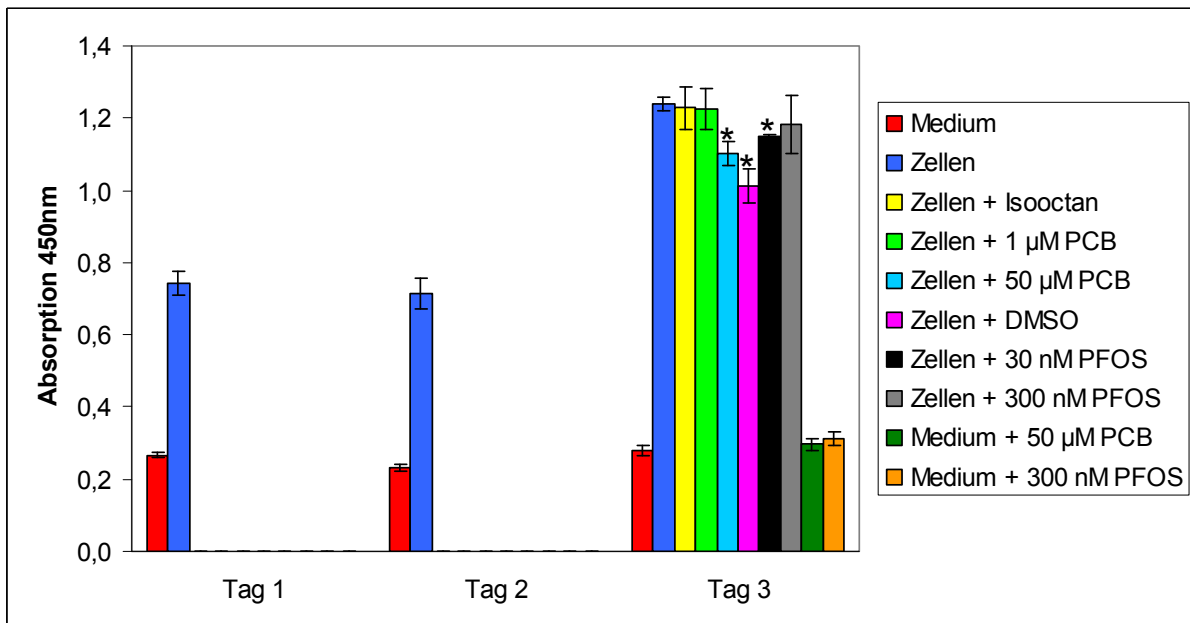


Abbildung 5-11: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten (S 25) im XTT-Test nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, Zellkulturmedium: WME; signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*)

Die Schweine-Hepatozyten aus S 23, S 25 und S 29, die mit Isooctan oder 1 μM PCB inkubiert wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen an Tag 3 (s. Abbildung 6-11, 8-2 und 8-3). Die Hepatozyten aus S 25, die mit 50 μM PCB, DMSO bzw. 30 nM PFOS inkubiert wurden, wiesen signifikant niedrigere Absorptionswerte auf als die Kontrollzellen ($p < 0,05$) (s. Abbildung 5-11). Bei den Hepatozyten, die aus S 23 und S 29 isoliert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den schadstoffinkubierten Zellen und den Kontrollzellen festgestellt werden (s. Abbildung 8-2 und 8-3). Sämtliche Hepatozyten lieferten an allen Tagen signifikant höhere Absorptionswerte als das Medium ($p < 0,05$).

Die mittels XTT-Test gemessene Stoffwechselaktivität der primären Schweine-Hepatozyten wurde durch die verwendeten Schadstoffkonzentrationen nur geringfügig beeinträchtigt. Lediglich bei den Zellen aus S 25 konnte bei einigen Schadstoffkonzentrationen (50 μM PCB; DMSO; 30 nM PFOS) eine signifikante Abnahme der Aktivität festgestellt werden.

5.6.1.6 Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode

Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Wahl der Isolierungsmethode einen Einfluss auf die Vitalität der primären Hepatozyten hat. Hierzu wurden primäre Schweine-Hepatozyten aus den Lebern S27-S29 mit den Isolierungsmethoden Gewebedissoziation in Medium (GdM) und Leberbiopsie Perfusion (LbP) isoliert und ihre Vitalität mit dem XTT-Test ermittelt. Die Kultivierung erfolgte in WME. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist in Abbildung 5-12 dargestellt.

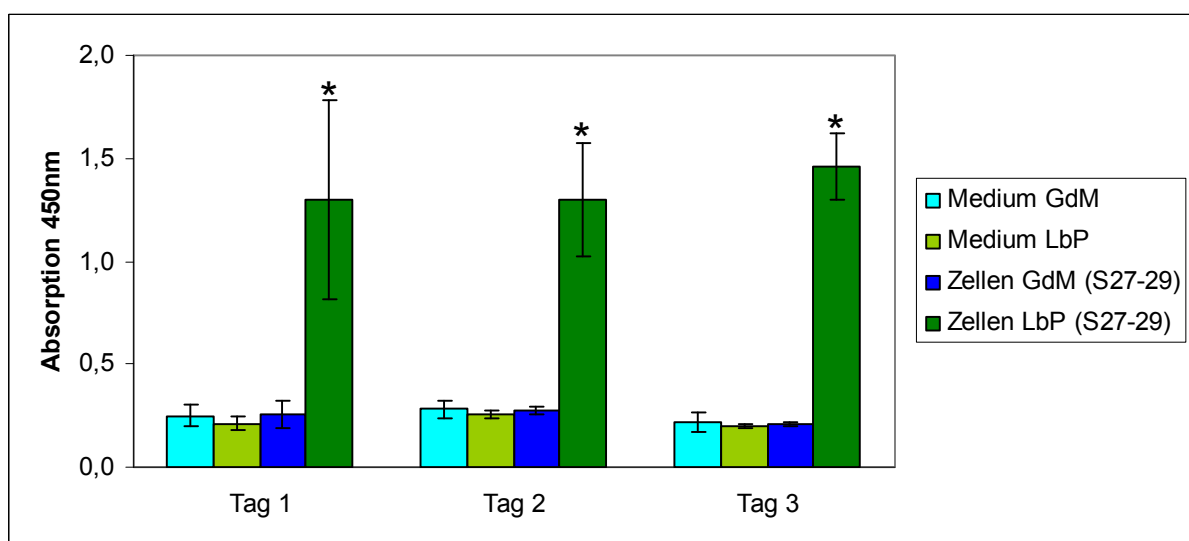


Abbildung 5-12: Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode (Leberbiopsie Perfusion und GdM). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, Medium: WME, signifikanter Unterschied zum entsprechenden Medium: $p < 0,05$ (*)

Die mittels Leberbiopsie Perfusion isolierten Hepatozyten wiesen ca. viermal so hohe Absorptionswerte auf, wie die mittels GdM isolierten Zellen ($p < 0,05$) und unterschieden sich zu jedem Zeitpunkt signifikant vom Medium ($p < 0,05$). Die Hepatozyten, die mit GdM isoliert wurden zeigten keinen signifikanten Unterschied zum Medium. Eine Isolierung mit der Leberbiopsie Perfusion führte somit zu einer signifikant höheren Vitalität der Hepatozyten.

5.6.1.7 Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test in Abhängigkeit vom Kulturmedium

Mit dem folgenden Experiment sollte der Einfluss des Kulturmediums auf die Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test analysiert werden. In Abbildung 5-13 sind die Ergebnisse des XTT-Tests für die Schweine-Hepatozyten, die in Hepatozyt-SFM bzw. WME Medium kultiviert wurden im Vergleich dargestellt. Zur Isolierung der Zellen wurde jeweils die Leberbiopsie Perfusion angewendet. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

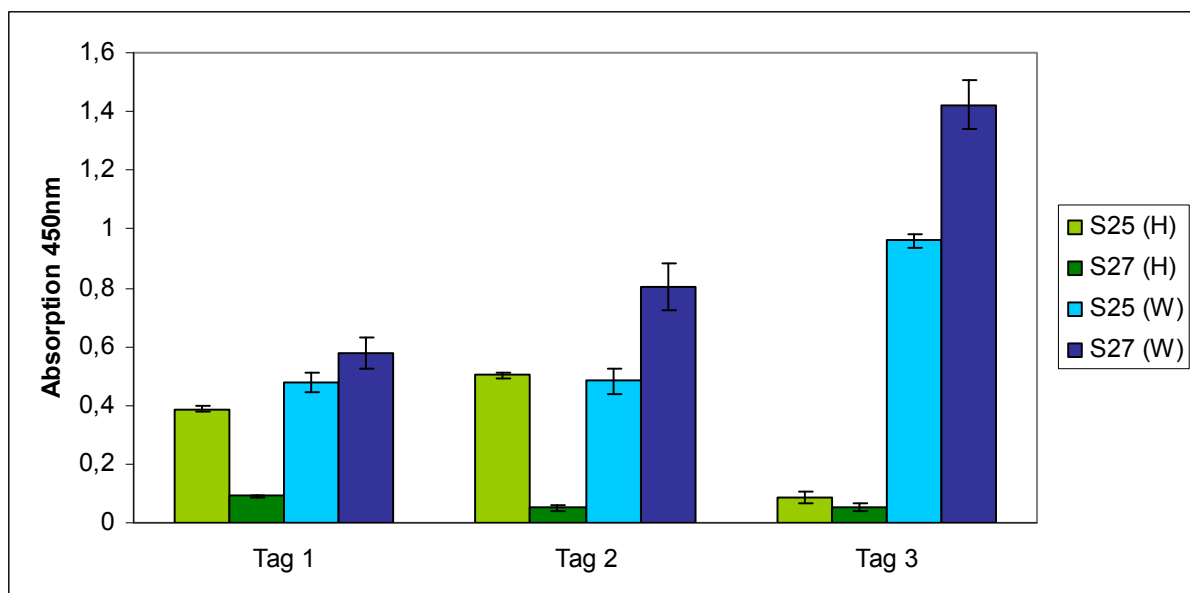


Abbildung 5-13: Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus je 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well. Isolierungsmethode: LbP; die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9), H = Hepatozyt-SFM, W = WME. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

Die Auswirkung der beiden verwendeten Medien auf die Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten ließ kein einheitliches Muster erkennen. Die Hepatozyten, die aus S 27 isoliert und in WME kultiviert wurden, wiesen zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Absorptionswerte auf als die in Hepatozyt-SFM kultivierten Zellen aus S 27 ($p < 0,05$). Die in WME kultivierten Hepatozyten aus S 25 wiesen nur an Tag 3 signifikant höhere Absorptionswerte auf als die Zellen in Hepatozyt-SFM ($p < 0,05$). Alle in WME kultivierten Zellen lieferten zu jedem Zeitpunkt signifikant

höhere Werte als das Medium ($p < 0,05$). Für die in Hepatozyme-SFM kultivierten Hepatozyten traf dies nur auf die Zellen aus S 25 ($p < 0,05$) an allen Kultivierungstagen zu. Die Hepatozyten aus S 27 lieferten nur an Tag 1 ($p < 0,05$) signifikant höhere Werte als das dazugehörige Medium.

Ein Beispiel für das Erscheinungsbild primärer Schweine-Hepatozyten, die in Hepatozyme-SFM Medium kultiviert wurden, ist in Abbildung 5-14 (A) zu sehen. Die Zellen hefteten sich nicht an den Boden der Kulturflaschen an und breiteten sich nicht aus. In Abbildung 5-14 (B) sind primäre Schweine-Hepatozyten zu sehen, die in WME kultiviert wurden. Nur die in WME kultivierten Hepatozyten bildeten einen Zellrasen aus.

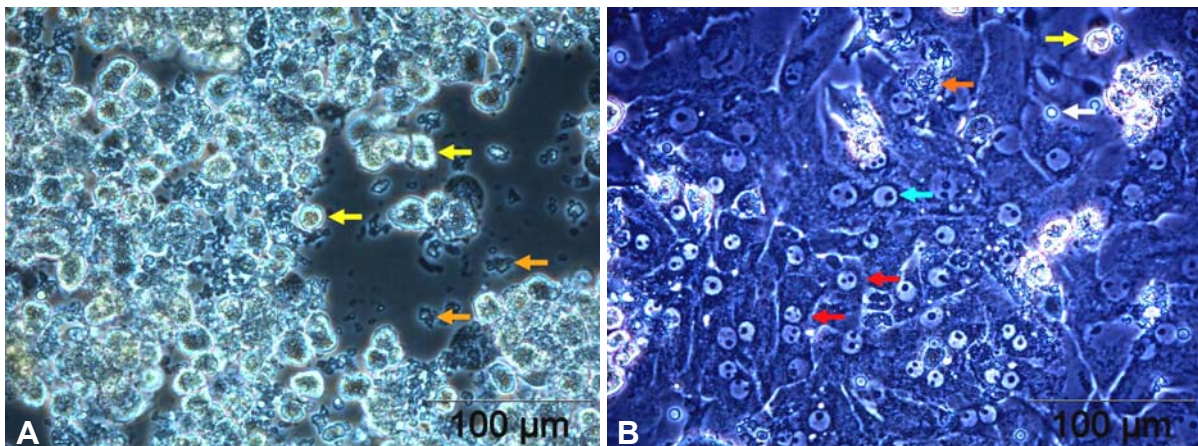


Abbildung 5-14: Primäre Schweine-Hepatozyten 48 h nach Isolierung (S 27), A: Hepatozyme-SFM, B: WME; rote Pfeile: ausgebreiteten Hepatozyten; blaue Pfeile: Zellkern; orangefarbene Pfeile: Zelltrümmer; weiße Pfeile: Erythrozyten; gelbe Pfeile: nicht ausgebreitete Hepatozyten; Vergr.: 200x, Phasenkontrast

5.6.1.8 Diskussion der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test

Vergleicht man die XTT-Werte der primären Schweine-Hepatozyten aus den einzelnen Schweinelebern untereinander, ergibt sich ein heterogenes Bild (Abbildung 5-10). Die Ausgangswerte (XTT-Werte an Tag 1) der einzelnen Hepatozyten-Präparationen sind sehr unterschiedlich. Diese Heterogenität lässt sich vermutlich auf individuelle Unterschiede bei den Tieren zurückführen, da sie weder den Isolierungsparametern (Transportdauer, Prä- und Perfusionsdauer) noch mit dem

Geschlecht der Tiere korrelieren. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Seehund-Hepatozyten (s. Kapitel 5.6.1.3) und aus der Literatur (Modest, 2009; Korff, 2010). Diese Unterschiede könnten z. B. im Ernährungszustand, durch genetische Faktoren oder Umwelteinflüssen begründet sein (Bayliss und Somers, 2005). Der Kurvenverlauf der XTT-Werte über die drei Kultivierungstage ist dagegen, bis auf eine Ausnahme, einheitlich. Die Stoffwechselaktivität nimmt bei allen Hepatozyten-Präparationen zum Ende der Kultivierung zu. Einzige Ausnahme stellen die Hepatozyten aus S 29 dar. Für diese Zellen kann keine Aussage hinsichtlich einer Zu- oder Abnahme der Werte gemacht werden, da die Standardabweichung zu groß ist. Der Kurvenverlauf der übrigen Zellpräparationen könnte auf eine Adaptation an die Kulturbedingungen zurückzuführen sein. Korff (2010) stellte ebenfalls eine kontinuierliche Zunahme der Stoffwechselaktivität bei einer dreitägigen Kultivierung primärer Schweine-Hepatozyten fest. Zudem konnte Korff, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, individuelle Unterschiede hinsichtlich der Stoffwechselaktivität bei den verschiedenen Zellpräparationen beobachten (Korff, 2010).

Die Schweine-Hepatozyten reagierten unterschiedlich sensibel auf eine Schadstoffinkubation. Während die Zellen aus S 23 und S 29 keine signifikante Reaktion auf die Inkubation mit den Schadstoffen zeigten (s. Abbildung 8-2 und 8-3), traten bei den Zellen aus S 25 Änderungen in der Stoffwechselaktivität auf (s. Abbildung 5-11). Die Hepatozyten aus S 25, die mit 50 μM PCB, DMSO bzw. 30 nM PFOS inkubiert wurden, wiesen im XTT-Test signifikant niedrigere Absorptionswerte auf als die Kontrollzellen (s. Abbildung 5-11). Die Absorptionswerte im Test lagen dennoch deutlich über denen des Mediums, womit die Hepatozyten weiterhin stoffwechselaktiv waren. Individuelle Unterschiede in der Stoffwechselaktivität primärer Schweine-Hepatozyten nach Schadstoffinkubation konnte auch Korff (2010) in ihrer Arbeit detektieren. Ein Absinken der Stoffwechselaktivität konnte nach einer Inkubation mit 30 nM bzw. 30 μM PFOS für ein Individuum beobachtet werden. Viele Studien zeigen, dass unter anderem die Induktion verschiedener Enzyme des P450-Enzymsystems, die am Abbau von Schadstoffen beteiligt sind, von Individuum zu Individuum verschieden ist (Smith *et al.*, 1998; Ingelman-Sundberg, 2005). Diese Unterschiede werden durch individuelle Abweichungen in der Enzymausstattung (genetische Mutation) der Enzyme bedingt (Ingelman-

Sundberg, 2005). Möglicherweise könnten diese Unterschiede auch die individuelle Reaktion der Zellen auf eine Schadstoffinkubation im XTT-Test erklären.

Ein Vergleich der beiden Isolierungsmethoden GdM und LbP ergab ein eindeutiges Ergebnis. Die Hepatozyten, die mit der GdM Methode isoliert wurden, zeigten im XTT-Test keine Stoffwechselaktivität (Absorptionswerte nicht signifikant höher als Mediumwerte). Die Zellen scheinen durch den Isolierungsprozess stark geschädigt zu sein. Diese Schädigung betrifft offenbar nicht die Zellmembran, da andernfalls die mit Trypanblau ermittelte Vitalität geringer ausgefallen wäre. Die mit Trypanblau bestimmte Vitalität ist signifikant jedoch höher als bei den mittels Leberbiopsie Perfusion isolierten Hepatozyten (96% vs. 80%) (s. Tabelle 5-7 und 5-9). Die Hepatozyten, die mit der Leberbiopsie Perfusion isoliert wurden, wiesen hohe Absorptionswerte und damit eine hohe Stoffwechselaktivität auf (s. Abbildung 5-12). Die Ergebnisse des XTT-Tests zeigen, dass mit der GdM Methode keine stoffwechselaktiven Hepatozyten isoliert werden konnten.

Zum Vergleich der beiden Zellkulturmedien Hepatozyte-SFM und WME wurden Schweine-Hepatozyten eingesetzt, die mit der Leberbiopsie Perfusion isoliert wurden. Die in WME kultivierten Zellen zeigten im XTT-Test eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität als die in Hepatozyte-SFM kultivierten Zellen. Das Hepatozyte-SFM Medium eignet sich offensichtlich schlechter zur Kultivierung der primären Schweine-Hepatozyten als das WME, welches in vielen Studien zur Kultivierung primärer Hepatozyten zum Einsatz kommt (Clement *et al.*, 2001; Dabos *et al.*, 2004; Hamel *et al.*, 2006; Guruge *et al.*, 2009).

5.6.1.9 Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen im XTT

In Abbildung 5-15 sind die Ergebnisse der XTT-Tests mit HepG2-Zellen ohne Schadstoffinkubation dargestellt. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

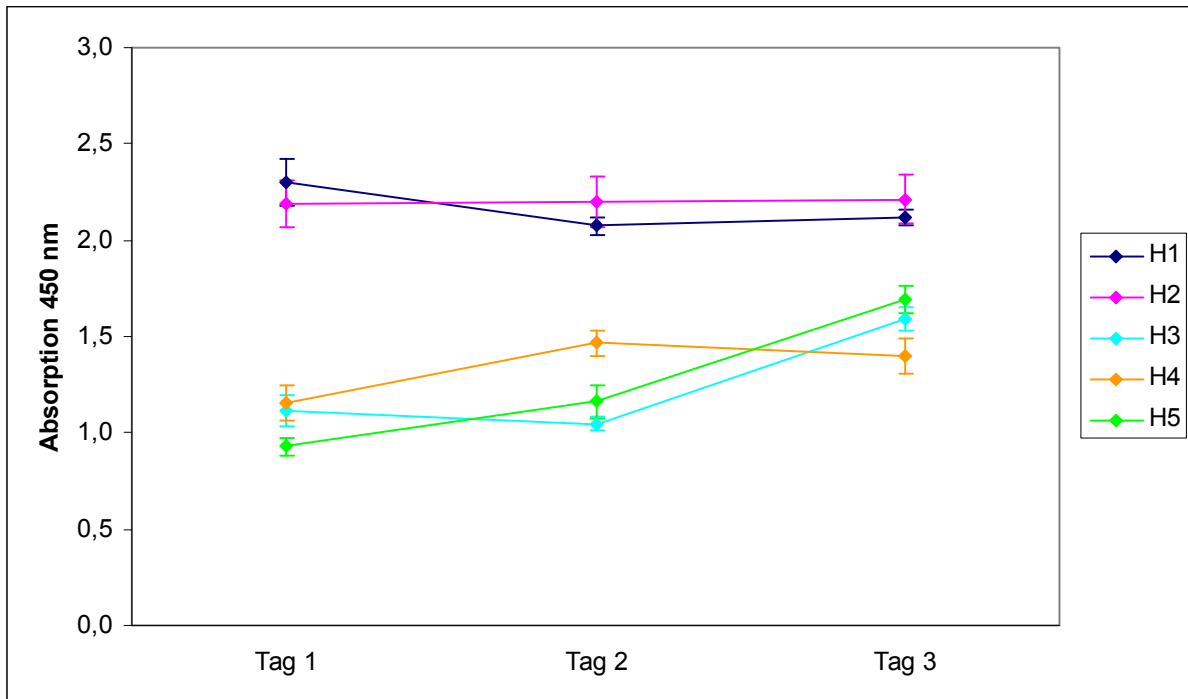


Abbildung 5-15: Stoffwechselaktivität der HeG2-Zellen im XTT-Test. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus je mind. 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

Die Absorptionswerte der Zellen reichten an Tag 1 von $0,9 \pm 0,04$ (H 5) bis $2,3 \pm 0,12$ (H 1) (s. Abbildung 5-15). An allen Tagen wiesen die Zellen signifikant höhere Absorptionswerte auf als das Medium ($p < 0,05$) und waren somit stoffwechselaktiv. Bei H 3 und H 5 kam es zu einer Zunahme der Absorptionswerte an Tag 3. Die Absorptionswerte von H 1 und H 2 blieben während der drei Kultivierungstage konstant. Die Werte aus H 4 stiegen an Tag 2 zunächst an und fielen an Tag 3 leicht ab. Es ließ sich kein einheitlicher Trend in der Entwicklung der Stoffwechselaktivität im Verlauf der dreitägigen Kultivierung feststellen. In der Literatur wird eine Zunahme der Absorptionswerte bei einer viertägigen Kultivierung beschrieben (Hsu *et al.*, 2004).

5.6.1.10 Veränderung der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen im XTT-Test nach Schadstoffinkubation

Um den Einfluss einer Schadstoffinkubation auf die HepG2-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit Isooctan, PCB, DMSO und PFOS inkubiert (s. Kapitel 4.10). Die Ergebnisse des XTT-Tests mit HepG2-Zellen (H3 und H5) nach Schadstoff-

inkubation sind in Abbildung 5-16 gezeigt. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der Proben abgezogen.

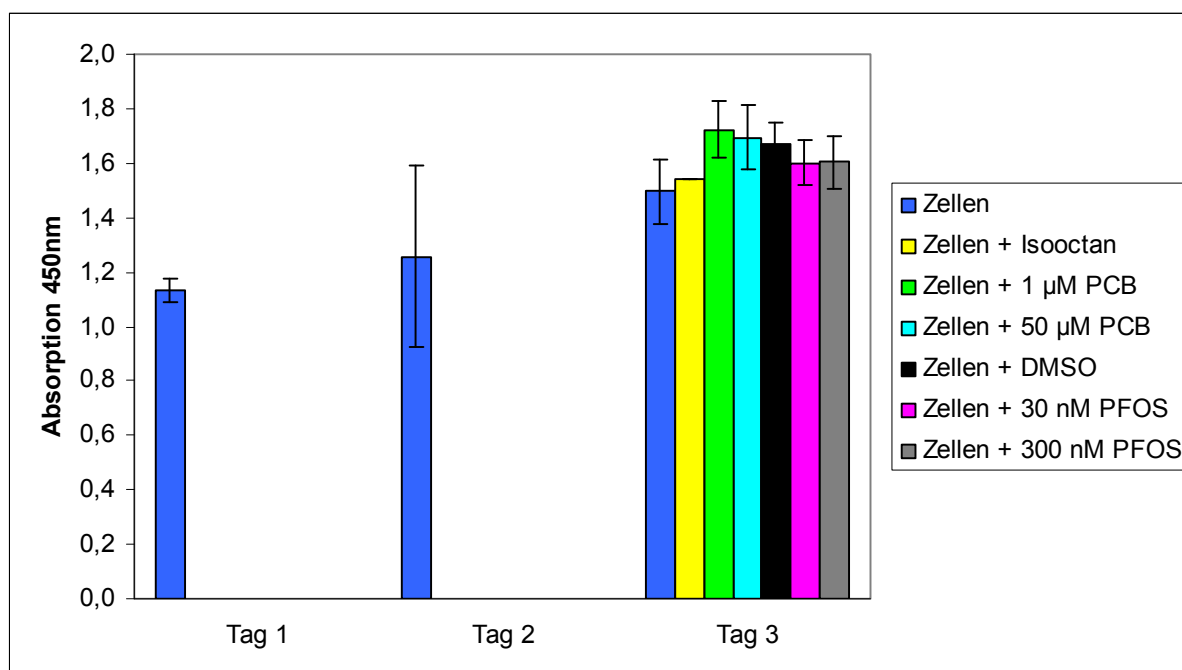


Abbildung 5-16: Veränderung der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen (H 3 und H 5) nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

Abgebildet sind beispielhaft die Ergebnisse der HepG2-Zellen aus H 3 und H 5. Im Anhang sind die Ergebnisse aus weiteren Experimenten abgebildet (s. Abbildung 8-1). Alle Zellen wiesen zu jedem Zeitpunkt signifikant höhere Werte als das Medium auf ($p < 0,05$). Die mit Schadstoffen inkubierten HepG2-Zellen wiesen bei allen Experimenten keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen an Tag 3 auf (s. Abbildung 5-16 und 8-1).

Eine Inkubation mit PCB bzw. PFOS führte bei den HepG2-Zellen zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der mit dem XTT-Test ermittelten Vitalität.

5.6.1.11 Diskussion der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen lassen sich hinsichtlich der XTT-Ergebnisse in zwei Gruppen einteilen. Die Zellen, aus H 1 und H 2 zeigten eine einheitlich höhere Stoffwechselaktivität (durchschnittlich $2,2 \pm 0,09$) als die Zellen aus H 3, H 4 und H 5

(durchschnittlich $1,3 \pm 0,07$) (s. Abbildung 5-15). Innerhalb der Gruppen sind die Werte sehr ähnlich. Alle untersuchten Zellen wurden drei Wochen vor Durchführung der Zelltests aufgetaut und zweimal passagiert. Da es in Zelllinien im Allgemeinen häufig zu spontanen Mutationen kommt (Freshney, 2005), könnten die Unterschiede in der Stoffwechselaktivität evtl. durch eine unterschiedliche Anzahl der Passagen vor dem Einfrieren bedingt sein (Boxberger, 2007). Die HepG2-Zellen wurden von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen verwendet. Es wurde nicht vermerkt wie oft die Zellen vor dem Einfrieren passagiert wurden.

Im XTT-Test konnte kein signifikanter Einfluss der Schadstoffinkubation auf die Vitalität der HepG2-Zellen nachgewiesen werden (s. Abbildung 5-16 und 8-1).

5.6.1.12 Vergleichende Diskussion der Stoffwechselaktivität bei den verschiedenen Zelltypen

Ein Vergleich der verschiedenen Zellen hinsichtlich der Reaktion auf eine Schadstoffinkubation zeigt, dass sowohl zwischen den Gruppen (verschiedene Zellen), als auch innerhalb der Gruppen, Unterschiede zu erkennen sind. Sowohl bei den Seehund-, als auch bei den Schweine-Hepatozyten, reagierten die Zellen aus den einzelnen Tieren teilweise unterschiedlich empfindlich auf die Schadstoffe. Die HepG2-Zellen zeigten sich gegenüber einer Inkubation mit Schadstoffen unsensibel. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die gewählten Schadstoffkonzentrationen, wie erwartet, in keinem Fall zu einem Verlust der mit dem XTT-Test ermittelten Vitalität führen.

5.6.2 Nachweis der spezifischen Stoffwechselaktivität (Harnstoff-Test)

Um die Hepatozyten für das Zellkulturmodell einsetzen zu können ist es wichtig, dass diese neben ihrem allgemeinen Stoffwechsel (analysiert mit dem XTT-Test) auch ihren spezifischen Metabolismus beibehalten. Eine Beurteilung der spezifischen Stoffwechselaktivität erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand der Harnstoffsynthese (s. Kapitel 3.7.3). Für die Anwendbarkeit des Zellkulturmodells ist es zudem entscheidend, dass die in den Inkubationsexperimenten verwendeten Schadstoffe nicht zu einem Absterben der Zellen führen. Die Schadstoffinkubation erfolgte an Tag 2 der Zellkultivierung nach dem Mediumwechsel (s. Kapitel 4.10). Somit ent-

halten die Kulturen lediglich an Tag 3 Schadstoffe. Um die Auswirkungen der Schadstoffinkubation zu ermitteln, wurden die Harnstoffwerte an Tag 2 und Tag 3 miteinander verglichen und statistisch analysiert. In den folgenden Abschnitten ist der Verlauf der Harnstoffsynthese der primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten sowie der HepG2-Zellen dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten, wurden die Harnstoffwerte des Kontrollmediums von den Ergebnissen der Proben subtrahiert.

5.6.2.1 Harnstoffsynthese der Seehund-Hepatozyten mit Schadstoffinkubation

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Harnstoffsynthese für die primären Seehund-Hepatozyten vor und nach der Inkubation mit PCB bzw. PFOS zusammengefasst. Die Ergebnisse der PCB-Inkubation der Seehund-Hepatozyten aus den Tieren Pv 19, Pv 22 und Pv 23 sind in Abbildung 5-17 dargestellt.

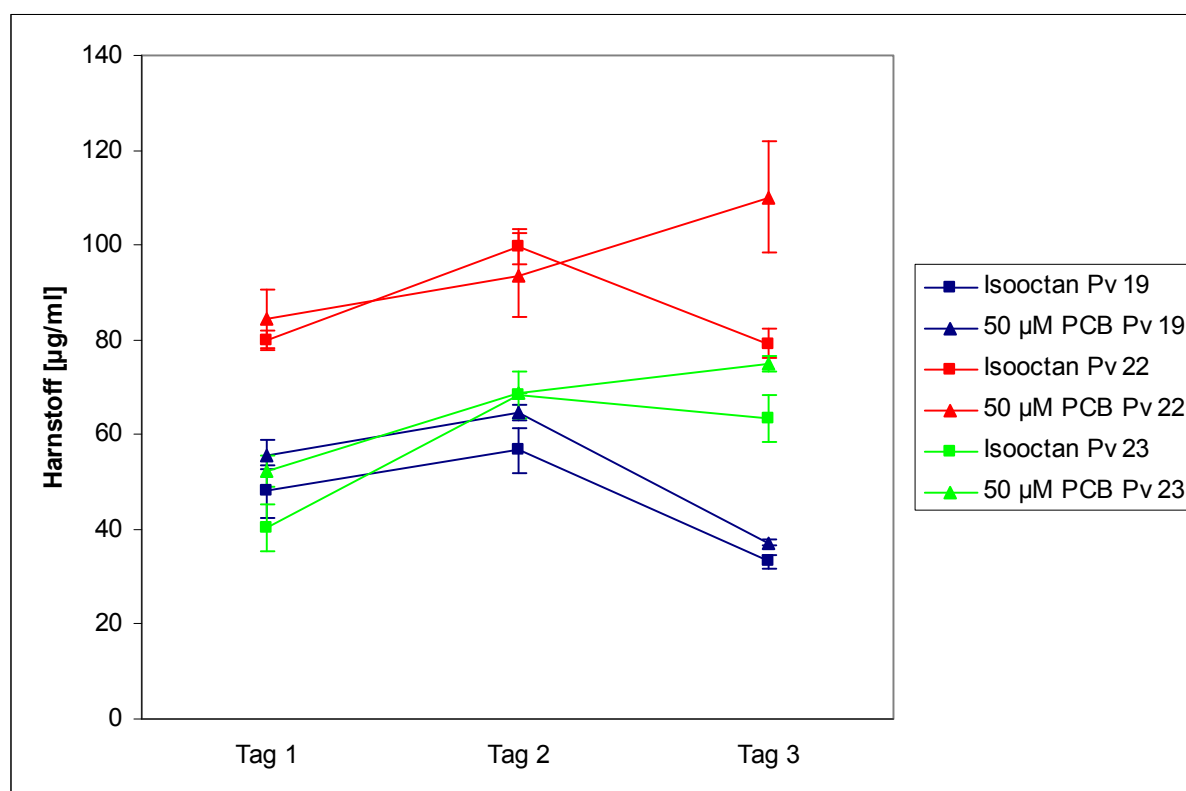


Abbildung 5-17: Von den primären Seehund-Hepatozyten ($3,8 \times 10^6$ Zellen) gebildete Harnstoffmengen vor und nach Isooctan- bzw. PCB-Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Messungen. Zugabe von Isooctan und PCB an Tag 2. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Die Kurvenverläufe der synthetisierten Harnstoffmengen sind sehr heterogen und lassen keine eindeutige Tendenz erkennen. Bei den Hepatozyten aus Pv 19 wurden

die höchsten Harnstoffmengen an Tag 2 synthetisiert ($p < 0,05$). Die Harnstoffwerte verringerten sich signifikant nach der Inkubation mit Isooctan bzw. $50 \mu\text{M}$ PCB ($p < 0,05$). Für die Hepatozyten aus Pv 22, die mit $50 \mu\text{M}$ PCB inkubiert wurden, ergab sich ein ähnlicher Kurvenverlauf wie bei den Hepatozyten aus Pv 19. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen waren jedoch nicht signifikant. Der Anstieg der Harnstoffwerte nach der Inkubation mit Isooctan war ebenfalls nicht signifikant. Die Hepatozyten aus Pv 23 synthetisierten an Tag 2 signifikant ($p < 0,05$) mehr Harnstoff als an Tag 1. Nach der Inkubation mit Isooctan kam es zu einem minimalen Absinken der Harnstoffwerte (nicht signifikant), während die Harnstoffmengen nach der Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ PCB minimal anstiegen (nicht signifikant). Die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen führten nicht zu einer Verringerung der Harnstoffsynthese.

In Abbildung 5-18 sind die Ergebnisse der Harnstoffbestimmung für die mit PFOS inkubierten primären Seehund-Hepatozyten dargestellt.

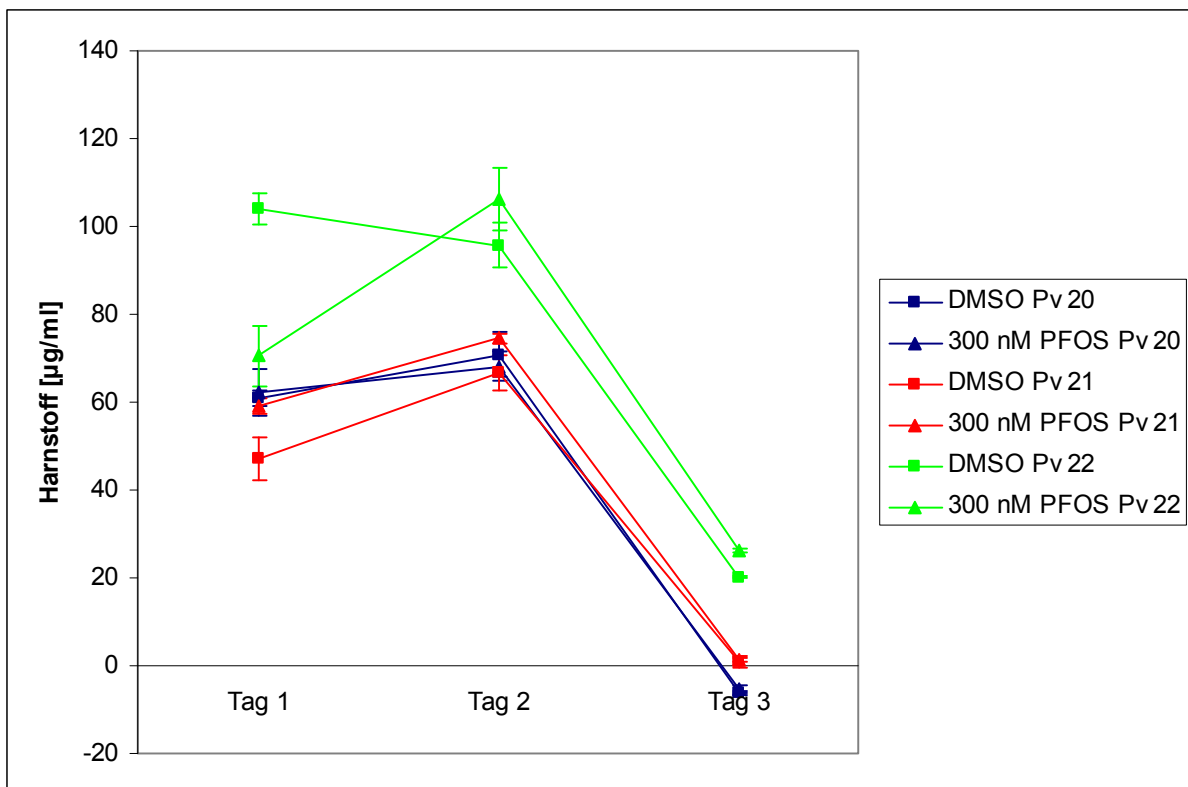


Abbildung 5-18: Von den primären Seehund-Hepatozyten ($3,8 \times 10^6$ Zellen) gebildete Harnstoffmengen vor und nach PFOS-Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Messungen. Zugabe von DMSO und PFOS an Tag 2. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Die Kurvenverläufe der synthetisierten Harnstoffmengen aus den Seehunden Pv 21, Pv 22 und Pv 23 sind homogen (s. Abbildung 5-18), wobei die gebildeten Harnstoffwerte der Hepatozyten aus Pv 23 zu allen Zeitpunkten signifikant höher waren als die Werte aus Pv 20 und Pv 21 ($p < 0,05$). Während sich die synthetisierten Harnstoffmengen von Pv 20 an Tag 1 und Tag 2 nicht signifikant unterschieden, wurde von Pv 21 an Tag 2 signifikant mehr Harnstoff gebildet ($p < 0,05$). Bei den Hepatozyten aus Pv 23 unterschieden sich die Harnstoffwerte an Tag 1 signifikant voneinander ($p < 0,05$). Die Zellen, die an Tag 2 mit DMSO inkubiert wurden, wiesen an Tag 1 die höchsten Harnstoffwerte auf. Dahingegen bildeten die Zellen, die an Tag 2 mit 50 μM PCB inkubiert wurden, signifikant mehr Harnstoff als an Tag 2 ($p < 0,05$). Die Harnstoffmengen sanken an Tag 3 bei den Hepatozyten aus allen drei Seehunden rapide ab und erreichten teilweise den Nullwert ($p < 0,05$). Vor der Inkubation entsprachen die Werte in etwa denen der PCB-Inkubationsexperimente. Der extreme Abfall der Harnstoffwerte ist auf eine Störung im Harnstofftest zurückzuführen. Die in den Inkubationsexperimenten verwendete DMSO-Konzentration (0,1%) hemmte die Aktivität der Urease (s. Kapitel 4.9.2). Somit lässt sich keine Aussage zum Einfluss von PFOS auf die Harnstoffsynthese der primären Seehund-Hepatozyten treffen.

5.6.2.2 Diskussion der Harnstoffsynthese der Seehund-Hepatozyten nach Schadstoffinkubation

Die Inkubation der Seehund-Hepatozyten mit Isooctan bzw. 50 μM PCB führte zu einem heterogenen Kurvenverlauf der Harnstoffsynthese. Es konnte sowohl ein Abfall als auch ein Anstieg der Harnstoffmengen beobachtet werden (s. Abbildung 5-17). Eine signifikant verminderte Harnstoffsynthese, nach der Inkubation mit Isooctan bzw. 50 μM PCB, konnte allerdings nur bei den Hepatozyten aus Pv 19 festgestellt werden. Diese Abnahme könnte entweder auf die Schadstoffinkubation zurückzuführen sein oder auf einer normalen Schwankung der Harnstoffsynthese im Laufe der Kultivierung beruhen. Korff (2010) beobachtete bei einer 10tägigen Kultivierung primärer Seehund-Hepatozyten (ohne Schadstoffinkubation) Schwankungen in der Harnstoffsynthese.

Thomé *et al.* (1995) stellten eine signifikante Abnahme der Harnstoffproduktion bei primären Ratten-Hepatozyten nach einer Inkubation mit 25 μM Aroclor 1254 fest.

Diese Ergebnisse würden die Hypothese stützen, dass die Abnahme der Harnstoffproduktion durch die Schadstoffinkubation hervorgerufen wurde. Allerdings wiesen auch die mit Isooctan inkubierten Hepatozyten eine verminderte Harnstoffsynthese auf. Diese Tatsache würde dafür sprechen, dass es sich bei dem Absinken der Harnstoffmengen eher um einen normalen Prozess handelt, der im Verlauf der Kultivierung auftritt. Ähnliche Beobachtungen konnte Korff (2010) machen. Korff (2010) analysierte den Einfluss einer Inkubation mit Isooctan, 1 µM PCB bzw. 100 µM PCB auf die Harnstoffsynthese primärer Seehund-Hepatozyten. In vier von fünf Zellpräparationen konnte eine signifikante Abnahme der Harnstoffwerte beobachtet werden (Korff, 2010). Dieses Absinken der Harnstoffwerte wurde jedoch nicht auf die Schadstoffinkubation zurückgeführt, da unbehandelte Kontrollzellen aus denselben Tieren an Tag 3 ebenfalls signifikant weniger Harnstoff synthetisierten.

Die in der vorliegenden Arbeit sowie bei Korff (2010) detektierte Abnahme der Harnstoffwerte scheint durch eine allgemeine Verringerung der Harnstoffsynthese im Verlauf der Kultivierung bedingt zu sein. Ein Zusammenhang zwischen der Kultivierungsdauer und sinkender Harnstoffsynthese wurde ebenfalls von Yagi *et al.* (1998) bei der Kultivierung unbehandelter Ratten-Hepatozyten hergestellt. Gómez-Lechón *et al.* (1990) beobachteten bei einer fünftägigen Kultivierung humaner Hepatozyten an Tag 2 eine 50% geringere Harnstoffsynthese im Vergleich zu Tag 1. Danach blieben die Werte bis zum Ende der Kultivierung stabil.

Um eindeutig klären zu können, ob die beobachtete Verringerung der Harnstoffsynthese an Tag 3 auf die Schadstoffinkubation zurückzuführen ist, sind weitere Experimente notwendig.

Die Harnstoffwerte der primären Seehund-Hepatozyten fielen nach der Inkubation mit DMSO bzw. 300nM PFOS rapide ab und erreichten bei Pv 20 und Pv 21 den Nullwert (s. Abbildung 5-18). Diese Abnahme der Harnstoffproduktion beruhte, wie zusätzliche Tests zeigten, auf einer Störung der Urease im Harnstofftest, die durch die DMSO-Konzentration (0,1%) in den Proben hervorgerufen wurde. Aus diesem Grund kann keine Aussage zum Einfluss einer DMSO bzw. PFOS-Inkubation auf die Harnstoffsynthese der Seehund-Hepatozyten gemacht werden.

In der Studie von Korff (2010) konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit DMSO und PFOS nicht generell zu einer signifikanten Abnahme der Harnstoffproduktion bei Seehund-Hepatozyten führte. Korff (2010) inkubierte primäre Seehund-Hepatozyten mit DMSO und verschiedenen PFOS-Konzentrationen (3; 30; 3000 und 30.000 nM). Die finale DMSO-Konzentration in den Proben betrug 0,001% (v/v) und führte nicht zu einer Hemmung der Urease. Die Seehund-Hepatozyten reagierten auf die Schadstoffinkubation individuell verschieden. Bei zwei von vier Tieren kam es zu einer signifikanten Verringerung der Harnstoffsynthese. In einem Fall trat diese Abnahme jedoch bereits vor der Schadstoffinkubation auf.

5.6.2.3 Harnstoffsynthese der Schweine-Hepatozyten

In der folgenden Abbildung 5-19 sind die gebildeten Harnstoffmengen der primären Schweine-Hepatozyten dargestellt. Die Hepatozyten wurden aus den Lebern S 25 und S 27 mittels Leberbiopsie Perfusion isoliert und in WME mit einer Zellzahl von $3,8 \times 10^6$ Zellen kultiviert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrolle von den Harnstoffwerten der Zellen subtrahiert.

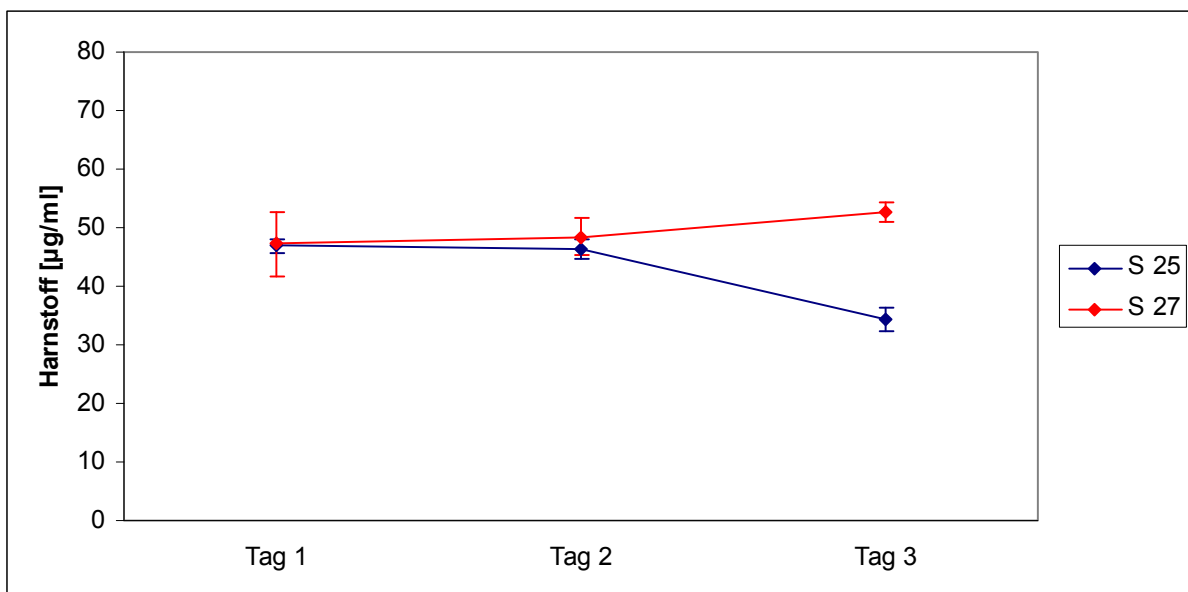


Abbildung 5-19: Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9). Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Die Hepatozyten aus beiden Zellpräparationen synthetisieren an Tag 1 und Tag 2 vergleichbare Harnstoffmengen (durchschnittlich $48 \mu\text{g/ml} \pm 2,8$). An Tag 3 wurde von den Hepatozyten aus S 27 signifikant mehr Harnstoff synthetisiert ($53 \mu\text{g/ml} \pm 1,7$ vs. $34 \mu\text{g/ml} \pm 2,1$).

Aufgrund der kleinen Datenmenge kann jedoch keine generelle Aussage zum Verlauf der Harnstoffproduktion getroffen werden. Aus diesem Grund ist in Abbildung 5-20 die Harnstoffsynthese primärer Schweine-Hepatozyten dargestellt, die mit einer Zellzahl von $1,6 \times 10^6$ Zellen ausgesät wurden. Die Isolierung wurde aus den Schweinen S 25-S 29 mit der Leberbiopsie Perfusion durchgeführt. Kultiviert wurden die Zellen in WME. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrolle von den Harnstoffwerten der dazugehörigen Zellen subtrahiert.

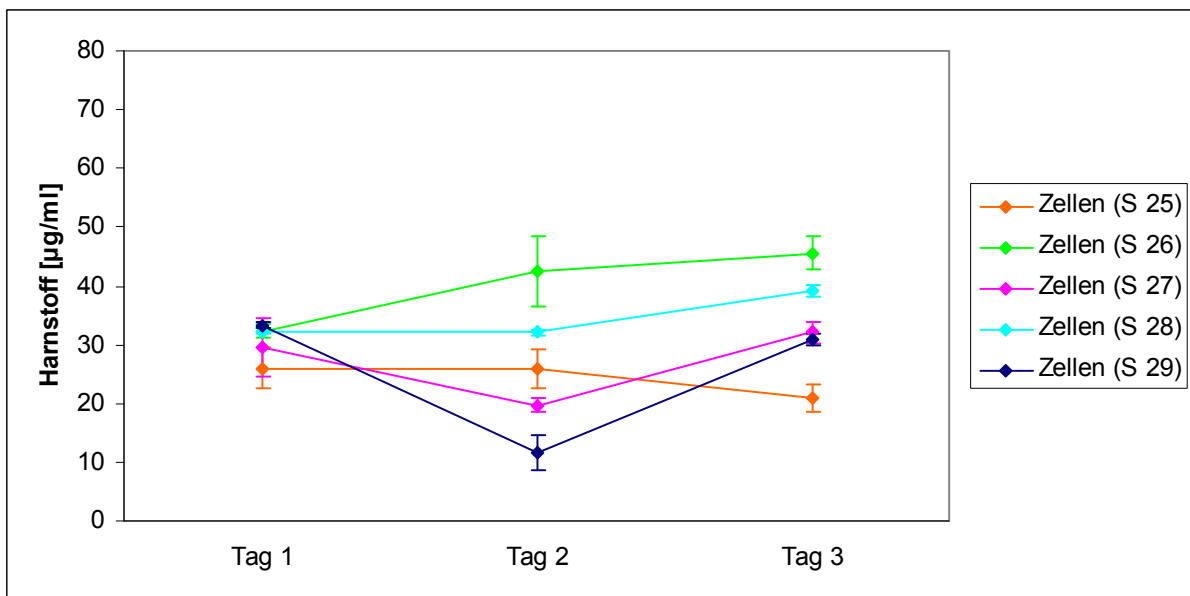


Abbildung 5-20: Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($1,6 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2-3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9). Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Die Kurvenverläufe der von den primären Schweine-Hepatozyten synthetisierten Harnstoffmengen sind, bis auf eine Ausnahme (S 25), gleichförmig. Die Harnstoffwerte an Tag 1 reichten von 26-33 $\mu\text{g/ml}$. Im Verlauf der Kultivierung unterschieden sich die produzierten Harnstoffmengen deutlicher voneinander und reichten an Tag 2 von 12-42 $\mu\text{g/ml}$ und an Tag 3 von 21-46 $\mu\text{g/ml}$. Bei den Hepatozyten aus S 27 und S 29 konnte ein leichter Abfall der Harnstoffwerte an Tag 2 beobachtet werden, während die Harnstoffsynthese aus S 25 und S 28 konstant blieb. Bei S 26 kam es

zu einer Steigerung der Harnstoffsynthese, die sich an Tag 3 fortsetzte. Eine Steigerung der Harnstoffsynthese erfolgte auch für die Hepatozyten aus S 26-S 29. Nur bei den Hepatozyten aus S 25 konnte ein leichtes Absinken der Harnstoffproduktion beobachtet werden.

5.6.2.4 Harnstoffsynthese der Schweine-Hepatozyten in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode

Es sollte untersucht werden, ob die beiden Isolierungsmethoden Gewebedissoziation in Medium (GdM) und Leberbiopsie Perfusion (LbP) einen unterschiedlichen Einfluss auf die Harnstoffproduktion der Schweinehepatozyten haben (s. Abbildung 5-21). Der Vergleich erfolgte an Hepatozyten aus den Lebern S 27, S 28 und S 29, die mit den zwei Isolierungsmethoden gewonnen wurden (s. Tabelle 5-9). Die Kultivierung erfolgte jeweils in WME. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrolle von den Harnstoffwerten der Zellen subtrahiert.

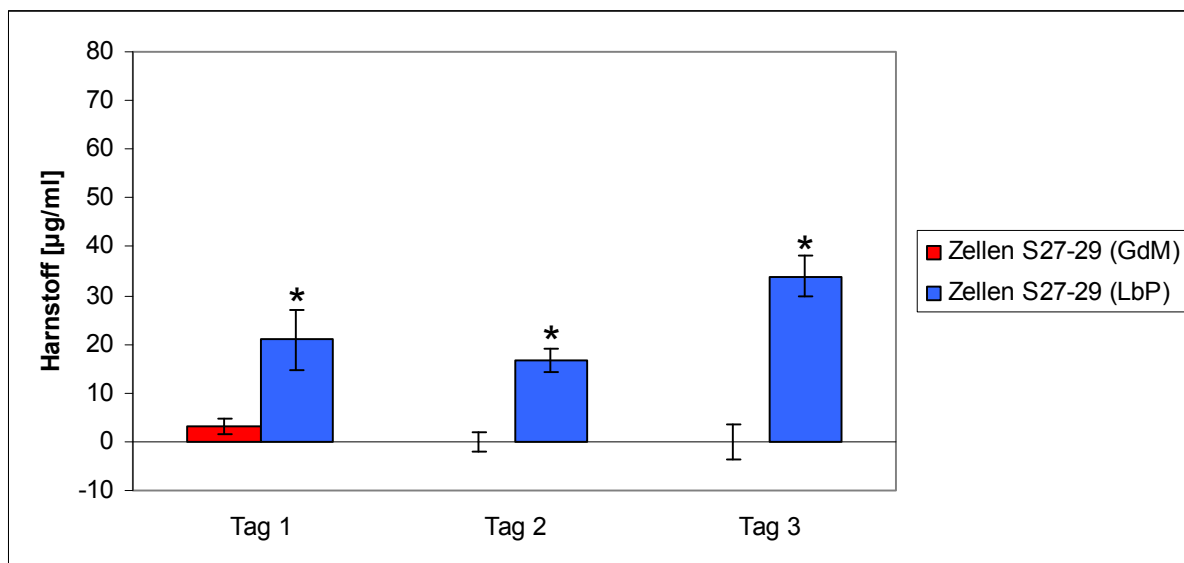


Abbildung 5-21: Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($1,6 \times 10^6$ Zellen) in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 Parallelproben und je 3 Messungen. GdM=Gewebedissoziation in Medium, LbP=Leberbiopsie Perfusion, signifikanter Unterschied zwischen den Methoden: $p < 0,05$ (*). Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Die mittels Leberbiopsie Perfusion isolierten Hepatozyten synthetisierten an allen drei Tagen signifikant größere Harnstoffmengen als die Hepatozyten, die mit GdM isoliert wurden ($p < 0,05$) (s. Abbildung 5-21). Die größte Harnstoffmenge von $34 \mu\text{g/ml} \pm 4,0$ wurde an Tag 3 gebildet. Die Zellen, die mit der GdM Methode isoliert

wurden, synthetisierten an Tag 1 mit $3 \mu\text{g/ml} \pm 1,6$ ihre höchsten Harnstoffmengen. Die Hepatozyten aus der GdM Isolierung produzierten an keinem Tag signifikant mehr Harnstoff als das Medium.

5.6.2.5 Harnstoffsynthese der Schweine-Hepatozyten in Abhängigkeit vom Kulturmedium

Mit dem folgenden Experiment sollte ermittelt werden, ob die beiden Kulturmedien Hepatozyme-SFM und WME einen unterschiedlichen Einfluss auf die Harnstoffproduktion der primären Schweine-Hepatozyten haben. Die Hepatozyten wurden mittels Leberbiopsie Perfusion aus den Lebern S 25 und S 27 (s. Tabelle 5-9) isoliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-22 gezeigt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrolle von den Harnstoffwerten der Zellen subtrahiert.

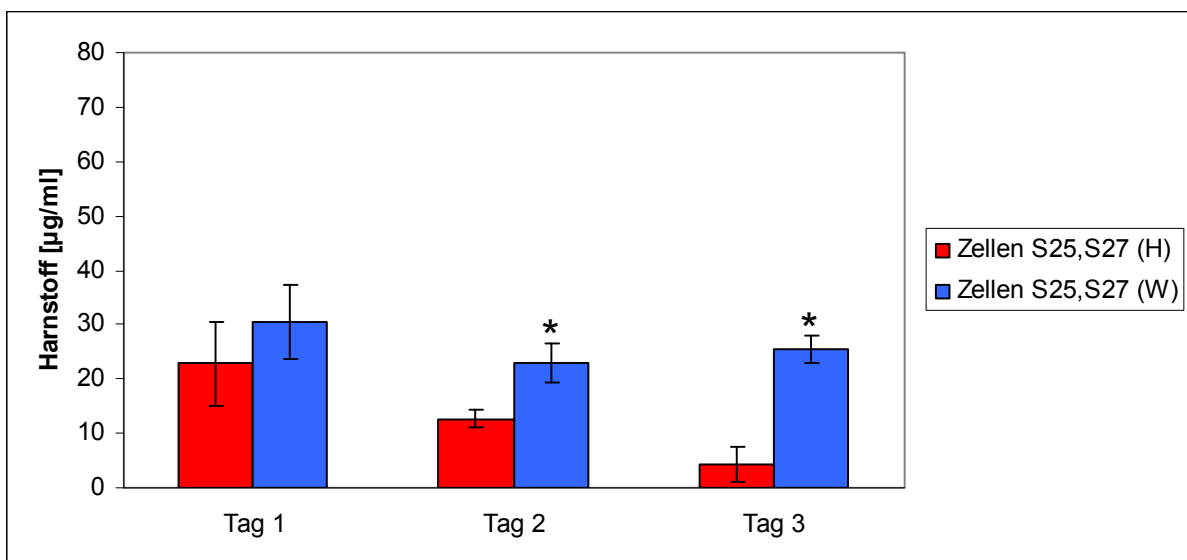


Abbildung 5-22: Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($1,6 \times 10^6$ Zellen) in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3 Messungen. H=Hepatozyme-SFM, W=WME, signifikanter Unterschied zwischen den Zellen in den verschiedenen Medien: $p < 0,05$ (*). Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Die Hepatozyten, die in WME kultiviert wurden, produzierten an Tag 1 die größten Harnstoffmengen ($31 \mu\text{g/ml} \pm 6,7$). An Tag 2 sanken die Werte leicht auf $23 \mu\text{g/ml} \pm 3,6$ ab. Die in Hepatozyme-SFM kultivierten Zellen synthetisierten an Tag 2 nur etwa halb so viel ($26 \mu\text{g/ml} \pm 1,6$) und an Tag 3 nur ca. ein Viertel ($4 \mu\text{g/ml} \pm 3,2$) so viel Harnstoff wie die in WME kultivierten Zellen. Lediglich an Tag 1 bestand hinsichtlich der Harnstoffsynthese kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden.

5.6.2.6 Veränderung der Harnstoffsynthese der Schweine-Hepatozyten während einer 14tägigen Kultivierung

Da in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Veränderung der Harnstoffsynthese im Verlauf einer mehrtägigen Kultivierungsdauer gemacht werden (s. Kapitel 4.6.3, Gómez-Lechón *et al.*, 1990; Katsura *et al.*, 2002; Dabos *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 2006), sollte in der vorliegenden Arbeit herausgefunden werden, wie sich die mit der Leberbiopsie Perfusion isolierten Hepatozyten verhalten.

Aufgrund der Tatsache, dass die Seehund-Hepatozyten nur in begrenzter Menge zur Verfügung standen, wurden diese Experimente nur mit Schweine-Hepatozyten durchgeführt. Für das Experiment wurden primäre Schweine-Hepatozyten aus S 27-29 für 14 Tage in WME kultiviert. Die Veränderungen der Harnstoffsynthese bei primären Schweine-Hepatozyten im Verlauf einer 14tägigen Kultivierung sind in Abbildung 5-23 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrolle von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Zellen subtrahiert.

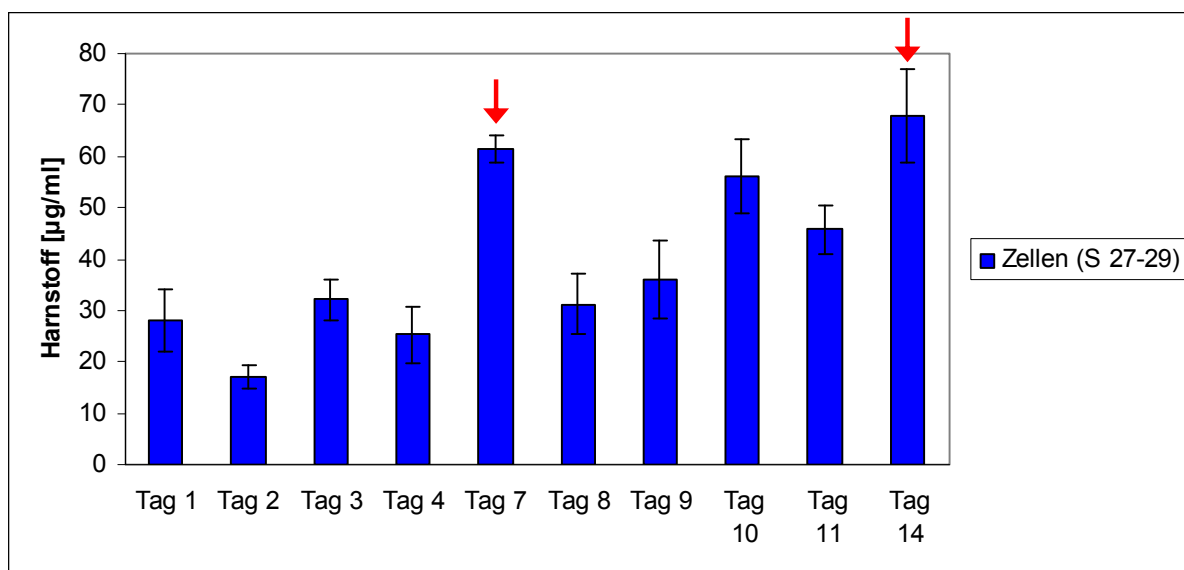


Abbildung 5-23: Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($1,6 \times 10^6$ Zellen) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (S 27-29). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 Parallelproben und je 3 Messungen. Die roten Pfeile markieren die Tage, an denen in den zwei vorangegangenen Tagen kein Mediumwechsel stattfand.

Die höchsten Harnstoffmengen wurden an Tag 7 ($61 \mu\text{g/ml} \pm 2,6$), Tag 10 ($56 \mu\text{g/ml} \pm 7,1$) und Tag 14 ($68 \mu\text{g/ml} \pm 9,0$) gemessen. Die hohen Werte an Tag 7 und

Tag 14 ergaben sich durch eine Akkumulierung von Harnstoff, da jeweils an den zwei Tagen vor der Messung, kein Mediumwechsel stattfand. An den übrigen Tagen wurde das Medium alle 24 h gewechselt. Ein einheitlicher Trend in der Zu- oder Abnahme der Harnstoffwerte ist nicht zu erkennen.

Zusätzlich zur Messung des Harnstoffgehaltes wurden die Hepatozyten über den gesamten Kultivierungszeitraum morphologisch begutachtet. Die morphologischen Veränderungen der Schweine-Hepatozyten, während einer 14-tägigen Kultur, sind in Abbildung 5-24 zu sehen. Im Zellrasen konnten ab dem neunten Kultivierungstag große Lücken im Zellrasen beobachtet werden. Mit zunehmender Kultivierungsdauer erhöhte sich die Anzahl und Größe der Lücken im Zellrasen.

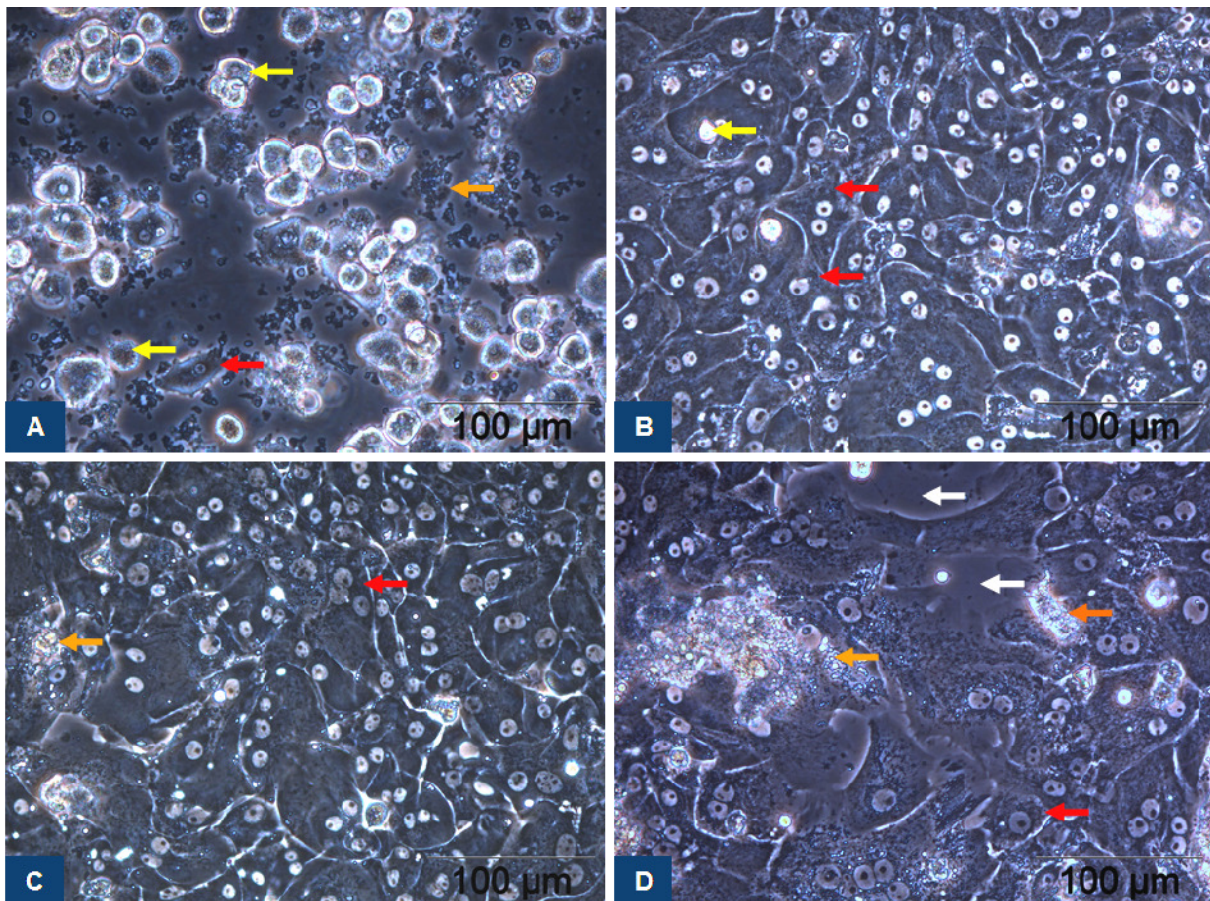


Abbildung 5-24: Primäre Schweine-Hepatozyten an Tag 0 (A), Tag 5 (B), Tag 8 (C) und Tag 12 (D) nach der Isolierung (S 28), Leberbiopsie Perfusion, Medium: WME, rote Pfeile: ausgebreitete Hepatozyten; gelbe Pfeile: nicht ausgebreitete Hepatozyten; orangefarbene Pfeile: Zelltrümmer; weiße Pfeile: Lücke im Zellrasen; Vergr.: 200x, Phasenkontrast

5.6.2.7 Diskussion der Harnstoffsynthese primärer Schweine-Hepatozyten

Experimente mit unbehandelten Schweine-Hepatozyten sollten Aufschluss darüber geben, wie stark die individuellen Schwankungen der Harnstoffsynthese im Verlauf einer dreitägigen Kultivierung in WME sind. Die Tendenz der Kurvenverläufe war weitestgehend homogen (Zunahme der Harnstoffsynthese; s. Abbildung 5-19 und 5-20), die gebildeten Harnstoffmengen unterschieden sich jedoch teilweise signifikant voneinander. Korff (2010) stellte bei einem Vergleich der Harnstoffsynthese von Hepatozyten aus drei verschiedenen Schweinen ebenfalls individuelle Unterschiede in der produzierten Harnstoffmenge fest. Die Harnstoffmengen blieben im Laufe der dreitägigen Kultivierung konstant.

Anhand primärer Schweine-Hepatozyten wurde der Einfluss zwei verschiedener Isolierungsmethoden (GdM und LbP) und zwei unterschiedlicher Zellkulturmedien (Hepatozyme-SFM und WME) auf die Harnstoffsynthese analysiert. Die Hepatozyten, die mit den beiden verschiedenen Isolierungsmethoden GdM und Leberbiopsie Perfusion gewonnen wurden, unterschieden sich bezüglich ihrer Harnstoffproduktion deutlich voneinander (s. Abbildung 5-21). Während die mittels Perfusion isolierten Hepatozyten an allen Tagen signifikante höhere Harnstoffwerte aufwiesen als das Medium, produzierten die mit der GdM Methode isolierten Zellen keinen Harnstoff.

Der Vergleich der beiden Zellkulturmedien zeigte, dass eine Kultivierung der Hepatozyten in WME zu einer signifikant höheren Harnstoffproduktion führte (s. Abbildung 5-22). Das Hepatozyme-SFM Medium scheint keine optimale Versorgung der primären Schweine-Hepatozyten zu gewährleisten und kommt somit nicht für die Kultivierung der Zellen in Frage.

Um weitere Informationen über die Schwankungen der Harnstoffsynthese bei Schweine-Hepatozyten zu erhalten, wurden die Hepatozyten für 14 Tage kultiviert. Es kam zu deutlichen Schwankungen der Harnstoffmengen zwischen den einzelnen Tagen (s. Abbildung 5-23). Eine einheitliche Zu- oder Abnahme der Werte konnte nicht beobachtet werden. Die hohen Harnstoffwerte an den Tagen 7 und 14 wurden durch eine Akkumulierung des Harnstoffs bedingt, da jeweils zwei Tage vorher kein Mediumwechsel stattfand. Auffällig war, dass in der zweiten Hälfte der Kultivierung höhere Harnstoffwerte gemessen wurden als in der ersten Hälfte (nicht signifikant). Diese Ergebnisse deckten sich nicht mit den mikroskopischen Beobachtungen, bei

denen ab dem neunten Kultivierungstag die ersten Lücken im Zellrasen zu erkennen waren (s. Abbildung 5-24). In der Literatur werden unterschiedliche Beobachtungen zum Verlauf der Harnstoffsynthese gemacht. Dabos *et al.* (2004) konnten bei Schweine-Hepatozyten im Verlauf einer sechstägigen Kultivierung einen leichten Anstieg der Harnstoffproduktion detektieren. Bei einer 15tägigen Kultivierung primärer Schweine-Hepatozyten stellten Jasmund *et al.* (2007) zunächst einen leichten Anstieg der Harnstoffsynthese (bis Tag 10) und anschließend eine Abnahme der Syntheseleistung fest. Katsura *et al.* (2002) beobachteten bei humanen Hepatozyten eine Abnahme der Harnstoffsynthese (ab Tag 7) im Verlauf einer mehrwöchigen Kultivierung.

5.6.2.8 Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen

In Abbildung 5-25 sind die von den HepG2-Zellen synthetisierten Harnstoffmengen abgebildet. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen.

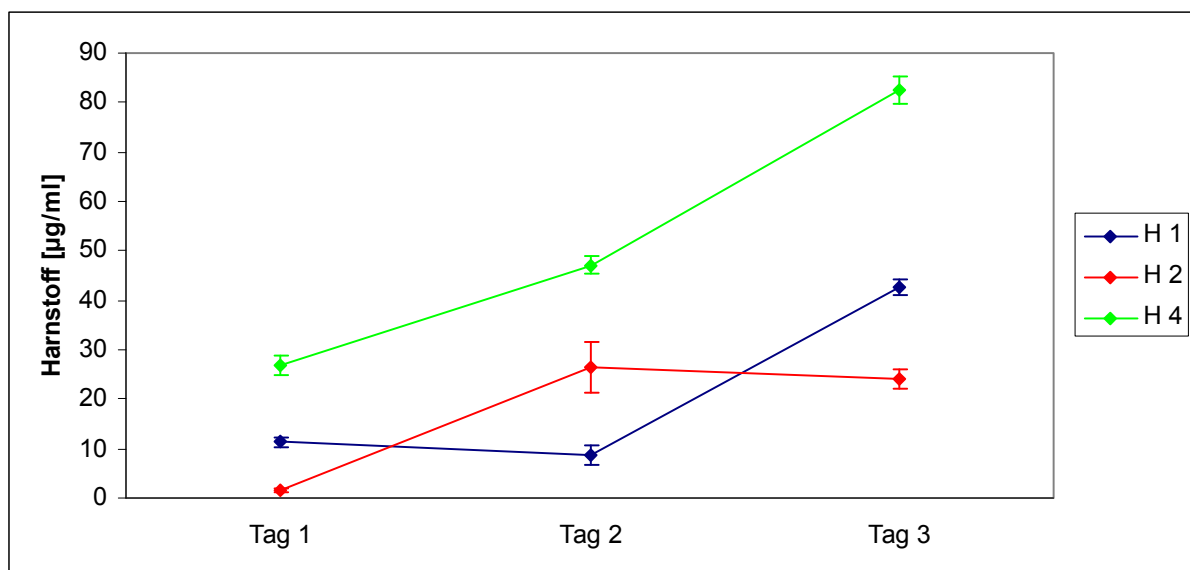


Abbildung 5-25: Von den HepG2-Zellen gebildete Harnstoffmengen ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Die Kurvenverläufe der Harnstoffmengen aus den Zellpräparationen H 1 und H 4 ähnelten sich, wohingegen die HepG2-Zellen aus H 2 einen anderen Verlauf zeigten. Für H 2 und H 4 wurden die geringsten Harnstoffwerte an Tag 1 gemessen ($2 \mu\text{g/ml} \pm 0,5$ bzw. $27 \mu\text{g/ml} \pm 2,0$). In beiden Zellpräparationen kam es an Tag 2 zu

einem Anstieg der Werte, der sich für H 4 an Tag 3 fortsetzte. Bei den HepG2-Zellen aus H 2 kam es zu einem leichten Absinken der Werte. Die Zellen aus H 1 wiesen ihr Harnstoff-Minimum an Tag 2 ($9 \mu\text{g/ml} \pm 1,0$) auf und erreichten an Tag 3 ihr Maximum ($43 \mu\text{g/ml} \pm 1,4$). Die HepG2-Zellen aus H 4 bildeten über den gesamten Zeitraum signifikant höhere Harnstoffmengen als die übrigen Zellen ($p < 0,05$).

5.6.2.9 Veränderung der Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen nach Schadstoffinkubation

Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob eine Inkubation mit PCB oder PFOS bzw. den dazugehörigen Lösungsmitteln, einen Einfluss auf die Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen hat. Die Schadstoffzugabe erfolgte an Tag 2 nach dem Mediumwechsel. Der Einfluss einer Inkubation mit Isooctan, $1 \mu\text{M}$ PCB bzw. $50 \mu\text{M}$ PCB auf die Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen ist in Abbildung 5-26 dargestellt. Die Ergebnisse aus der Inkubation mit DMSO, 30 nM bzw. 300 nM PFOS sind in Abbildung 5-27 zu sehen. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen.

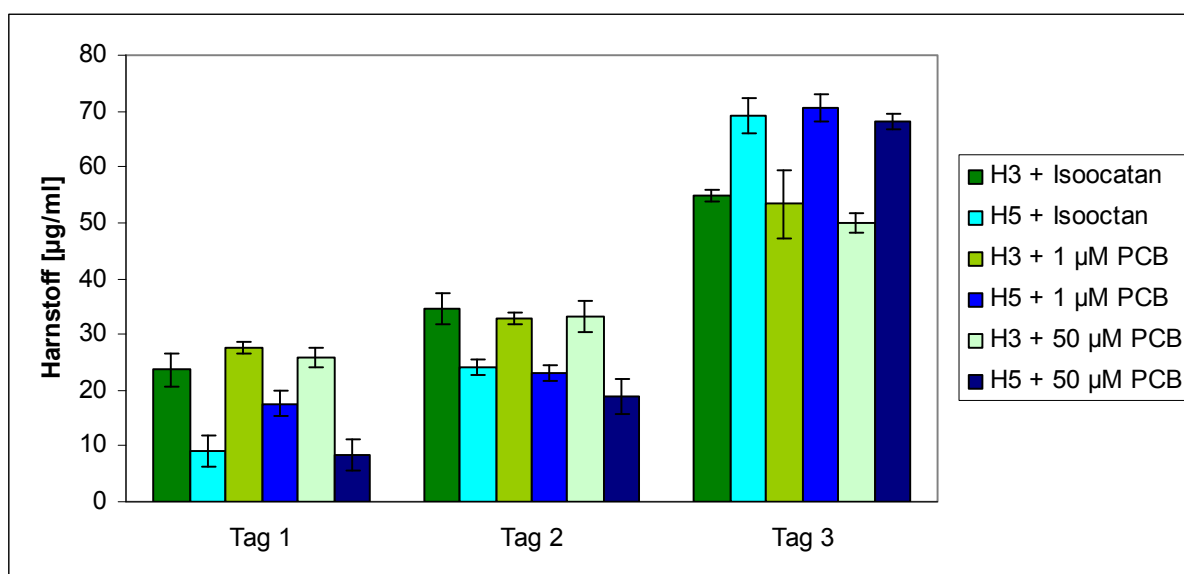


Abbildung 5-26: Von den HepG2-Zellen gebildete Harnstoffmengen ($3,8 \times 10^6$ Zellen) vor und nach Inkubation mit Isooctan bzw. PCB. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zugabe von Isooctan und PCB erfolgte an Tag 2. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Dargestellt sind die Ergebnisse der HepG2-Zellen aus H 3 und H 5. Die Zellen aus H 5 wiesen in allen Fällen signifikant höhere Harnstoffwerte auf als die Zellen aus H 3 ($p < 0,05$). Die HepG2-Zellen aus beiden Präparationen produzierten an Tag 1 die

geringsten Harnstoffmengen und an Tag 3 die höchsten. Eine Inkubation mit Isooctan, 1 μM PCB bzw. 50 μM PCB hatte keinen negativen Einfluss auf die Harnstoffsynthese der Zellen, da die Zellen an Tag 3 (nach Schadstoffinkubation) signifikant mehr Harnstoff synthetisierten als an Tag 2 (vor Schadstoffinkubation).

Die Harnstoffproduktion der HepG2-Zellen vor und nach der Inkubation mit DMSO bzw. PFOS ist in Abbildung 5-27 zu sehen. Im Gegensatz zu den Inkubationsexperimenten mit Seehund-Hepatozyten wurden für die Experimenten mit HepG2-Zellen Lösungen verwendet, die eine geringere DMSO-Konzentration enthielten (s. Kapitel 4.10). Es trat keine Störung der Urease-Aktivität im Harnstoff-Test auf.

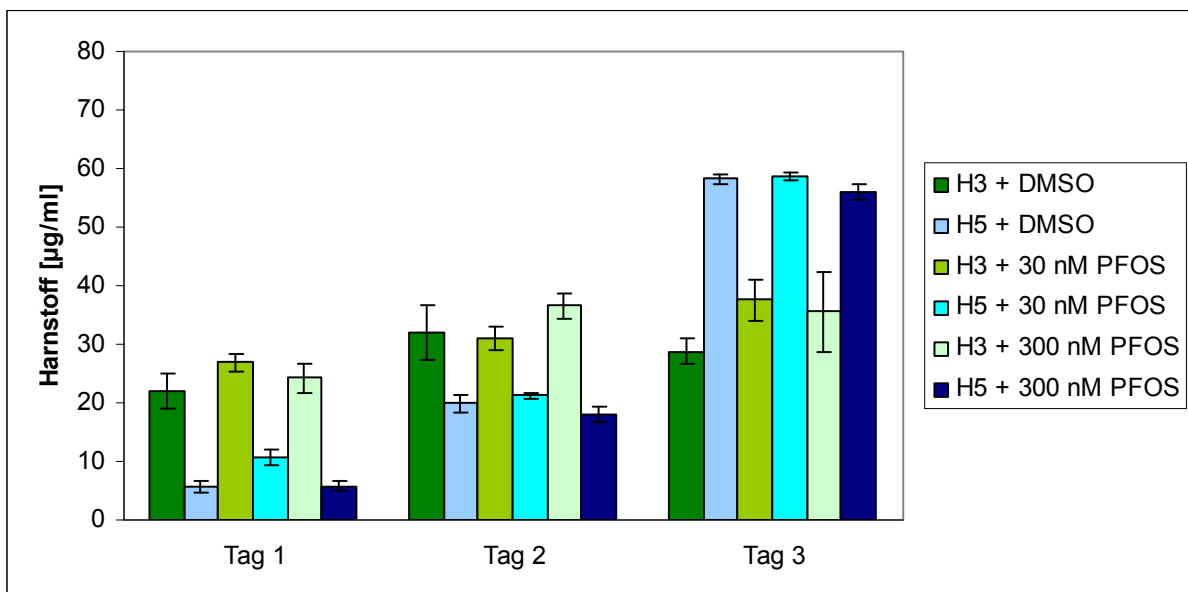


Abbildung 5-27: Von den HepG2-Zellen gebildete Harnstoffmengen ($3,8 \times 10^6$ Zellen) vor und nach Inkubation mit DMSO und PFOS. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zugabe von DMSO und PFOS erfolgte an Tag 2. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.

Die HepG2-Zellen aus H 3 synthetisierten an Tag 1 und Tag 2 signifikant mehr Harnstoff als die Zellen aus H 5 ($p < 0,05$). Für beide Zellpräparationen konnte ein Anstieg der Harnstoffwerte im Laufe der Kultur festgestellt werden. Eine Inkubation mit DMSO bzw. PFOS führte bei den Zellen aus H 5 zu einem signifikanten Anstieg der Harnstoffwerte. Bei den Zellen aus H 3 konnte nur für die Zellen, die mit 30 nM PFOS inkubiert wurden, ein signifikanter Anstieg der Harnstoffwerte beobachtet werden. Die übrigen Zellen aus H 3 zeigten keine signifikante Änderung zu Tag 2.

Die Schadstoffinkubation führte in keinem Fall zu einer signifikanten Abnahme der Harnstoffwerte.

5.6.2.10 Diskussion der Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen

Bei den HepG2-Zellen lässt sich hinsichtlich der Harnstoffproduktion kein einheitlicher Trend feststellen. Die einzelnen Zellpräparationen unterschieden sich sowohl in der Menge des gebildeten Harnstoffs, als auch im Kurvenverlauf der Harnstoffwerte voneinander.

Es wurde untersucht, ob die Inkubation mit Schadstoffen oder deren Lösungsmitteln einen Einfluss auf die Harnstoffproduktion hat. Verglichen wurden dazu die Werte von Tag 2 (vor der Inkubation) mit den Werten an Tag 3 (nach der Inkubation). Nach der Inkubation mit Isooctan bzw. PCB stiegen die Harnstoffwerte beider Zellpräparationen signifikant an.

Der Einfluss von PFOS auf die Harnstoffsynthese wirkte sich auf die beiden untersuchten Zellpräparationen unterschiedlich aus. Während die Zellen aus H 5 nach der Schadstoffinkubation in allen Fällen signifikant höhere Werte als vor der Schadstoffinkubation aufwiesen, kam es bei den Zellen aus H 3 nach der Inkubation mit DMSO zu einer Abnahme der Harnstoffwerte. Die verwendeten Schadstoffe hatten keinen signifikant negativen Einfluss auf die Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten aus der Literatur. Hu *et al.* 2009 inkubierten HepG2-Zellen für 24 h mit verschiedenen PFOS-Konzentrationen (50, 100, 150 und 200 μM). Eine Inkubation mit 50 μM PFOS führte zu einem Vitalitätsverlust von ca. 3-8% (im Vergleich zur Kontrolle). Selbst bei einer Inkubation der Zellen mit 200 μM PFOS wurde noch eine Vitalität von 85% erreicht.

5.6.2.11 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Harnstofftests bei den untersuchten Zelltypen

Bei allen Zelltypen ließen sich zum Teil deutliche individuelle Unterschiede im Verlauf der Harnstoffsynthese sowie in der Höhe der synthetisierten Harnstoffmengen feststellen. Aufgrund dieser individuellen Variabilität ließ sich für die primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten kein einheitlicher Verlauf der Harnstoff-

synthese während einer dreitägigen Kultivierung erkennen. Dahingegen nahm die Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen in der vorliegenden Arbeit zu. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die HepG2-Zellen im Gegensatz zu den primären Hepatozyten proliferieren. Die HepG2-Zellen synthetisierten signifikant weniger Harnstoff ($18 \pm 2,0 \mu\text{g/ml}$) als die primären Hepatozyten. Die höchsten Harnstoffwerte wurden mit $64 \pm 4,2 \mu\text{g/ml}$ von den primären Seehund-Hepatozyten produziert (Schweine-Hepatozyten: $47 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$).

Eine Inkubation mit Isooctan bzw. $50 \mu\text{M}$ PCB führte weder bei den Seehund-Hepatozyten noch bei den HepG2-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Harnstoffsynthese. Bei den HepG2-Zellen konnte für alle Zellpräparationen ein signifikanter Anstieg nach der Inkubation festgestellt werden. Hinsichtlich des Einflusses einer Inkubation mit DMSO bzw. 300 nM PFOS konnte für die Seehund-Hepatozyten keine Aussage gemacht werden, da hohe DMSO-Konzentrationen in den Proben eine Messung der Harnstoffwerte unmöglich machte (s. Kapitel 5.6.2.1 und 4.10). Korff (2010) konnte in ihrer Arbeit keinen signifikant negativen Einfluss einer DMSO bzw. PFOS-Inkubation primärer Seehund-Hepatozyten feststellen.

Die Harnstoffsynthese der HepG2-Zellen nahm in der Regel nach einer Inkubation mit DMSO bzw. 300 nM PFOS signifikant zu. Lediglich in einem Fall konnte ein nicht signifikanter Abfall der Werte beobachtet werden. Die verwendeten Schadstoffe führten in den eingesetzten Konzentrationen nicht zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Harnstoffsynthese.

5.6.3 Beurteilung der Membranschädigung (LDH-Freisetzung)

Mit dem LDH-Test sollte untersucht werden, ob eine Schadstoffinkubation der Zellen mit PCB und PFOS eine Membranschädigung verursacht (s. Kapitel 3.7.4). Je höher die Absorptionen sind, desto größer ist die Zellschädigung. Als Proben dienten Aliquote des Zellkultur- und Kontrollmediums, die an jedem Tag genommen wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die LDH-Werte des Kontrollmediums von den Proben-Werten subtrahiert.

5.6.3.1 Veränderung der LDH-Freisetzung der Seehund-Hepatozyten nach Schadstoffinkubation

Die LDH-Freisetzung der Seehund-Hepatozyten die mit Isooctan und 50 µM PCB inkubiert wurden, ist in Abbildung 5-28 dargestellt. Die Hepatozyten wurden mittels Leberbiopsie Perfusion isoliert und in WME kultiviert.

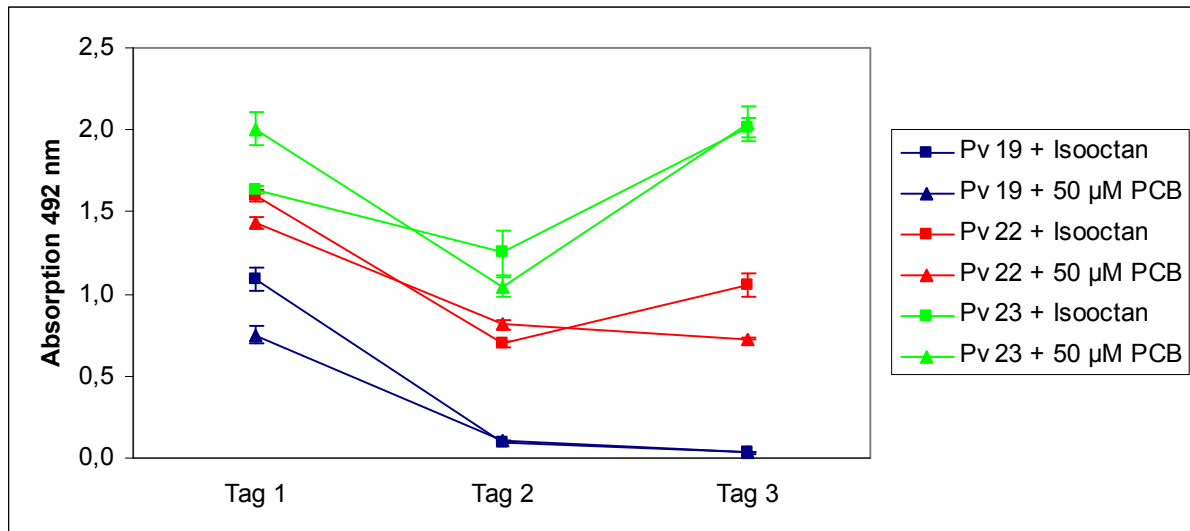


Abbildung 5-28: LDH-Freisetzung der primären Seehund-Hepatozyten vor und nach Inkubation mit Isooctan und 50 µM PCB ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Messungen. Die Zugabe von Isooctan und PCB erfolgte an Tag 2. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Die höchsten LDH-Werte wurden für Pv 19 und Pv 22 an Tag 1 gemessen (durchschnittlich $0,9 \pm 0,06$ bzw. $1,5 \pm 0,03$). Danach kam es in beiden Zellpräparationen zu einem Absinken der Werte, welches sich bei Pv 19 auch nach einer Schadstoffinkubation fortsetzte. Bei Pv 22 kam es nach der Inkubation mit Isooctan zu einem Anstieg der LDH-Werte, während diese nach einer Inkubation mit 50 µM PCB absanken. Der Unterschied zwischen Tag 1 und Tag 2 war in beiden Fällen signifikant ($p < 0,05$). Die LDH-Freisetzung der Hepatozyten aus Pv 23 war an Tag 1 und Tag 2 nahezu identisch (durchschnittlich $1,8 \pm 0,06$ bzw. $2,0 \pm 0,084$). Für Pv 23 wurden die niedrigsten Werte an Tag 2 erreicht. In Pv 23 kam es zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Werte nach einer Schadstoffinkubation.

Die Hepatozyten aus den verschiedenen Seehunden scheinen unterschiedlich sensibel auf die Schadstoffinkubation zu reagieren.

In Abbildung 5-29 ist die LDH-Freisetzung aus Seehund-Hepatozyten, die mit DMSO und PFOS inkubiert wurden, dargestellt.

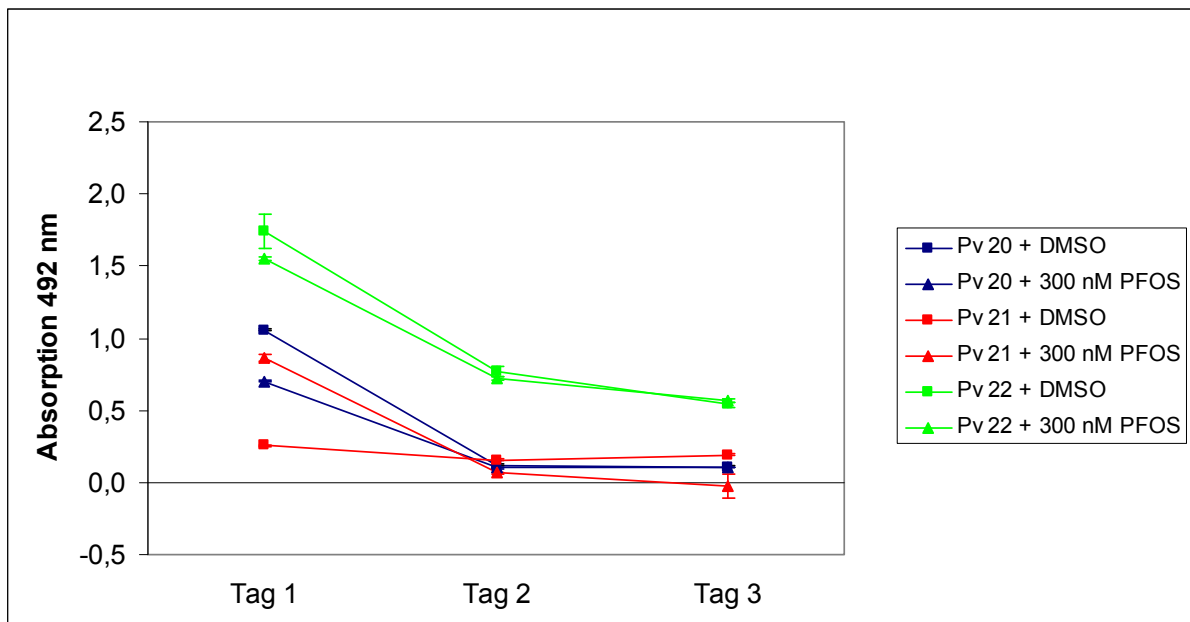


Abbildung 5-29: LDH-Freisetzung der primären Seehund-Hepatozyten vor und nach Inkubation mit DMSO und PFOS ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Messungen. Die Zugabe von DMSO und PFOS erfolgte an Tag 2. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Abgebildet sind die Ergebnisse der Hepatozyten aus den Seehunden PV 20, Pv 21 und Pv 22. Die Kurvenverläufe der LDH-Werte sind für alle Zellen vergleichbar. Die höchsten Werte wurden an Tag 1, die niedrigsten Werte an Tag 3 gemessen. Die Hepatozyten aus Pv 22 zeigten an allen Tagen eine signifikant höhere LDH-Freisetzung als die Zellen aus Pv 20 und Pv 21. Eine Inkubation mit DMSO bzw. 300 nM PFOS führte nicht zu einem Anstieg der LDH-Freisetzung.

5.6.3.2 Diskussion der LDH-Freisetzung der Seehund-Hepatozyten nach Schadstoffinkubation

Die LDH-Freisetzung war in sämtlichen Hepatozyten-Präparationen an Tag 1 am höchsten (Ausnahme Pv 23). Diese auffällig hohen Werte lassen sich vermutlich auf die Anwesenheit geschädigter Zellen zurückführen. In der Zellsuspension, die nach der Isolierung erhalten wurde, befanden sich neben vitalen Hepatozyten auch geschädigte Hepatozyten, Zelltrümmer und Erythrozyten. Bei der Aussaat der Zellen gelangten sie ebenfalls mit in die Kulturen und verursachten möglicherweise die hohen LDH-Werte. Da sie sich aber, im Gegensatz zu den vitalen Hepatozyten, nicht

am Boden der Zellkulturflaschen anhefteten wurden sie beim Mediumwechsel an Tag 1 entfernt, wodurch es zu einem Absinken der LDH-Werte kam. Bei der Kultivierung von humanen Hepatozyten konnten Vondran *et al.* (2008) ebenfalls die höchsten LDH-Werte an Tag 1 messen. Auch Clement *et al.* (2001) detektierten an Tag 1 höhere LDH-Werte als an den Folgetagen. Korff (2010) erhielt bei der Kultivierung primärer Seehund-Hepatozyten ebenfalls am ersten Tag die höchsten LDH-Werte. Diese sanken im Verlauf der Kultivierung ab.

Betrachtet man die Ergebnisse der PCB-Inkubation der Seehund-Hepatozyten in der vorliegenden Arbeit, ergibt sich ein sehr heterogenes Bild. In den Hepatozyten-Kulturen aus Pv 22, die mit Isooctan inkubiert wurden, kam es an Tag 3 zu einem Anstieg der LDH-Werte, während sie nach einer Inkubation mit 50 µM PCB absanken. Ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung konnte auch für die Hepatozyten aus Pv 23 nach einer Inkubation mit Isooctan bzw. 50 µM PCB beobachtet werden. Auffällig ist, dass für die Zellen aus Pv 19 kein Anstieg der Werte detektiert werden konnte. Die Seehund-Hepatozyten reagierten offensichtlich individuell sensibel auf die Schadstoffinkubation.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass PCBs eine Schädigung der Zellmembran hervorrufen. Katynski *et al.* (2004) stellten eine Veränderung der Hepatozytenmembran bei Hühnerembryonen fest, die *in ovo* PCB 126 ausgesetzt waren. In anderen Untersuchungen konnten Veränderungen der Zellmembran nach PCB-Inkubation bei primären Nierenzellen (López-Aparicio *et al.*, 1997) und in neuronalen Zellen aus der Ratte (Sánchez-Alonso *et al.*, 2004) gezeigt werden.

Eine Inkubation mit DMSO bzw. 300 nM PFOS führte zu einem einheitlichen Kurvenverlauf der Absorptionwerte. Sie sanken bei den Hepatozyten aus den Tieren Pv 20, Pv 21 und Pv 22 im Verlauf der Kultur kontinuierlich und fielen bei den Hepatozyten aus den Tieren Pv 20 und Pv 21 an Tag 3 auf die Werte des Kontrollmediums ab. Bei den Hepatozyten aus Pv 22, die mit DMSO bzw. 300 nM PFOS inkubiert wurden, konnte ebenfalls ein Absinken der LDH-Werte nach der Schadstoffinkubation detektiert werden. Allerdings sanken die Werte nicht bis auf den Nullwert ab. Die LDH-Freisetzung war während der gesamten Kultivierung bei den Hepatozyten aus Pv 22 signifikant höher als bei den Hepatozyten aus Pv 20 und Pv 21. Eine mögliche Ursache könnte eine insgesamt höhere Zellschädigung sein. Modest (2009) konnte

bei der Kultivierung humaner Hepatozyten ebenfalls unterschiedlich hohe LDH-Werte bei Zellen aus den verschiedenen Lebern messen.

Die verwendeten Schadstoffkonzentrationen scheinen im Falle der PCBs eine Membranschädigung in einem Teil der Seehund-Hepatozyten hervorzurufen. Im Gegensatz dazu konnte Korff (2010) nach einer Inkubation primärer Seehund-Hepatozyten mit Isooctan, PCB, DMSO oder PFOS keinen signifikanten Anstieg der LDH-Werte beobachten.

5.6.3.3 LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten

Die LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten ohne Schadstoffinkubation ist in Abbildung 5-30 zu sehen. Die Isolierung wurde mit der Leberbiopsie Perfusion aus den Lebern S 25 und S 27 durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in WME. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen.

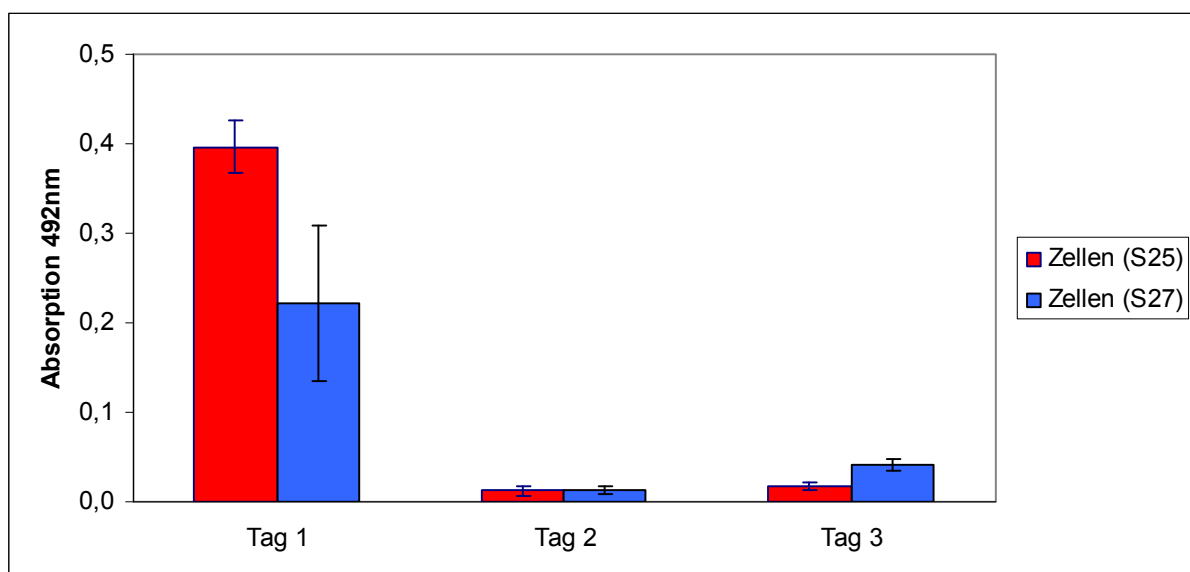


Abbildung 5-30: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($3,8 \times 10^6$ Zellen; aus S 25 und S27). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Der Verlauf der LDH-Freisetzung ist bei den Hepatozyten aus S 25 und S 27 ($3,8 \times 10^6$ Zellen) vergleichbar. Die höchsten Absorptionswerte wurden an Tag 1 gemessen ($0,4 \pm 0,03$ bzw. $0,2 \pm 0,09$), anschließend kam es zu einem Abfall der LDH-

Werte. Nur an Tag 1 gab es einen signifikanten Unterschied in der LDH-Freisetzung zwischen den Hepatozyten aus den beiden Schweinelebern.

In Abbildung 5-31 ist die LDH-Freisetzung primärer Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz) aus den Lebern S 25-29 dargestellt. Die Isolierung wurde mit der Leberbiopsie Perfusion durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in WME. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen.

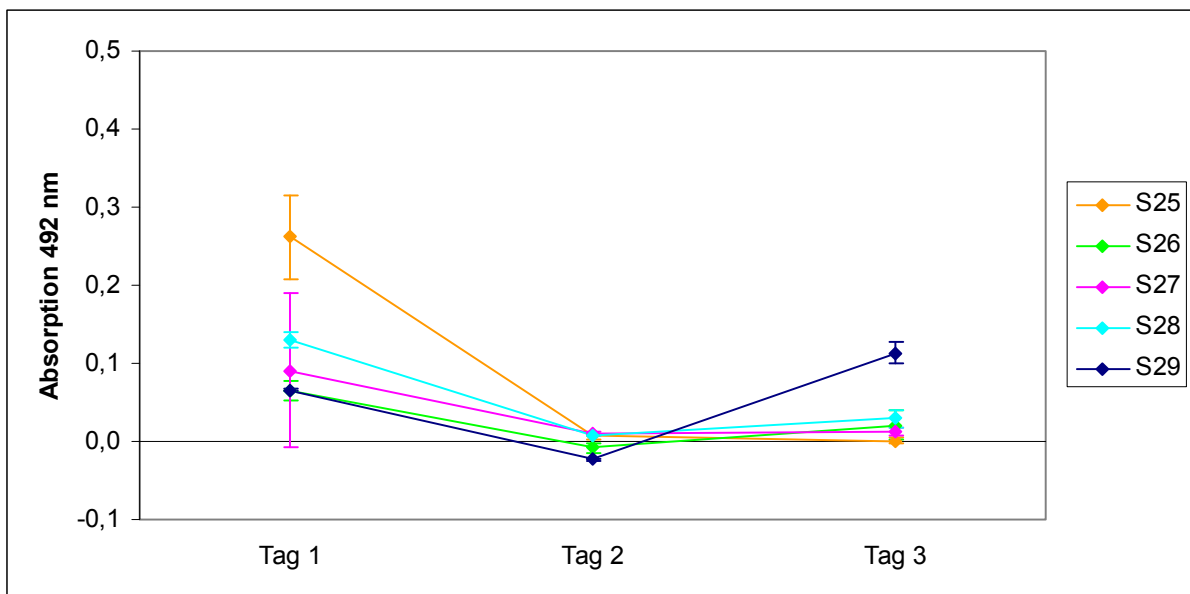


Abbildung 5-31: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2-3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Der Verlauf der LDH-Freisetzung der Hepatozyten aus den Lebern S 25 bis S 28 war sehr einheitlich (Ausnahme: S 29). Die Hepatozyten lieferten an Tag 1 die höchsten Absorptionswerte (durchschnittlich $0,12 \pm 0,04$) während an Tag 2 die niedrigsten Absorptionswerte erreicht wurden. Nur für die Hepatozyten aus S 29 wurden die höchsten Werte am dritten Tag gemessen.

5.6.3.4 Veränderung der LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode

Es sollte untersucht werden, ob die beiden Isolierungsmethoden Gewebedissoziation in Medium (GdM) und Leberbiopsie Perfusion (LbP) einen unterschiedlichen Einfluss auf die Membranintegrität der primären Schweine-Hepatozyten haben. In Abbildung 5-32 ist die LDH-Freisetzung in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode für primäre Schweine-Hepatozyten dargestellt. Die Zellen wurden aus den Lebern S 27-29 isoliert und in WME kultiviert. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen.

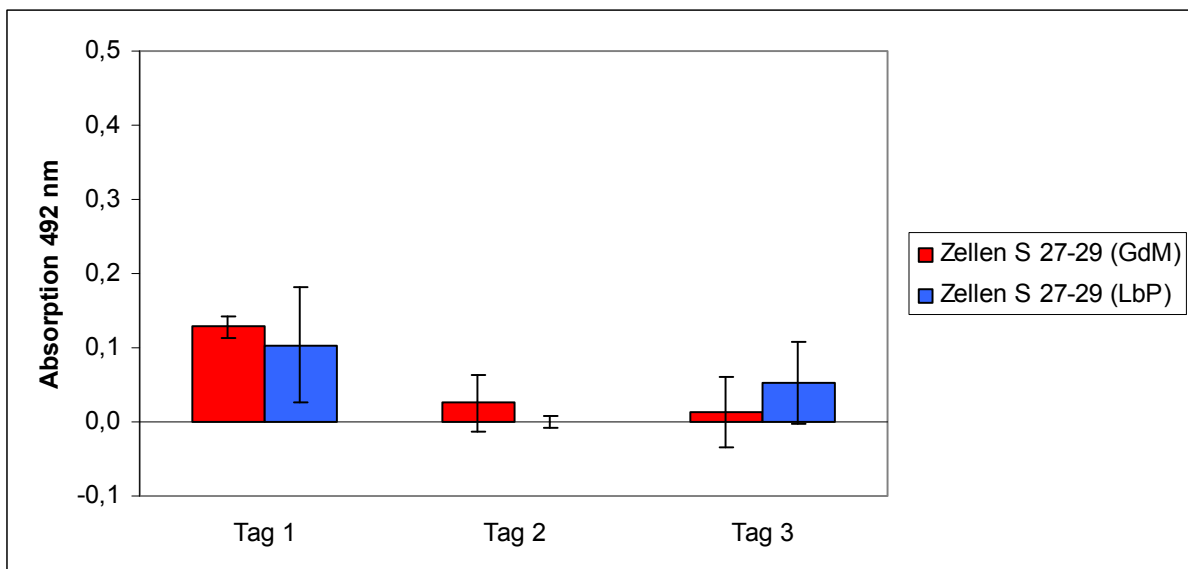


Abbildung 5-32: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit 2 Parallelproben und je 3 Messungen. GdM=Gewebedissoziation in Medium, LbP=Leberbiopsie Perfusion. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Die höchsten Absorptionswerte wurden für beide Zellpräparationen an Tag 1 gemessen (GdM: $0,13 \pm 0,02$; LbP: $0,10 \pm 0,08$). Danach kam es zu einem Absinken der LDH-Werte. Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den mit GdM isolierten und den mit LbP isolierten Zellen. Hinsichtlich der Membranintegrität konnte somit kein Unterschied zwischen den verwendeten Methoden beobachtet werden.

5.6.3.5 Veränderung der LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten in Abhängigkeit vom Kulturmedium

Um zu untersuchen, ob die beiden Kulturmedien Hepatozyme-SFM und WME einen Einfluss auf die Membranintegrität der primären Schweine-Hepatozyten haben, wurden die Hepatozyten mittels Leberbiopsie Perfusion isoliert und in den entsprechenden Medien kultiviert. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen. Der Einfluss der Kulturmedien auf die LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ist in Abbildung 5-33 dargestellt.

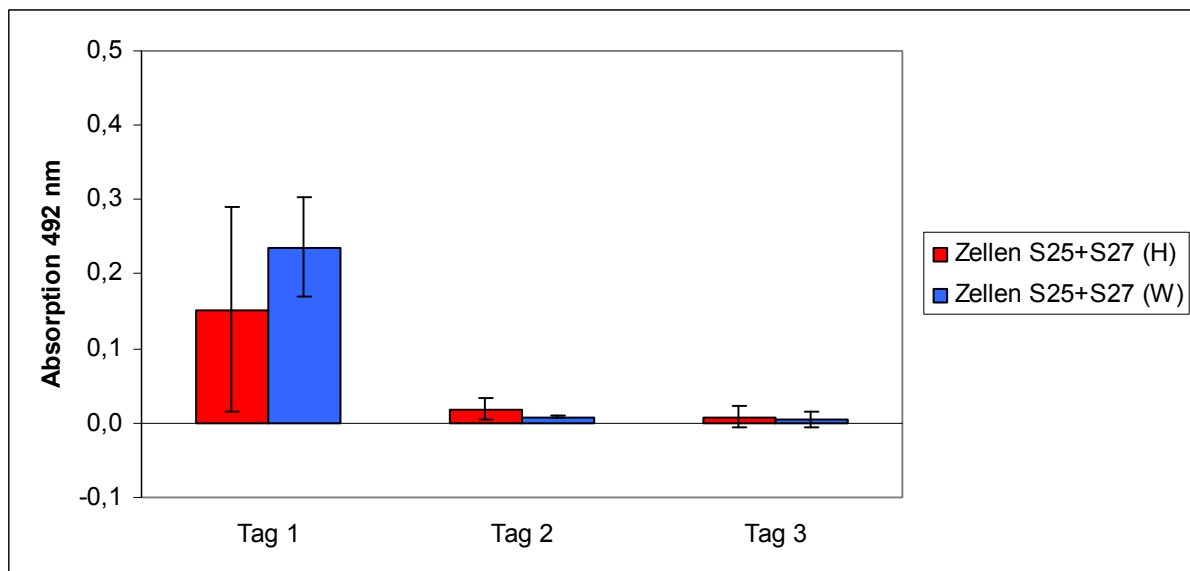


Abbildung 5-33: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen) in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3 Messungen. H=Hepatozyme-SFM, W=WME. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Für beide Zellpräparationen wurden die höchsten Werte an Tag 1 gemessen (H: $0,15 \pm 0,14$; W: $0,24 \pm 0,07$). Ein signifikanter Unterschied der beiden Methoden hinsichtlich der LDH-Freisetzung konnte nicht detektiert werden.

5.6.3.6 Veränderung der LDH-Freisetzung der Schweine-Hepatozyten im Verlauf einer 14tägigen Kultivierung

In Abbildung 5-34 ist der Verlauf der LDH-Freisetzung von primären Schweine-Hepatozyten während einer 14tägigen Kultivierung dargestellt. Die Zellen wurden mit

der Leberbiopsie Perfusion aus den Lebern S 27-S 29 isoliert und in WME kultiviert. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen.

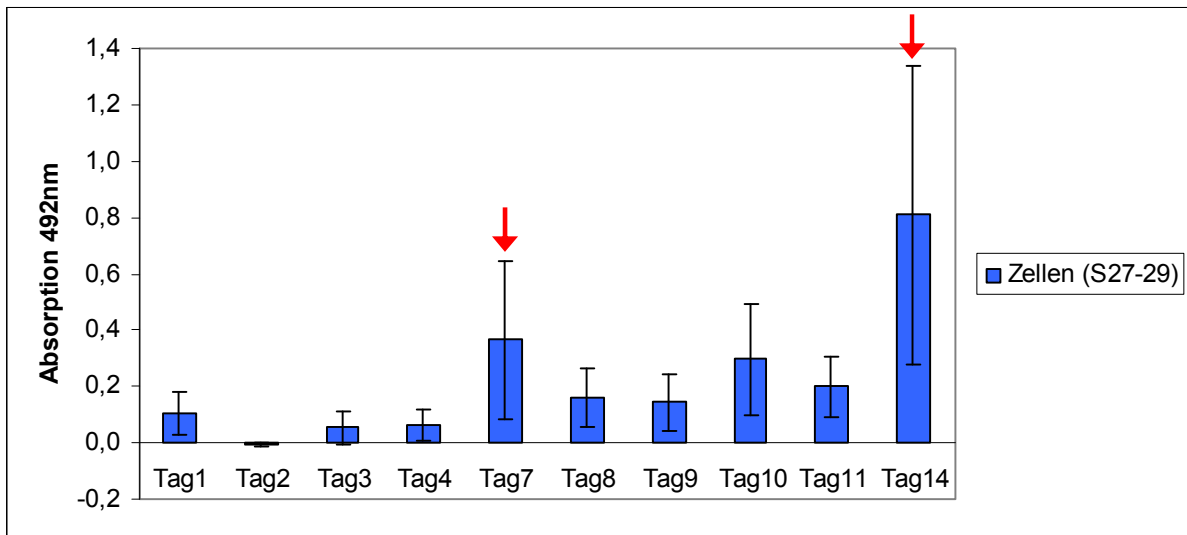


Abbildung 5-34: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen) im Verlauf einer 14-tägigen Kultivierung in WME. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 Parallelproben und 3 Messungen. Die roten Pfeile markieren die Tage, an denen in den zwei vorangegangenen Tagen kein Mediumwechsel erfolgte. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Die LDH-Freisetzung primärer Schweine-Hepatozyten ließ im Verlauf einer 14tägigen Kultivierung keinen kontinuierlichen Anstieg oder Abfall der Werte erkennen. Die hohen Werte an Tag 7 und Tag 14 ergaben sich durch eine Akkumulierung von LDH im Medium, da jeweils an den zwei Tagen vor der Messung, kein Mediumwechsel stattfand. An den übrigen Tagen wurde das Medium alle 24 h gewechselt. In der zweiten Kultivierungs-Woche wurden höhere LDH-Werte gemessen als zu Beginn der Kultivierung. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

5.6.3.7 Vergleichende Diskussion der LDH-Freisetzung bei primären Schweine-Hepatozyten

Bei allen untersuchten Schweine-Hepatozyten wurden, unabhängig von der eingesetzten Zellzahl, die höchsten LDH-Werte am ersten Tag gemessen. Danach kam es zu einem Abfall der Werte, die in der Regel die Höhe der Mediumwerte erreichten.

Lediglich bei den Hepatozyten aus S 29 kam es an Tag 3 wieder zu einem Anstieg der Werte (s. Abbildung 5-30 und Abbildung 5-31).

Die hohen Werte an Tag 1 sind vermutlich dadurch bedingt, dass ein Teil der Hepatozyten durch den Isolierungsprozess geschädigt wurde. Auch die Tatsache, dass immer ein gewisser Anteil toter Zellen mit ausgesät wurde, führte zu den hohen Absorptionswerten am ersten Tag. Mit dem ersten Mediumwechsel wurden die geschädigten oder toten Zellen entfernt und es kam zu einer Abnahme der LDH-Werte. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus anderen Studien an porcinen Hepatozyten (Christiansen 2000; Fröhlich 2004). Korff (2010) konnte ebenfalls die höchsten LDH-Werte bei einer Kultivierung primärer Schweine-Hepatozyten an Tag 1 nachweisen. Es kam in dieser Studie zu einem signifikanten Abfall der LDH-Freisetzung an Tag 2.

Die beiden Isolierungsmethoden Gewebedissoziation in Medium (GdM) und Leberbiopsie Perfusion (LbP) wurden hinsichtlich möglicher Auswirkungen auf die Membranintegrität der isolierten Schweine-Hepatozyten untersucht. Mit Hilfe des LDH-Tests konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Methoden festgestellt werden. Sie scheinen somit keinen negativen Einfluss auf den Zustand der Hepatozyten-Membran zu haben

Beim Vergleich der beiden verwendeten Medien WME und Hepatozyme-SFM ließ sich hinsichtlich der Membranintegrität kein signifikanter Unterschied feststellen. Die mikroskopische Betrachtung, der in den verschiedenen Medien kultivierten Schweine-Hepatozyten, deckte jedoch deutliche Unterschiede auf (s. Abbildung 5-14). Nur die in WME kultivierten Zellen bildeten einen Monolayer aus und nahmen die für Hepatozyten charakteristische Zellform an.

Im Verlauf einer 14tägigen Kultivierung primärer Schweine-Hepatozyten konnte keine kontinuierliche Zu- oder Abnahme der LDH-Werte beobachtet werden. Die hohen Absorptionswerte an den Tagen 7 und 14 sind auf eine Akkumulierung von LDH im Medium zurückzuführen, da an den Tagen 5, 6, 12 und 13 kein Mediumwechsel erfolgte. In der zweiten Kultivierungswoche konnten höhere LDH-Werte als zu Beginn der Kultivierung nachgewiesen werden, wobei der Unterschied nicht signifikant war. Diese Beobachtungen deckten sich gut mit der mikroskopischen Betrachtung der Hepatozyten. Ab dem neunten Kultivierungstag traten die ersten

Lücken im Zellrasen auf, welche durch das Absterben einiger Zellen hervorgerufen wurden (s. Abbildung 5-24).

5.6.3.8 LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen

In Abbildung 5-35 sind die Ergebnisse der LDH-Freisetzung für HepG2-Zellen dargestellt. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen. Dies führte in einigen Fällen zu negativen Absorptionswerten (Abbildung 5-35).

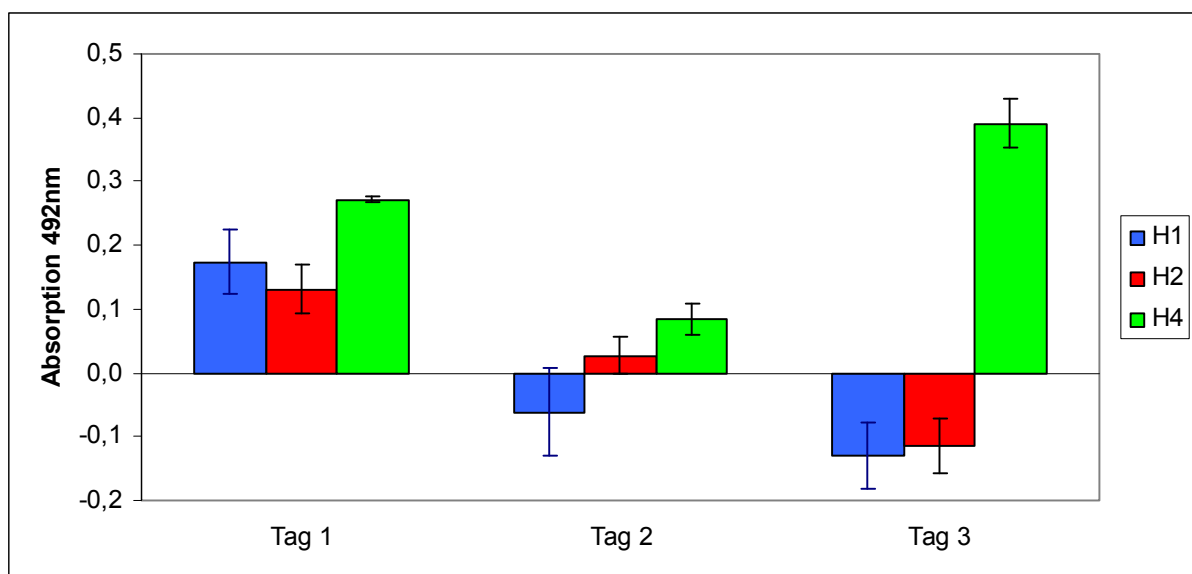


Abbildung 5-35: LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Für die HepG2-Zellen aus H 1 und H 5 wurden die höchsten Absorptionswerte an Tag 1 gemessen. An Tag 2 und Tag 3 kam es zu einem Absinken der Werte. Die HepG2-Zellen aus H 4 wiesen an allen Kultivierungstagen signifikant höhere LDH-Werte auf als die Zellen aus H 1 und H 2. Die höchste LDH-Freisetzung wurde für H 4 an Tag 3 gemessen ($0,4 \pm 0,04$).

5.6.3.9 Veränderung der LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen nach Schadstoffinkubation

Die Auswirkungen der Inkubation der HepG2-Zellen mit Isooctan bzw. PCB sind in Abbildung 5-36 zu sehen. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle

wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen, wodurch sich teilweise negative Werte ergeben.

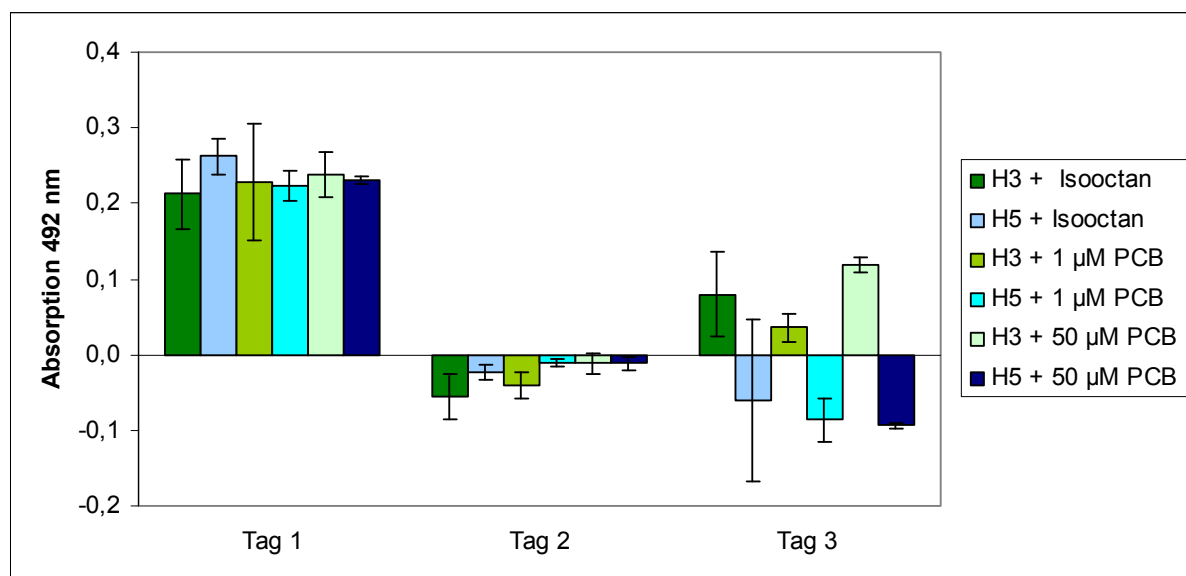


Abbildung 5-36: LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen ($3,8 \times 10^6$ Zellen) nach der Inkubation mit Isooctan bzw. PCB. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Dargestellt sind die Ergebnisse der HepG2-Zellen aus H 3 und H 5. An den Tagen 1 und 2 unterschieden sich die LDH-Werte der zwei Zellpräparationen nicht signifikant. Nach der Schadstoffinkubation kam es zu einer signifikanten Änderung der LDH-Werte ($p < 0,05$). Während die LDH-Freisetzung der Zellen aus H 3 signifikant anstieg, kam es bei den Zellen aus H 5 zu einem signifikanten Absinken der Werte (Ausnahme: H 5 + Isooctan).

In Abbildung 5-37 sind die Ergebnisse der LDH-Freisetzung nach einer Inkubation mit DMSO bzw. PFOS dargestellt. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrolle wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Probe abgezogen.

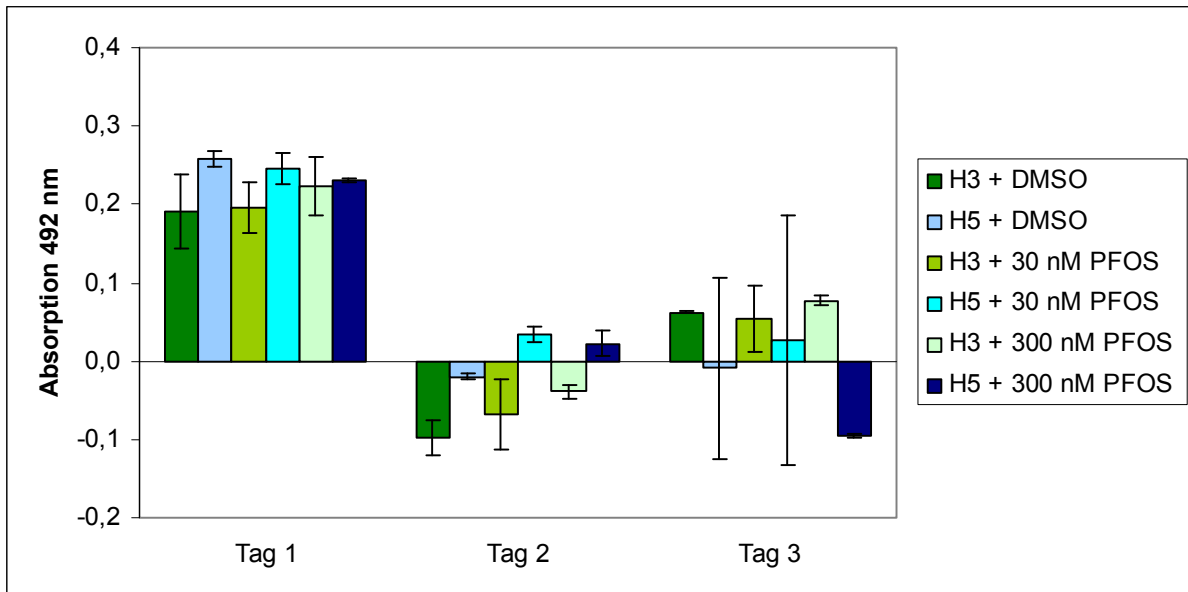


Abbildung 5-37: LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen ($3,8 \times 10^6$ Zellen) nach der Inkubation mit DMSO bzw. PFOS. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Das Datum in der Legende bezieht sich auf den Zeitpunkt der Aussaat. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

Die höchste LDH-Freisetzung erfolgte bei den Zellen aus H 3 und H 5 an Tag 1. Die Unterschiede zwischen den Zellpräparationen waren nicht signifikant. An Tag 2 kam es zu einem signifikanten Absinken der LDH-Werte ($p < 0,05$). Nach einer Inkubation mit DMSO bzw. PFOS stieg die LDH-Freisetzung für H 3 signifikant an ($p < 0,05$). Für die Zellen aus H 5, die mit DMSO bzw. 30 nM PFOS inkubiert wurden, können aufgrund der hohen Standardabweichungen keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Die Inkubation mit 300 nM PFOS führte bei den Zellen aus H 5 zu einer signifikant geringeren LDH-Freisetzung.

5.6.3.10 Diskussion der LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen

Für alle Zellpräparationen wurde die höchste LDH-Freisetzung an Tag 1 nachgewiesen (s. Abbildung 6-35, 6-36, 6-37). Da sich bei der Aussaat der HepG2-Zellen in den Kulturen nur sehr wenig tote Zellen und keine Zelltrümmer befanden, muss es eine andere Ursache für die relativ hohen LDH-Werte geben. Es ist bekannt, dass der Prozess des Passagierens zu einer leichten Schädigung der Zellen führen kann (Freshney 2005; Lindl und Gstrunthaler, 2008), was die hohen Werte an Tag 1 erklären könnte. Bei allen Zellpräparationen kam es an Tag 2 zu einem signifikanten Absinken der Absorptionswerte ($p < 0,05$), was auf eine Erholung der Zellen schließen

lässt. Ein weiteres Absinken der LDH-Werte konnte für die Zellen aus H 1 und H 2 an Tag 3 beobachtet werden (s. Abbildung 5-35). Die Zellen aus H 4 zeigten an Tag 3 dagegen ihre signifikant höchste LDH-Freisetzung (s. Abbildung 5-35). Die LDH-Werte aus H 4 waren zudem an allen drei Kultivierungstagen signifikant höher als bei den Zellen aus H 1 und H 2 ($p < 0,05$). Dieser Unterschied könnte evtl. in einer höheren Zellzahl bei H 4 begründet sein oder durch eine höhere Zellschädigung bedingt sein. Betrachtet man in dem Zusammenhang die Harnstoffwerte, die von den Zellen aus H 1, H 2 und H 4 synthetisiert wurden (s. Abbildung 5-25), so zeigten die Zellen aus H 4 auch in diesem Fall an allen Tagen signifikant höhere Werte als die übrigen Zellen. Die höheren LDH- und Harnstoffwerte lassen sich somit auf einen Fehler bei der Aussaat der Zellen zurückführen und nicht auf eine höhere Zellschädigung. Trotz größter Sorgfalt beim Zählen und Aussäen der Zellen kann ein solcher Fehler nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die Inkubation mit Isooctan bzw. PCB führte bei den HepG2-Zellen zu keiner einheitlichen Änderung der LDH-Freisetzung. Während es bei den Zellen aus H 3 zu einem signifikanten Anstieg kam, sanken die LDH-Werte bei den Zellen aus H 5 signifikant ab (Abbildung 5-36). Die Zellen scheinen unterschiedlich sensibel auf die Inkubation zu reagieren. Die Zellen aus H 3 zeigten auch nach einer Inkubation mit DMSO bzw. PFOS eine erhöhte LDH-Freisetzung (s. Abbildung 5-37). Für die Zellen aus H 5 kann aufgrund der hohen Standardabweichung keine Aussage zum Einfluss der Schadstoffinkubation hinsichtlich der LDH-Freisetzung gemacht werden.

5.6.3.11 Vergleichende Diskussion der LDH-Freisetzung bei den untersuchten Zelltypen

Ein Vergleich der LDH-Werte der einzelnen Zelltypen zeigt, dass die Seehund-Hepatozyten signifikant mehr LDH freisetzen als die Schweine-Hepatozyten und die HepG2-Zellen. Die Seehund-Hepatozyten wiesen an Tag 1 Absorptionswerte von durchschnittlich $1,22 \pm 0,04$ auf. Sie lagen damit etwa viermal so hoch wie die Werte bei den Schweine-Hepatozyten (durchschnittlich $0,3 \pm 0,06$) und sechsmal so hoch wie bei den HepG2-Zellen (durchschnittlich $0,21 \pm 0,07$). An Tag 2 sind diese Unterschiede sogar noch deutlicher. Die Absorptionswerte bei den Seehund-Hepatozyten sind ca. 40x höher als bei den Schweine-Hepatozyten (durchschnittlich $0,50 \pm 0,03$).

vs. $0,01 \pm 0,01$). Korff (2010) wies ebenfalls sehr hohe LDH-Werte bei primären Seehund-Hepatozyten nach. Die LDH-Werte bei den untersuchten Schweine-Hepatozyten betragen in Korff (2010) nur ein Zehntel der Menge, die bei den Seehund-Hepatozyten gefunden wurde (1,5 vs. 0,1). Ein direkter Vergleich der Absorptionswerte zwischen Korff (2010) und der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der unterschiedlich hohen Zellzahl nicht möglich ($6,8 \times 10^4$ vs. $1,5 \times 10^5/\text{cm}^2$). Die Unterschiede in den LDH-Werten bei Seehund- und Schweine-Hepatozyten sind möglicherweise auf einen tierartspezifischen Unterschied des LDH-Gehaltes in den Zellen zurückzuführen. Bhandari et al. (2008) stellten unterschiedlich hohe LDH-Werte bei Ratten- und Affen-Hepatozyten fest.

In der Regel zeigten sowohl die Seehund- als auch die Schweine-Hepatozyten eine sinkende LDH-Freisetzung im Verlauf einer dreitägigen Kultivierung. Ein negativer Einfluss durch eine Schadstoffinkubation ließ sich weder für die Seehund- und Schweine-Hepatozyten noch für die HepG2-Zellen nachweisen.

5.6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Vitalitätstests und abschließende Diskussion

Um die verwendeten Zellen und Methoden umfassend beurteilen zu können, ist es wichtig möglichst verschiedene Vitalitätstests anzuwenden, die auf unterschiedlichen Ebenen greifen. Zusätzlich zu den Vitalitätstests ist eine kontinuierliche mikroskopische Betrachtung unerlässlich. Die Dokumentation von möglicherweise auftretenden morphologischen Veränderungen der Zellen ist von Interesse, um die Daten aus den Tests besser beurteilen zu können.

Von den untersuchten Zelltypen gab es keinen, der in allen Assays die besten Ergebnisse lieferte und somit am vitalsten sein könnte. Dies wäre z. B der Fall gewesen, wenn die betreffenden Zellen sowohl im XTT- als auch im Harnstoff-Test die höchsten Werte liefern würden und gleichzeitig die geringste LDH-Freisetzung zeigen würden. Da die untersuchten Parameter (allgemeiner bzw. spezifischer Stoffwechsel und Membranintegrität) nicht notwendigerweise zusammenhängen, ist es nicht überraschend, dass die Vitalitätstests teilweise ein uneinheitliches Bild liefern.

Die HepG2-Zellen zeigten zwar die höchste Stoffwechselaktivität im XTT-Test, sie wiesen aber gleichzeitig die geringste Harnstoffproduktion auf. Dies könnte darin begründet sein, dass es sich bei den HepG2-Zellen um eine permanente Zelllinie handelt und Zelllinien häufig einen Verlust des spezifischen Metabolismus aufweisen (Lindl und Gstrunthaler, 2008; s. auch Kapitel 3.2). Die Seehund-Hepatozyten zeigten im XTT-Test zwar die niedrigste Stoffwechselaktivität (Pv: $0,5 \pm 0,4$; Schwein: $1,6 \pm 0,4$; HepG2: $1,5 \pm 0,7$), sie produzierten aber von allen untersuchten Zellen die höchsten Harnstoffmengen (Pv: $64 \pm 4,2$ $\mu\text{g/ml}$; Schwein: $47 \pm 3,3$ $\mu\text{g/ml}$; HepG2: $18 \pm 2,0$ $\mu\text{g/ml}$). Für das Zellkulturmodell ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Seehund-Hepatozyten ihren spezifischen Stoffwechsel beibehalten. Diese Voraussetzung wurde, wie die Ergebnisse des Harnstoff-Tests zeigen, erfüllt. Obwohl die Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test gering ist, wiesen alle Zellpräparationen zu jedem Zeitpunkt höhere Absorptionswerte auf als Medium und waren somit vital.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Schadstoffinkubationen für die drei Vitalitätstests XTT, Harnstoff und LDH nach Zelltyp geordnet vorgestellt und diskutiert. In Abbildung 5-38 sind die Ergebnisse aus den Inkubationsexperimenten mit Seehund-Hepatozyten zusammengefasst. Dargestellt sind die Veränderungen nach der Schadstoffinkubation an Tag 3 im Vergleich zu Tag 2 (vor der Schadstoffgabe). In den Spalten sind die beprobten Tiere eingetragen und in den Zeilen sind die verwendeten Schadstoffkonzentrationen abzulesen.

Ergebnisse und Diskussion

| Test | Schadstoff | Pv 19 | Pv 20 | Pv 21 | Pv 22 | Pv 23 |
|-----------|-------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| XTT | Isooctan | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | signifikanter Anstieg | keine Messung |
| | 1 µM PCB | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | signifikanter Anstieg | keine Messung |
| | 50 µM PCB | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung | keine Messung |
| | DMSO | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| | 30 nM PFOS | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| | 300 nM PFOS | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| Harnstoff | Isooctan | signifikanter Abfall | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung | signifikanter Abfall |
| | 1 µM PCB | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| | 50 µM PCB | signifikanter Abfall | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung | signifikanter Anstieg |
| | DMSO | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| | 30 nM PFOS | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| | 300 nM PFOS | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| LDH | Isooctan | signifikanter Abfall | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | signifikanter Anstieg | signifikanter Anstieg |
| | 1 µM PCB | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| | 50 µM PCB | signifikanter Abfall | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | signifikanter Abfall | signifikanter Anstieg |
| | DMSO | keine Messung | keine Messung | keine Messung | signifikanter Abfall | keine Messung |
| | 30 nM PFOS | keine Messung | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Aussage möglich | keine Messung |
| | 300 nM PFOS | keine Messung | keine Messung | keine Messung | signifikanter Abfall | keine Messung |

Abbildung 5-38: Reaktionen der Seehund-Hepatozyten auf die Schadstoffinkubation im XTT-, Harnstoff- und LDH-Test. Dargestellt sind die Veränderungen nach Schadstoffeinfluss an Tag 3 im Vergleich zu Tag 2 (vor Schadstoffgabe); Spalte: beprobtes Tier; Zeile: Schadstoffkonzentration

keine Messung
 keine Aussage möglich
 keine signifikante Änderung
 signifikanter Abfall
 signifikanter Anstieg

Wie der Abbildung 5-38 zu entnehmen ist, reagierten die Seehund-Hepatozyten individuell sensibel auf eine Schadstoffinkubation. Im XTT-Test konnte keine signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität nach einer Inkubation mit Isooctan, 1 μM bzw. 50 μM PCB beobachtet werden. Bei den Hepatozyten aus dem Tier Pv 22 konnte stattdessen ein signifikanter Anstieg der XTT-Werte nach einer Inkubation mit Isooctan bzw. 1 μM PCB festgestellt werden. Die Ursache dieses Anstiegs konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. In der Literatur sind Studien beschrieben, die in Fressexperimenten an Ratten (Gilroy *et al.*, 1998; Connell *et al.*, 1999) und Fischen (Quabius *et al.*, 1997) mit PCB-haltigem Futter eine Zunahme der Mitochondrien-Zahl beobachten konnten (s. Kapitel 5.6.1.3). Eine Erhöhung der Mitochondrien-Zahl würde zu einem vermehrten Ablauf der Atmungskette führen und sich in höheren Absorptionswerten im XTT-Test niederschlagen. Allerdings sind in der Literatur keine *in vitro* Experimente beschrieben, in denen es nach einer Inkubation mit PCBs zu einem Anstieg der Mitochondrien-Zahl kommt bzw. in denen dies untersucht wurde.

Für die Inkubation mit DMSO, 30 nM bzw. 300 nM PFOS kann im XTT-Test keine Aussage gemacht werden, da die finale DMSO-Konzentration im Medium zu hoch war (0,1%) und es dadurch in allen Zellpräparationen zu einem signifikanten Abfall der Stoffwechselaktivität kam. Die Zellen aus Pv 21 und Pv 22 wiesen aber weiterhin signifikant höhere Werte als das Medium auf und waren somit vital. Bei Pv 20 kam es aufgrund eines Fehlers in der Schadstoffapplikation zu einem Verlust der Vitalität (s. Kapitel 5.6.1.3). Die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen führten bei den Seehund-Hepatozyten im XTT-Test, wie erwartet, nicht zu einem Absterben der Zellen. Diese Ergebnisse werden auch durch die Studie von Korff (2010) gestützt, die bei der Inkubation von Seehund-Hepatozyten mit PCB (Isooctan, 1 bzw. 50 μM PCB) und PFOS (DMSO, 3; 30; 3000; 30000 nM) keine signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität im XTT-Test feststellen konnte. In allen Fällen, in denen eine Änderung der Stoffwechselaktivität eintrat, handelte es sich um einen signifikanten Anstieg.

Die Ergebnisse des Harnstoff-Tests der Seehund-Hepatozyten lieferten nach der Inkubation mit Isooctan bzw. 50 μM PCB ein sehr heterogenes Bild (s. Abbildung

5-18 und 5-38). Es konnte sowohl eine sinkende Harnstoffsynthese (Pv 19; Pv 23 mit Isooctan) als auch eine steigende Harnstoffproduktion beobachtet werden (Pv 23 mit 50 μ M PCB). Die Hepatozyten aus Pv 22 zeigten keine Veränderung nach der Schadstoffinkubation. Die Hepatozyten aus den drei Tieren reagierten somit individuell verschieden auf die Schadstoffinkubation. Individuelle Unterschiede in der Reaktion auf eine Schadstoffinkubation konnten ebenfalls Silkworth *et al.* (2005) an humanen Hepatozyten feststellen. Die Auswirkungen einer PCB-Inkubation, fielen bei den Zellen aus verschiedenen Patienten, unterschiedlich aus. Die kleine Datenmenge und die heterogenen Ergebnisse lassen in der vorliegenden Arbeit keine eindeutige Aussage zum Einfluss von PCBs auf die Harnstoffsynthese primärer Seehund-Hepatozyten zu. Es kann jedoch festgehalten werden, dass die gewählten Schadstoffkonzentrationen nicht zu einem Verlust des spezifischen Stoffwechsels führten (Werte signifikant höher als die Mediumkontrolle). Aufgrund einer zu hohen DMSO-Konzentration in den Proben, kam es im Harnstoff-Test zu einer Störung der Urease (s. Kapitel 4.9.2 und 5.6.2.2). Es liegen somit keine Ergebnisse zum Einfluss von PFOS auf die Harnstoffsynthese primärer Seehund-Hepatozyten vor. Korff (2010) konnte in Ihrer Arbeit keinen signifikanten Einfluss einer Inkubation mit PCB bzw. PFOS auf die Harnstoffsynthese primärer Seehund-Hepatozyten detektieren.

Ebenso wie die Harnstoffsynthese lieferte auch die LDH-Freisetzung bei primären Seehund-Hepatozyten nach einer Inkubation mit Isooctan bzw. 50 μ M PCB uneinheitliche Ergebnisse. Während die LDH-Werte bei den Hepatozyten aus Pv 19 nach der Inkubation signifikant abnahmen, kam es bei Pv 23 zu einem signifikanten Anstieg der Werte (s. Abbildung 5-28 und 5-38). Bei den Hepatozyten aus Pv 22 konnte nach einer Inkubation mit Isooctan eine signifikante Zunahme der LDH-Freisetzung beobachtet werden, während es nach der Inkubation mit 50 μ M PCB zu einer signifikanten Abnahme kam. Nach einer Inkubation mit DMSO bzw. 300 nM PFOS kam es bei den Hepatozyten aus Pv 22 zu einer signifikanten Verringerung der LDH-Freisetzung. Die Zellpräparationen aus Pv 20 und Pv 21 zeigten keine signifikante Veränderung. Die Hepatozyten aus den einzelnen Tieren reagierten individuell unterschiedlich auf die Schadstoffinkubation. Eine Inkubation mit Isooctan bzw. PCB schien in einem Fall (Pv 23) eine Membranschädigung hervorzurufen. In

einigen Studien konnte gezeigt werden, dass PCBs eine Schädigung der Zellmembran hervorrufen. Katynski *et al.* (2004) stellten eine Veränderung der Hepatozytenmembran bei Hühnerembryonen fest, die *in ovo* PCB 126 ausgesetzt waren. In anderen Untersuchungen konnten Veränderungen der Zellmembran nach PCB-Inkubation bei primären Nierenzellen (López-Aparicio *et al.*, 1997) und in neuronalen Zellen aus der Ratte (Sánchez-Alonso *et al.*, 2004) gezeigt werden. Wie die Ergebnisse aus dem XTT- und Harnstoff-Test zeigen, wirkte sich die Schadstoffinkubation der Zellen aus Pv 23 jedoch nicht negativ auf die Vitalität der Zellen aus. Eine Inkubation mit DMSO scheint keinen Einfluss auf die Zellmembran primärer Seehund-Hepatozyten zu haben. Korff (2010) konnte ebenfalls keine signifikante Membranschädigung bei primären Seehund-Hepatozyten nach einer Inkubation mit PCB bzw. PFOS feststellen.

Insgesamt betrachtet zeigen die Ergebnisse aus den drei Vitalitätstests, dass eine Inkubation der primären Seehund-Hepatozyten mit Isooctan bzw. 50 µM PCB nicht zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Vitalität in den untersuchten Tests führte. Zum Einfluss einer Inkubation mit DMSO bzw. 300 nM kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage gemacht werden. Allerdings lassen die Ergebnisse aus Korff (2010) den Schluss zu, dass die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen ebenfalls zu keinem signifikanten Vitalitätsverlust in den angewendeten Tests führten.

Die für das Zellkulturmodell gewählten Schadstoffkonzentrationen scheinen somit für die Inkubationsexperimente geeignet zu sein.

Aufgrund von Zeitmangel und dem Bedarf an Zellen für die Etablierungs- und Optimierungsversuche, wurde bei den Schweine-Hepatozyten der Schadstoffeinfluss lediglich im XTT-Test untersucht. Wie bereits bei den Seehund-Hepatozyten beobachtet werden konnte, reagierten auch die Schweine-Hepatozyten individuell verschieden auf die Schadstoffinkubation. Während bei den Hepatozyten aus S 23 und S 29 keine Änderung der Stoffwechselaktivität im XTT-Test festgestellt werden konnte, kam es bei S 25 nach einer Inkubation mit 50 µM PCB, DMSO und 30 nM PFOS zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität (s. Abbildung 5-39). Da die Zellen weiterhin signifikant höhere Werte als das Medium aufwiesen, behielten sie ihre Stoffwechselaktivität im XTT-Test bei (s. Abbildung 5-11, 8-2 und 8-3).

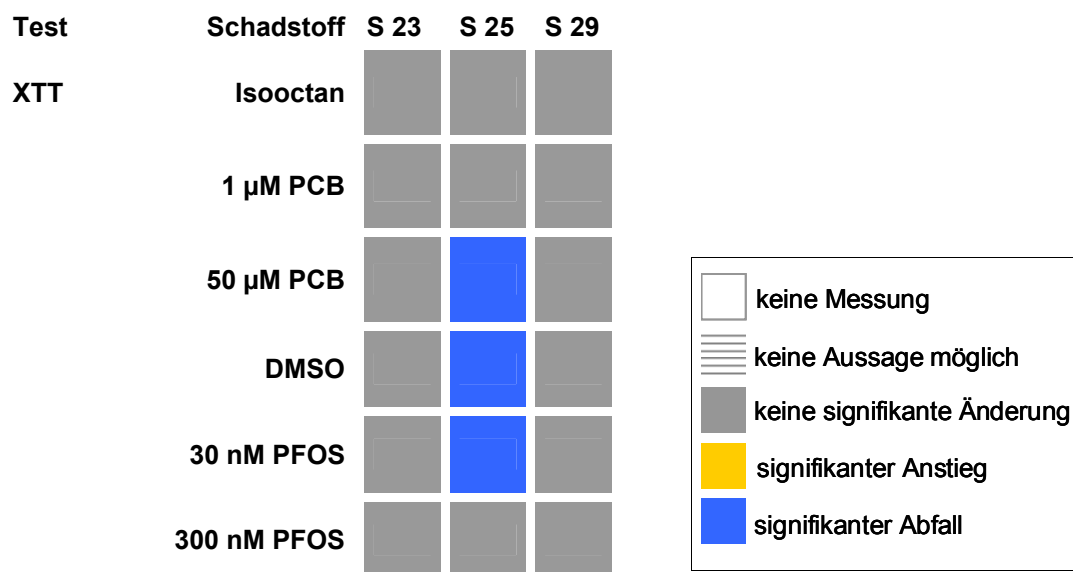


Abbildung 5-39: Reaktionen der Schweine-Hepatozyten auf eine Schadstoffinkubation im XTT-Test. Dargestellt sind die Veränderungen nach Schadstoffeinfluss an Tag 3 im Vergleich zu Tag 2 (vor Schadstoffinkubation); Spalte: beprobtes Tier; Zeile: Schadstoffkonzentration

Anhand der Schweine-Hepatozyten wurden die beiden Isolierungsmethoden Gewebedissoziation in Medium und die Leberbiopsie Perfusion sowie die beiden Medien Hepatozyme-SFM und WME beurteilt. Sowohl im XTT- als auch im Harnstoff-Test konnte für die Hepatozyten, die mit der Methode Gewebedissoziation in Medium isoliert wurden, keine Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden (s. Abbildung 5-12 und Abbildung 5-21). Im Gegensatz dazu waren die mittels Leberbiopsie Perfusion gewonnen Zellen in beiden Tests stoffwechselaktiv. Dies deckte sich ebenfalls mit den mikroskopischen Beobachtungen. Nur die Hepatozyten, die mit der Leberbiopsie Perfusion isoliert wurden hefteten sich am Boden der Zellkulturflaschen an und bildeten im Verlauf der Kultivierung einen konfluenten Monolayer aus (s. Abbildung 5-3 und Abbildung 5-6). Mit dem LDH-Test konnte kein Unterschied zwischen den verwendeten Isolierungsmethoden detektiert werden. Dieses Beispiel verdeutlicht nochmals, dass es zur Beurteilung von Zellkulturen unerlässlich ist, verschiedene Vitalitätstests parallel zu verwenden.

Beim Vergleich der beiden Medien Hepatozyme-SFM und WME wurden ebenfalls eindeutige Ergebnisse erzielt. Die in Hepatozyme-SFM kultivierten Hepatozyten, zeigten eine signifikant geringere Stoffwechselaktivität (XTT-Test) und Harnstoffsynthese als die in WME kultivierten Zellen (s. Abbildung 5-13 und Abbildung 5-22).

Auch in diesem Fall deckten sich die mikroskopischen Betrachtungen mit den Ergebnissen aus den beiden Zelltests. Lediglich die in WME kultivierten Schweine-Hepatozyten bildeten einen Monolayer aus. Mikroskopische Begutachtungen können keinesfalls Zelltests ersetzen, sie ermöglichen jedoch eine zusätzliche Beurteilung der Ergebnisse. Mit dem LDH-Test konnte kein Unterschied zwischen den verwendeten Zellkulturmedien detektiert werden.

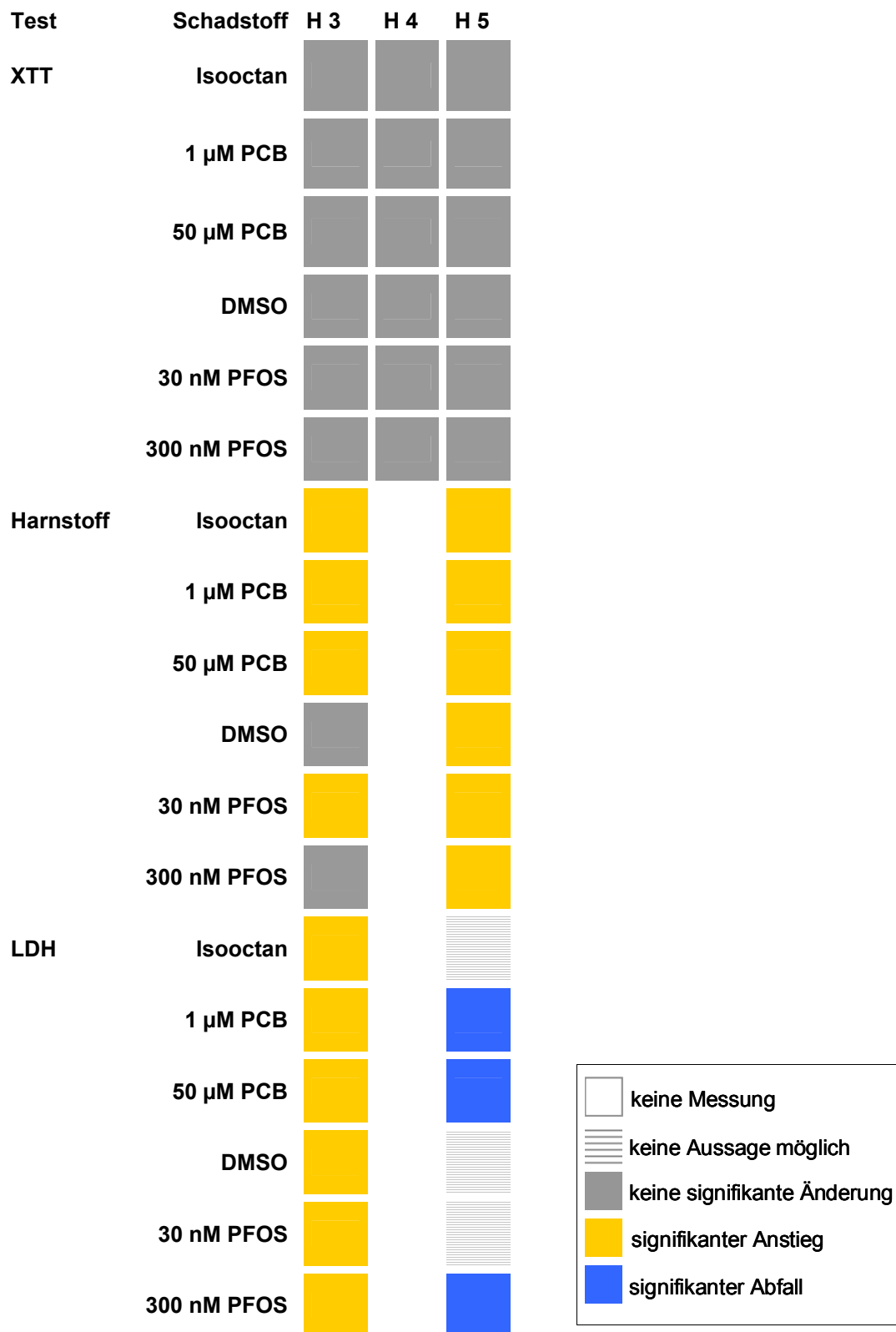


Abbildung 5-40: Reaktionen der HepG2-Zellen auf eine Schadstoffinkubation im XTT-, Harnstoff- und LDH-Test. Dargestellt sind die Veränderungen nach Schadstoffeinfluss an Tag 3 im Vergleich zu Tag 2 (vor Schadinkubation); Spalte: Zellpräparation; Zeile: Schadstoffkonzentration

Die HepG2-Zellen reagierten im XTT- und Harnstoff-Test unempfindlicher auf die Schadstoffinkubation als die primären Seehund- und Schweine-Hepatozyten. Im XTT-Test konnte keine Änderung der Stoffwechselaktivität nach einer Schadstoffinkubation festgestellt werden (s. Abbildung 5-40). Die Ergebnisse aus dem Harnstoff-Test lieferten ein sehr einheitliches Bild. Nach einer Inkubation mit Isooctan, 1 μM bzw. 50 μM PCB kam es zu einem Anstieg der Harnstoffsynthese. Dieser Anstieg ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass HepG2-Zellen ein Zellwachstum (Proliferation) zeigen und sich somit die Anzahl der Zellen im Verlauf der Kultivierung erhöht. Die Ergebnisse aus dem LDH-Test lieferten konträre Ergebnisse für die beiden Zellpräparationen und lassen damit keine eindeutige Beurteilung zu. Für H 3 kam es nach der Schadstoffinkubation zu einem signifikanten Anstieg der Werte während die LDH-Freisetzung bei H 5 abnahm. Aufgrund der hohen Standardabweichung kann für die Zellen, die mit Isooctan, DMSO bzw. 30 nM PFOS inkubiert wurden, keine Aussage zur Höhe der LDH-Werte gemacht werden.

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Tests lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen. In allen eingesetzten Tests und bei allen untersuchten Zelltypen kommt es teilweise zu individuellen Reaktionen auf einen Schadstoffeinfluss. Aufgrund der geringen Datenmenge müssen die Ergebnisse daher kritisch betrachtet werden. Diese von Individuum zu Individuum unterschiedlichen Reaktionen können z. B. durch genetische Faktoren, Ernährungszustand oder Umwelteinflüsse bedingt sein (Bayliss und Somers, 2005) und lassen sich nie ganz ausschließen. Durch den zusätzlichen Vergleich mit Daten aus der Studie von Korff (2010), lassen sich die Ergebnisse besser absichern.

Eine Inkubation mit Isooctan, 1 μM bzw. 50 μM PCB führte bei den primären Seehund-Hepatozyten im XTT-, Harnstoff- und LDH-Test nicht zu einem Vitalitätsverlust. Über den Einfluss einer Inkubation mit DMSO, 30 nM bzw. 300 nM PFOS kann in der vorliegenden Arbeit, aufgrund von Fehlern in der Durchführung, keine Aussage gemacht werden. Korff (2010) konnte in ihrer Studie jedoch zeigen, dass die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen nicht zu einem Verlust der Vitalität in den verwendeten Tests (XTT-, Harnstoff- und LDH-Test) führten. Die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen erfüllen somit die Prämisse für das Zellkulturmodell, dass

die Inkubationsexperimente nicht zu einem Absterben der Zellen führen dürfen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass erstmals die Isolierung primärer Seehund-Hepatozyten aus frischtoten Tieren gelang und, dass die Zellen sowohl ihren allgemeinen als auch den spezifischen Stoffwechsel beibehielten. Dies ermöglicht die Verwendung der Zellen im Zellkulturmodell.

Mit Hilfe der Vitalitätstests konnte an primären Schweine-Hepatozyten gezeigt werden, dass die Wahl der Isolierungsmethode und des Mediums die Vitalität der Hepatozyten entscheidend beeinflussen. Nur die Isolierung mit der Leberbiopsie Perfusion und der anschließenden Kultivierung in WME Medium führte zu vitalen Zellen (im XTT- und Harnstoff-Test).

Die HepG2-Zellen sollten dazu dienen, die Ergebnisse aus den Vitalitätstests mit primären Hepatozyten besser einschätzen zu können. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zellen, wie erwartet, auf eine Schadstoffinkubation unsensibler reagierten als die primären Hepatozyten (s. Kapitel 3.2). Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus einer Studie von Silkworth *et al.* (2005), die den Einfluss von TCDD, PCB 126 und Aroclor 1254 auf primäre Hepatozyten aus Menschen, Ratten, Affen und HepG2-Zellen untersuchten (Silkworth *et al.*, 2005). Sie stellten hierbei fest, dass die humanen Zellen (primäre Hepatozyten und HepG2-Zellen) wesentlich weniger empfindlich (Faktor 10-1000) auf eine Schadstoffinkubation reagierten als die übrigen Zellen. Diese Studie verdeutlicht wie wichtig es ist, artspezifische Untersuchungen hinsichtlich des Schadstoffeinflusses durchzuführen. Die Beobachtungen verdeutlichen nochmals, dass es unerlässlich ist für das Zellkulturmodell primäre Hepatozyten zu verwenden. Eine Übertragung der HepG2-Daten auf die Seehund-Hepatozyten ist nicht möglich.

Wie die Arbeit von Korff zeigte, können ebenso wenig die Daten von primären Hepatozyten aus anderen Tierarten (in diesem Fall Schwein) auf Seehunde übertragen werden. Die Schweine-Hepatozyten reagierten im XTT- und Harnstofftest weniger sensibel auf eine Schadstoffinkubation als die Seehund-Hepatozyten.

5.7 Allgemeine Bewertung des *in vitro* Zellkulturmodells

Seehunde als Endglieder der marinen Nahrungskette gelten als gute Indikatoren für die Bewertung des Zustandes des Ökosystems Wattenmeer (Reijnders *et al.*, 2005). Zur Beurteilung eignet sich unter anderem der Gesundheitszustand der Tiere, der mit Hilfe einiger Monitoring Programme charakterisiert wird. Hierzu gehört vor allem das Totfund- und Lebendmonitoring, welches am FTZ erfolgt (Siebert *et al.*, 2003, 2007). Es wird vermutet, dass die Gesundheit der Seehunde durch die Belastung mit Schadstoffen negativ beeinflusst wird (Jepson *et al.*, 1999, 2005; Ross, 2002; Reijnders, 2003b; Reijnders *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2009). Um diesen Hintergrund genauer analysieren zu können, sind geeignete Biomarker notwendig, die die Auswirkungen des Schadstoffeinflusses anzeigen. Auf diesen Überlegungen basiert die Motivation für die vorliegende Arbeit.

Die Identifizierung geeigneter Biomarker für ein Lebendmonitoring an Seehunden ist das Ziel unserer Arbeitsgruppe. Für diese Zielsetzung sollte in der vorliegenden Arbeit ein Zellkulturmodell entwickelt werden auf dessen Grundlage die Identifizierung der Biomarker erfolgen kann. Das Prinzip des Zellkulturmodells basiert auf der Tatsache, dass Xenobiotika u. a. Auswirkungen auf den Proteinhaushalt haben. Durch den Schadstoffeinfluss kann das Expressionslevel von Proteinen hoch- oder dereguliert werden, wodurch es zu einer Änderung des Proteinexpressionsmusters kommt (Fountoulakis *et al.*, 2002). Diese Modifikation kann mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) dargestellt werden (Brenez *et al.*, 2004; Görg *et al.*, 2004). Als mögliche Biomarker eignen sich Proteine, deren Expressionslevel spezifisch durch bestimmte Schadstoffe hoch- oder dereguliert wird (Brenez *et al.*, 2004; Monsinjon und Knigge, 2007; Fossi *et al.*, 2008). Die Identifizierung der Proteine kann mit massenspektrometrischen Methoden vorgenommen werden (z. B. MALDI-TOF-TOF). Um die Biomarker im Lebendmonitoring anwenden zu können, müssen sie im Blut lebender Tiere nachweisbar sein. Dies ist einer der Gründe warum für das Zellkulturmodell Hepatozyten verwendet werden. Hepatozyten sind zum einen maßgeblich am Fremdstoffmetabolismus beteiligt und synthetisieren zum anderen *in vivo* und *in vitro* Plasmaproteine. Die Plasmaproteine lassen sich *in vitro* im Zellkulturmedium detektieren (Gómez-Lechón *et al.*, 1990; Farkas *et al.*, 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ausarbeitung des Zellkulturmodells. Um ein geeignetes Zellkulturmodell für die gegebene Fragestellung entwickeln zu können, müssen verschiedene Parameter berücksichtigt werden. Für das Zellkulturmodell müssen Hepatozyten aus Seehunden eingesetzt werden, weil insbesondere der Fremdstoffmetabolismus artspezifisch ist (Jover *et al.*, 1992; Dickens *et al.*, 2008). Da nur primäre Zellen den *in vivo* Zustand gut widerspiegeln, können für das Modell keine Zelllinien verwendet werden (Li, 1998; Donato *et al.*, 1999, Schmitz, 2009). Der erste Schritt in der Entwicklung des Zellkulturmodells war die Etablierung einer geeigneten Methode zur Isolierung primärer Seehund-Hepatozyten, da in der Literatur bisher keine Isolierung von Seehund-Hepatozyten beschrieben wurde. Die Isolierungsmethode war an einige Rahmenbedingungen gebunden. Die Isolierung der Hepatozyten konnte nur aus frischtoten Tieren erfolgen, die eines natürlichen Todes verstarben oder aufgrund eines sehr schlechten Gesundheitszustandes tierschutzgerecht getötet werden mussten (s. Kapitel 4.4.1). Die Leber konnte nicht komplett verwendet werden, da Proben für weitere Untersuchungen (z. B. Pathologie, Schadstoffkonzentration) vorgehalten werden mussten. Aus diesem Grund musste eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, aus Leberproben frischtoter Tiere Zellen mit einer hohen Vitalität und in ausreichend hoher Ausbeute zu isolieren. Die Beprobung der Seehunde war nicht planbar, so dass die verwendete Methode ohne lange Vorbereitungszeit durchführbar sein musste.

Die erforderliche Höhe der Zellausbeute war zum einen durch die Gegebenheiten in der Zellkultur bedingt (Zellzahl muss gute Kultivierungsbedingungen ermöglichen) und zum anderen musste die Zellzahl in den Kulturen so hoch sein, dass für die nachfolgende Proteomanalyse ausreichend Material zur Verfügung stand. Daraus ergab sich eine benötigte Zellausbeute von $3,5 \times 10^7$ Zellen pro Isolierung. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Isolierungsmethoden getestet (z. B. Explantat Kultur, Gewebedissoziation in Medium, Leberbiopsie Perfusion), wobei lediglich die Leberbiopsie Perfusion alle genannten Rahmenbedingungen erfüllte. Diese Methode ermöglichte eine Isolierung von durchschnittlich $3,5 \times 10^7$ Zellen mit einer Vitalität 79-99% (mit Trypanblau ermittelt). Die Größe des Leberstücks sollte ca. 70 g betragen, um eine optimale Ausbeute zu erreichen. Ein größeres Stück führte eher zu einer geringeren Zellausbeute. Dieser Zusammenhang war allerdings nicht immer

gegeben. Andere Parameter wie das Alter der Tiere, Geschlecht oder die Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und dem Beginn der Zellisolierung korrelierten in der vorliegenden Arbeit nicht mit der Höhe der Zellausbeute. Diese Beobachtung deckt sich mit Daten aus der Literatur (Schulze-Bergkamen *et al.*, 2003; Serralta *et al.*, 2003; Vondran *et al.*, 2008). Die Dauer der einzelnen Perfusions-schritte richtete sich vornehmlich nach dem Zustand des Leberstücks. Die Prä-perfusion wurde i. d. R. für 30 min durchgeführt und wurde abgebrochen, wenn das Leberstück vollständig entblutet war. Im Anschluss daran erfolgte die Perfusion, die 15-20 min dauerte und beendet wurde, wenn das Leberstück eine merklich weichere Konsistenz aufwies als zu Beginn der Prozedur.

Damit die Seehund-Proben für die Proteomanalyse verwendet werden können, müssen alle Arbeitsschritte so abgestimmt werden, dass sie mit der Proteomanalyse kompatibel sind. Dies betrifft u. a. die Zellzahl mit der die Hepatozyten ausgesät werden. Hierbei erwies sich in der vorliegenden Arbeit eine Zellzahl von $3,8 \times 10^6$ Zellen pro Zellkulturflasche (25 cm^2) als optimal. Diese Zellzahl ermöglichte eine geeignete Zelldichte für die Kultivierung der primären Seehund-Hepatozyten und lieferte zeitgleich eine ausreichend hohe Proteinmenge ($450 \text{ } \mu\text{g/Gel}$) für die 2D-Gelelektrophorese. Diese Proteinmenge ermöglichte zum einen die Färbung der Gele mit Coomassie® Brilliant Blue und erlaubte zum anderen die Identifizierung der Proteine mit MALDI. Die Proteinextraktion musste in einem Medium erfolgen, welches nicht zu Störungen in der 2D-Gelelektrophorese führt. In der vorliegenden Arbeit erwies sich eine Aufnahme der Seehund-Hepatozyten in Rehydrierungspuffer mit einem anschließenden Ultraschall-Aufschluss als geeignet (s. Kapitel 4.11). Des Weiteren war es notwendig, die Zellen in serumfreiem Zellkulturmedium zu kultivieren, da ansonsten Proteine aus dem Serum relevante Proteine in der 2D-Gelelektrophorese überlagern könnten.

Damit mit dem Zellkulturmodell die gegebene Fragestellung geklärt werden kann ist es entscheidend, dass die Seehund-Hepatozyten ihre Vitalität auch nach der Isolierung und während der Kultivierung aufrechterhalten. Um die Vitalität der Hepatozyten zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Vitalitätstests verwendet: der XTT-Test (allgemeine Stoffwechselaktivität), die Harnstoffsynthese (leberspezifischer Stoffwechsel) und der LDH-Test (Membran-

integrität). Diese Tests wurden ausgewählt, da sie verlässliche Daten liefern, einfach und zeitsparend in der Anwendung sind, ohne radioaktive Stoffe auskommen und eine gute Charakterisierung der Zellen ermöglichen. Xenobiotika können die Zellvitalität auf vielfältige Weise beeinflussen. Deshalb ist es wichtig mehrere Tests, die auf unterschiedlichen Ebenen greifen, parallel anzuwenden.

Mit Hilfe der Vitalitätstests wurde u. a. der Einfluss zwei verschiedener Isolierungsmethoden (Gewebedissoziation in Medium, Leberbiopsie Perfusion) und zweier Medien (Hepatozyme-SFM, WME) auf die Vitalität der Zellen untersucht. Die Experimente wurden an primären Schweine-Hepatozyten durchgeführt, da das Zellmaterial aus Seehunden begrenzt war. Die Ergebnisse aus dem XTT- und Harnstoff-Test zeigten, dass eine Isolierung vitaler Hepatozyten nur mit der Leberbiopsie Perfusion möglich war (s. Abbildung 5-12 und Abbildung 5-21). Wurden die Hepatozyten anschließend in WME kultiviert, zeigten sie in beiden Tests eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität als Zellen, die in Hepatozyme-SFM kultiviert wurden (s. Abbildung 5-13 und Abbildung 5-22). Im LDH-Test konnte weder ein Unterschied bei den Isolierungsmethoden noch bei den verwendeten Kulturmedien detektiert werden. Diese Beobachtung unterstreicht erneut die Notwendigkeit, dass es zur Beurteilung von Zellkulturen erforderlich ist, verschiedene Vitalitätstests parallel anzuwenden.

Der zentrale Teil des Zellkulturmodells sind die Inkubationsexperimente mit den Schadstoffen PCB und PFOS bzw. den dazugehörigen Lösungsmitteln. Die verwendeten Schadstoffmengen orientierten sich an Konzentrationen, die in Seehunden aus der Deutschen Nordsee nachgewiesen wurden. Die Zellen wurden demnach mit Schadstoffen in umweltrelevanten Konzentrationen inkubiert (s. Kapitel 4.10). Für die Inkubationsexperimente wurden die primären Seehund-Hepatozyten entweder mit Isooctan, 1 μM bzw. 50 μM oder mit DMSO, 30 nM bzw. 300 nM PFOS inkubiert (jeweils in dreifacher Ausführung). Ein vollständiger Inkubationsansatz umfasste i. d. R. neun Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm^2). In einigen Fällen war die Zellausbeute jedoch zu gering, so dass lediglich 6 Flaschen angesetzt werden konnten, die mit dem Lösungsmittel bzw. der hohen Schadstoffkonzentration inkubiert wurden. Die Schadstoffinkubation erfolgte 48 h nach der Zellisolierung und dauerte 24 h. Der Beginn der Inkubationsexperimente wurde so gewählt, dass sich

die Hepatozyten sich an die Kultivierungsbedingungen gewöhnen können und gleichzeitig die Kultivierungsdauer noch nicht so weit fortgeschritten ist, dass in den Zellen ein Verlust an Enzymaktivitäten eintritt. Eine ausreichende Akklimatisierung der Zellen und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten sind notwendig für den Erhalt des differenzierten Phänotyps sowie für die Expression und Induktion von Enzymen des Cytochrom P450-Enzymkomplexes (Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983; Corlu *et al.*, 1991; Maurel, 1996). Mit fortschreitender Kultivierungsdauer konnte in der Literatur eine Verringerung der Enzymaktivität bei Hepatozyten festgestellt werden (Gómez-Lechón *et al.*, 1990; Skett, 1994; Bayliss und Somers, 2005). Durch den Verlust von Enzymaktivität würden die Zellen den *in vivo* Zustand nur noch unzureichend widerspiegeln, was für die Fragestellung in der vorliegenden Arbeit nicht erwünscht ist. Der mögliche Verlust der Enzymaktivität spielte ebenfalls eine Rolle bei der Wahl der Inkubationsdauer. Als Dauer für die Schadstoffinkubation wurde ein Zeitraum von 24 h gewählt. Durch die insgesamt kurze Kultivierungszeit von 72 h (von der Isolierung bis zur Proteinextraktion) sollte ein Absinken der Enzymaktivität verhindert werden. Eine Inkubationszeit von 24 h wird in zahlreichen Studien an HepG2-Zellen und primären Hepatozyten eingesetzt, um die Auswirkungen einer PCB-Inkubation zu analysieren. In den Studien wurde sowohl die Zytotoxizität der PCBs evaluiert als auch die Induktion von Cytochrom P450 Enzymen untersucht (Thomé *et al.*, 1995; Sanderson *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2006; Aly und Domenech, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Eine Inkubationszeit von 24 h wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit als geeignet angesehen.

Für die Funktionsweise des Zellkulturmodells ist es wichtig, dass die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen zwar eine Veränderung in der Proteinexpression hervorrufen, es jedoch nicht zu einem Verlust der Zellvitalität oder zu morphologisch sichtbaren Veränderungen kommt. Um dies zu überprüfen, wurde die Vitalität der Seehund-Hepatozyten vor und nach der Schadstoffinkubation mit den drei genannten Tests analysiert. Die Inkubation mit Isooctan, 1 μM bzw. 50 μM führte in keinem der Assays zu einem Verlust der Stoffwechselaktivität. Zu den Auswirkungen einer Inkubation mit DMSO, 30 nM bzw. 300 nM PFOS kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage getroffen werden. Die DMSO-Konzentration von 0,1% (v/v) führte im XTT-Test in allen Proben (außer den Kontrollzellen ohne DMSO oder

PFOS) zu einem signifikanten Absinken der Stoffwechselaktivität. Eine Messung der Harnstoffmengen konnte nicht erfolgen, weil die DMSO-Konzentration in den Proben (0,1% (v/v)) die Aktivität der Urease hemmte. Beim Harnstoff-Test standen, aufgrund des begrenzten Zellmaterials, keine Kontrollzellen (ohne DMSO oder PFOS Inkubation) zur Verfügung. Untersuchungen an primären Seehund-Hepatozyten von Korff (2010), die mit derselben PFOS-Konzentration aber einer geringeren DMSO-Konzentration durchgeführt wurden, zeigten keine signifikante Beeinträchtigung der Vitalität im XTT-, Harnstoff- oder LDH-Test. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Schadstoffkonzentrationen können somit in nachfolgenden Studien für das Zellkulturmodell angewendet werden.

Behr (2008a,b) konnte in einer ersten Testreihe zeigen, dass die verwendeten Schadstoffkonzentrationen zu einer Veränderung im Proteom der Seehund-Hepatozyten führten. Hierfür wurden Proteinextrakte aus Seehund-Hepatozyten analysiert, die in der vorliegenden Arbeit mit Isooctan, 1 µM, 50 µM bzw. 100 µM PCB inkubiert wurden. Nach der Inkubation mit 50 µM bzw. 100 µM PCB konnte für einige Enzyme eine signifikante Änderung im Expressionslevel detektiert werden. Diese Proteine wurden anschließend von Behr (2008a,b) mit MALDI-TOF-TOF vorläufig identifiziert. Eine vollständige Sequenzierung der Proteine steht noch aus. Ein Datenbankabgleich mit Proteinsequenzen aus anderen Säugetieren lieferte Hinweise darauf, dass die Proteine zum Cytochrom P450-Enzymkomplex gehören (CYP3A1, CYP11B1). Die Ergebnisse bestätigen die Funktionalität des Zellkulturmodells, da diese Enzyme maßgeblich am Abbau von Schadstoffen (vor allem PCBs) beteiligt sind. Des Weiteren konnte ein Protein detektiert werden, dessen MS-Daten Hinweise auf ein Hitzeschockprotein lieferten. Hitzeschockproteine werden vermehrt bei Hitze Einfluss oder chemischen Stress gebildet. In weiterführenden Studien soll die Sequenzierung der Proteine erfolgen, da bisher nur sehr wenige Proteinsequenzen aus Seehunden bekannt sind und andernfalls keine eindeutige Identifizierung erfolgen kann.

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen vitale Hepatozyten aus Seehunden zu isolieren. Die Hepatozyten behielten ihre Vitalität während der dreitägigen Kultivierung bei, wie die Ergebnisse aus den Vitalitätstests demonstrieren. Die Hepatozyten zeigten sowohl allgemeine als auch spezifische Stoffwechsel-

aktivität und wiesen eine intakte Zellmembran auf. Die eingesetzten Schadstoffkonzentrationen führten nicht zu einem Verlust der Vitalität und können für weitere Untersuchungen mit dem Zellkulturmodell verwendet werden. Zugleich führen die verwendeten Schadstoffkonzentrationen zu einer Veränderung in der Proteinexpression. Mit den Daten aus weiterführenden Arbeiten (Behr, 2008a,b) konnte die Funktionalität des Zellkulturmodells bewiesen werden.

Um die Proteine als Biomarker einsetzen zu können, müssen sie zunächst vollständig sequenziert werden. Des Weiteren muss überprüft werden, ob die betreffenden Proteine im Blut lebender Seehunde nachgewiesen werden können. In der Arbeitsgruppe wurden bereits erste Studien zur Proteomanalyse von Seehundblut durchgeführt (Holdt, 2009)

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Zellkulturmodell ermöglicht erstmals Untersuchungen zum Fremdstoffmetabolismus von Seehund-Hepatozyten.

Allerdings muss bei der Beurteilung des Zellkulturmodells beachtet werden, dass für die Untersuchungen nur eine begrenzte Anzahl an Tieren zur Verfügung steht (ca. 10 Tiere pro Jahr). Bei den Tieren handelt es sich ausschließlich um erkrankte Tiere. Da die Tiere meist von diversen Krankheiten gleichzeitig betroffen sind und aufgrund des geringen Stichprobenumfangs, können selten zwei Tiere mit demselben Krankheitsbild beprobt werden. Dies macht es schwierig den möglichen Einfluss von Krankheiten auf das Zellkulturmodell zu abzuschätzen. Des Weiteren können i. d. R. nur Jungtiere (< 1 Jahr) beprobt werden. Ältere Tiere werden meist tot aufgefunden und weisen dann eine mehr oder weniger weit fortgeschrittene Verwesung auf. Es ist nicht auszuschließen, dass die genannten Gegebenheiten (geringer Stichprobenumfang, Erkrankungen, lediglich eine Altersgruppe) einen Einfluss auf die Aussagen des Zellkulturmodells haben. Diese Gegebenheiten für die Seehunde aus dem Deutschen Wattenmeer, lassen sich nicht verändern. Lediglich eine gezielte Jagd könnte dazu führen, dass für die Untersuchungen gesunde Tiere zur Verfügung stehen und Daten aus verschiedenen Altersgruppen erhoben werden können.

Trotz der Einschränkungen kann mit diesem Modell erstmals der Fremdstoffmetabolismus bei Seehunden untersucht werden. Das Zellkulturmodell liefert einen wichtigen Beitrag zum Lebenmonitoring von Seehunden und damit zur Überwachung des Ökosystems Wattenmeer.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erfolgreich ein Zellkulturmodell entwickelt, auf dessen Grundlage die Identifizierung geeigneter Biomarker für ein Lebendmonitoring bei Seehunden erfolgen kann.

In der vorgestellten Dissertation wurden bei den Inkubationsexperimenten mit Seehund-Hepatozyten keine Kontrollzellen mitgeführt, die ohne Lösungsmittel oder Schadstoffe kultiviert wurden. Die Ergebnisse aus der Arbeit von Korff (2010) zeigen, dass die Kontrollzellen eine bessere Interpretation der Daten ermöglichen. In einigen Fällen konnte eine Abnahme der Vitalität sowohl in inkubierten Zellen als auch in den Kontrollzellen festgestellt werden, was zu der Annahme führte, dass die Verminderung der Vitalität nicht durch die Schadstoffe bedingt war. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll in weiterführenden Studien immer Kontrollzellen einzusetzen.

Um eine noch umfassendere Charakterisierung der primären Hepatozyten zu erreichen, wäre die Anwendung weiterer Vitalitätstests notwendig. Von Interesse wäre die Etablierung geeigneter Zelltests, die eine Untersuchung der Hepatozyten hinsichtlich ihres Fremdstoffmetabolismus ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, Tests wie EROD und PROD zu etablieren, die die Aktivität verschiedener Cytochrom P450 Enzyme anzeigen. Diese Enzyme sind im Organismus maßgeblich am Abbau verschiedener Schadstoffe beteiligt (wie z. B. PCB). Eine Etablierung der Zelltests gelang in der vorliegenden Arbeit nicht. Jedoch sollten Zelltests dieser Art in weiterführenden Studien berücksichtigt werden. Mit Hilfe dieser Tests ließen sich möglicherweise die beobachteten individuellen Unterschiede in der Reaktion auf einen Schadstoffeinfluss besser beurteilen.

Um die Aussagekraft des Zellkulturmodelles weiter erhöhen zu können, wäre es wünschenswert gesunde Tiere aus verschiedenen Altersgruppen zu beproben. Dies wäre z. B. in Ländern wie Alaska möglich, wo die indigene Bevölkerung zur Sicherung ihres Lebensunterhaltes und Bewahrung ihrer ursprünglichen Lebensweise, pro Jahr eine begrenzte Anzahl von Tieren erlegen darf.

Da Seehunde mit einer Vielzahl von Schadstoffen belastet sind, wäre es sinnvoll die Untersuchungen auf weitere Schadstoffklassen auszudehnen. Einige Schadstoffe wie z. B. Polybromierte Diphenylether (PBDE) oder Nanopartikel rücken vermehrt ins

Interesse der Wissenschaft, da ihre Auswirkungen auf Organismen noch nicht vollständig abgeschätzt werden können. Aus diesem Grund wäre es interessant die Auswirkungen mit Hilfe geeigneter Biomarker zu untersuchen.

Des Weiteren wäre zu überlegen, ob eine Immortalisierung der primären Hepatozyten sinnvoll wäre. Dies könnte beispielsweise durch die Transfektion mit dem katalytisch aktiven Teil der Telomerase h-TERT (engl. = *human Telomerase Reverse Transcriptase*) erreicht werden. Bei den auf diese Weise transfizierten Zellen, bleiben die *in vivo* Eigenschaften besser erhalten als bei der herkömmlichen Transfektion mit viraler Fremd-DNA. Trotz allem würden diese Zellen den *in vivo* Zustand nicht so zufrieden stellend widerspiegeln wie primäre Hepatozyten und könnte diese nicht ersetzen. Sie ließen sich aber dennoch z. B. für Vorversuche (Etablierung zusätzlicher Vitalitätstests, Abschätzung toxischer Schadstoffkonzentrationen) verwenden und würden die *in vivo* Reaktion möglicherweise besser wiedergeben als beispielsweise primäre Schweine-Hepatozyten. Da das Probenmaterial aus Seehunden begrenzt ist und nicht immer zur Verfügung steht, könnten mit Hilfe der Zelllinie Vorversuche in größerem Umfang durchgeführt werden.

Ziel der Arbeitsgruppe ist es, mit Hilfe des Zellkulturmodells Biomarker zu identifizieren, die spezifisch den Einfluss bestimmter Schadstoffe anzeigen. Die Biomarker sollen in einem Effektmonitoring an Blutproben aus wildlebenden Seehunden zum Einsatz kommen. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass sich die in den *in vitro* Versuchen identifizierten Biomarker im Blut nachweisen lassen. In der Arbeitsgruppe wurden bereits Methoden etabliert, mit deren Hilfe Proteomanalysen an Seehundblut durchgeführt wurden. Weitere Arbeiten, auf diesem Gebiet sind erforderlich und in Planung.

Zusätzlich zu den Proteomanalysen werden Untersuchungen auf genetischer Ebene durchgeführt. Mit Hilfe der mRNA Expression sollen schadstoffinduzierte Veränderungen in der Genexpression detektiert werden, um so weitere Informationen zu den Auswirkungen eines Schadstoffeinflusses zu erlangen.

7 Literaturverzeichnis

- Abdennebi, H. B., Steghens, J.-P., Hadj-Aissa, A., Barbieux, A., Ramella-Virieux, S., Gharib, C. and Boillot, O. (2002) A preservation solution with polyethylene glycol and calcium: a possible multiorgan liquid. *Transplantation International* **15**, 348-354.
- Abt, K. F., Reijnders, P. J. H., Brasseur, S. M. J. M., Siebert, U., Stede, M. and Tougaard, S. (2002) Common Seals in the Wadden Sea in 2002. *Waddensea Newsletter* **27**.
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B. B. (1979) Controlled synthesis of HBSAG in a differentiated human-liver carcinoma-derived cell-line. *Nature* **282**, 615-616.
- Aguilar, A. and Borrell, A. (1994) Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Science of The Total Environment* **154**, 237-247.
- Ahrens, L., Siebert, U. and Ebinghaus, R. (2009a) Total body burden and tissue distribution of polyfluorinated compounds in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German Bight. *Mar. Pollut. Bull.* **58**, 520-525.
- Ahrens, L., Siebert, U. and Ebinghaus, R. (2009b) Temporal trends of polyfluoroalkyl compounds in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German Bight, 1999-2008. *Chemosphere* **76**, 151-158.
- Ahrens, L., Xie, Z. Y. and Ebinghaus, R. (2010) Distribution of perfluoroalkyl compounds in seawater from Northern Europe, Atlantic Ocean, and Southern Ocean. *Chemosphere* **78**, 1011-1016.
- Aly, H. A. A. and Domenech, O. (2009) Aroclor 1254 induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in isolated rat hepatocytes. *Toxicology* **262**, 175-183.
- Amtsblatt Schleswig-Holstein (1997) Richtlinie zur Behandlung von erkrankt, geschwächt oder verlassen aufgefundenen Robben (Gl.-Nr.: 7921.2): <http://shvv.juris.de/shvv/vvsh-7921.2-0001.htm> [15.11.2010]
- Andersson, T. B., Sjöberg, H., Hoffmann, K. J., Boobis, A. R., Watts, P., Edwards, R. J., Lake, B. G., Price, R. J., Renwick, A. B., Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V., Ingelman-Sundberg, M., Hidestrand, M., Goldfarb, P. S., Lewis, D. F. V., Corcos, L., Guillouzo, A., Taavitsainen, P. and Pelkonen, O. (2001) An assessment of human liver-derived in vitro systems to predict the in vivo metabolism and clearance of alcohols. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 712-720.
- Angell, C. M., Wilson, J. Y., Moore, M. J. and Stegeman, J. J. (2004) Cytochrome p450 1A1 expression in cetacean integument: Implications for detecting contaminant exposure and effects. *Mar. Mamm. Sci.* **20**, 554-566.

- Assunção, M. G. L., Miller, K. A., Dangerfield, N. J., Bandiera, S. M. and Ross, P. S. (2007) Cytochrome P450 1A expression and organochlorine contaminants in harbour seals (*Phoca vitulina*): Evaluating a biopsy approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **145**, 256-264.
- Austin, M. E., Kasturi, B. S., Barber, M., Kannan, K., MohanKumar, P. S. and MohanKumar, S. M. J. (2003) Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1485-1489.
- Bakala, A., Karlik, W. and Wiechetek, M. (2003) Preparation of equine isolated hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **17**, 615-621.
- Bandiera, S., Safe, S. and Okey, A. B. (1982) Binding of polychlorinated-biphenyls classified as either Phenobarbitone-type, 3-Methylcholanthrene-type or mixed-type inducers to cytosolic AH-Receptor. *Chemico-Biological Interactions* **39**, 259-277.
- Battle, T. and Stacey, G. (2001) Cell culture models for hepatotoxicology. *Cell Biology and Toxicology* **17**, 287-299.
- Bayliss, M. and Somers, G. (2005) Isolation and culture of human hepatocytes. *Methods Mol Med* **107**, 249-267.
- Behnia, K., Bhatia, S., Jastromb, N., Balis, U., Sullivan, S., Yarmush, M. and Toner, M. (2000) Xenobiotic Metabolism by Cultured Primary Porcine Hepatocytes. *Tissue Engineering* **6**, 467-479.
- Behr, A. (2006) Praktikumsbericht über die Etablierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese zur Untersuchung der Proteinexpression in Zellkulturen aus dem Seehund. Studiengang Umwelttechnik HAW-Hamburg.
- Behr, A. (2008a) Massenspektrometrische Analyse und Vorversuche zum automatisierten In-Gel-Verdau von Proteinen aus Seehund-Hepatozyten, Master-Thesis, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg-Bergedorf.
- Behr, A., Wargel, A., Siebert, U. and Hellwig, V. (2008b) Analysis of polychlorinated biphenyl (PCB)-induced modification of protein expression in primary hepatocytes from harbour seals. *Organohalogen Compounds* **70**, 1079-1082.
- Beigel, J., Fella, K., Kramer, P.-J., Kroeger, M. and Hewitt, P. (2008) Genomics and proteomics analysis of cultured primary rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **22**, 171-181.
- Berry, M. N., Edwards, A. M. and Barritt, G. J. (1991) Isolated hepatocytes, preparation, properties and applications.; in *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Burdon, R. H. and van Knippenberg, P. H. (eds.), Elsevier, Amsterdam.
- Berry, M. N. and Friend, D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells- a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* **43**, 506-520.

- Berry, M. N., Grivell, M. B. and Phillips, J. W. (1997) Isolated hepatocytes- past present and future. *Cell Biology and Toxicology* **13**, 223-233.
- Berthiaume, J. and Wallace, K. B. (2002) Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol; peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis. *Toxicology Letters* **129**, 23-32.
- Bhandari, N., Figueroa, D. J., Lawrence, J. W. and Gerhold, D. L. (2008) Phospholipidosis assay in HepG2 cells and rat or rhesus hepatocytes using phospholipid probe NBD-PE. *Assay Drug Dev. Technol.* **6**, 407-419.
- Blaauboer, B. J. (2008) The contribution of in vitro toxicity data in hazard and risk assessment: Current limitations and future perspectives. *Toxicology Letters* **180**, 81-84.
- Borrell, A. and Aguilar, A. (2005) Mother-calf transfer of organochlorine compounds in the common dolphin (*Delphinus delphis*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **75**, 149-156.
- Bouma, M.-E., Rogier, E., Verthier, N., Labarre, C. and Feldmann, G. (1989) Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: Morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *Cellular and Developmental Biology* **25**, 267-275.
- Boxberger, H. J. (2007) Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken. *WILEY-VCH Verlag, Weinheim* **2. Auflage**.
- Braathen, M., Mortensen, A. S., Sandvik, M., Skare, J. U. and Arukwe, A. (2009) Estrogenic Effects of Selected Hydroxy Polychlorinated Biphenyl Congeners in Primary Culture of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Hepatocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 111-122.
- Bredhult, C., Backlin, B. M., Bignert, A. and Olovsson, M. (2008) Study of the relation between the incidence of uterine leiomyomas and the concentrations of PCB and DDT in Baltic gray seals. *Reprod. Toxicol.* **25**, 247-255.
- Brenez, C., Gerkens, P., Mazzucchelli, G., Jauniaux, T., Eppe, G., Pauw, E. D. and Pauw-Gillet, M.-C. D. (2004) A strategy to identify specific biomarkers related to the effects of a PCDD/F mixture on the immune system of marine mammals. *Talanta* **63**, 1225-1230.
- Brezner, E., Terkel, J. and Perry, A. S. (1984) The effect of Aroclor 1254 (PCB) on the physiology of reproduction in the female rat *Comp. Biochem. Physiol.* **77C**, 65-70.
- Butt, C. M., Berger, U., Bossi, R. and Tomy, G. T. (2010) Levels and trends of poly- and perfluorinated compounds in the arctic environment. *Science of The Total Environment* **408**, 2936–2965.
- Campbell, N. A. and Reece, J. B. (2003) *Biologie*. Markl, J. (ed.), 6. Auflage, Spektrum, Heidelberg, .

-
- Carvan, M. J., Flood, L. P., Campbell, B. D. and Busbee, D. L. (1995) Effects of benzo(a)pyrene and tetrachlorodibenzo(p) dioxin on fetal dolphin kidney cells: Inhibition of proliferation and initiation of DNA damage. *Chemosphere* **30**, 187-198.
- Carvan, M. J., Santostefano, M., Safe, S. and Busbee, D. (1994) Characterization of a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) kidney epithelial cell line *Mar. Mamm. Sci.* **10**, 52-69.
- Chen, T. L., Wise, S. S., Kraus, S., Shaffiey, F., Levine, K. M., Thompson, W. D., Romano, T., O'Hara, T. and Wise, J. P. (2009) Particulate Hexavalent Chromium is Cytotoxic and Genotoxic to the North Atlantic Right Whale (*Eubalaena glacialis*) Lung and Skin Fibroblasts. *Environ. Mol. Mutagen.* **50**, 387-393.
- Chimenti, R., Martino, G., Mazzulla, S. and Sesti, S. (2007) Effect of nitric oxide release from NOR-3 on urea synthesis, viability and oxygen consumption of rat hepatocyte cultures. *Physiol. Res.* **56**, 427-432.
- Christiansen, K. (2000) Charakterisierung und Einsatz von Hepatozyten-Kulturen als *in vitro*-Modell zur Untersuchung von Phase 2-Reaktionen des Benzamidoxims, Dissertation, Universität Kiel.
- Clement, B., Christiansen, K. and Girreser, U. (2001) Phase 2 Metabolites of N-Hydroxylated Amidines (Amidoximes): Synthesis, *in Vitro* Formation by Pig Hepatocytes, and Mutagenicity Testing. *Chemical Research in Toxicology* **14**, 319-326.
- Connell, B. J., Singh, A. and Chu, I. (1999) PCB congener 126-induced ultrastructural alterations in the rat liver: a stereological study. *Toxicology* **136**, 107-115.
- Corlu, A., Kneip, B., Lhadi, C., Leray, G., Glaise, D., Baffet, G., Bourel, D. and Guguenguillouzo, C. (1991) A plasma-membrane protein is involved in cell contact-mediated regulation of tissue-specific genes in adult hepatocytes. *J. Cell Biol.* **115**, 505-515.
- Cui, L., Zhou, Q.-f., Liao, C.-y., Fu, J.-j. and Jiang, G.-b. (2009) Studies on the Toxicological Effects of PFOA and PFOS on Rats Using Histological Observation and Chemical Analysis *Arch Environ Contam Toxicol* **56**, 338-349.
- CWSS (1990) Agreement on the Conservation of Seals in the Wadden Sea: <http://www.waddensea-secretariat.org/management/SMP/Seals-Agreement.pdf> [15.11.2010].
- CWSS (2003) Management of North Sea Harbour and Grey Seal Populations. *Proceedings of the International Symposium at EcoMare, Texel, The Netherlands, November 29 - 30, 2002. Wadden Sea Ecosystem No. 17. Common Wadden Sea Secretariat, Wilhelmshaven, Germany.*
- CWSS (2007) Seal Management Plan 2007-2010: <http://www.waddensea-secretariat.org/management/SMP/SMP%202007-2010.pdf> [15.11.2010].
- CWSS (2008) TMAP Handbuch: <http://www.waddensea-secretariat.org/TMAP/Handbook/index.htm> [15.11.2010].
-

- Dabos, K. J., Nelson, L. J., Hewage, C. H., Parkinson, J. A., Howie, A. F., Sadler, I. H., Hayes, P. C. and Plevris, J. N. (2004) Comparison of bioenergetic activity of primary porcine hepatocytes cultured in four different media. *Cell Transplant.* **13**, 213-229.
- Das, K., Siebert, U., Gillet, A., Dupont, A., Di-Poi, C., Fonfara, S., Mazzucchelli, G., De Pauw, E. and De Pauw-Gillet, M.-C. (2008) Mercury immune toxicity in harbour seals: links to in vitro toxicity. *Environmental Health* **7**, 52.
- De Guise, S., Martineau, D., Beland, P. and Fournier, M. (1998) Effects of *in vitro* exposure of beluga whale leukocytes to selected organochlorines. *J. Toxicol. Env. Health Pt A* **55**, 479-493.
- De Jong, G. D. C., Brasseur, S. M. J. M. and Reijnders, P. J. H. (1997) Harbour seal *Phoca vitulina vitulina*. In: Status of pinnipeds relevant to the European Union, Eds. P. J. H. Reijnders, G. Verriopoulos, S. M. J. M. Brasseur.
- De Swart, R. L., Ross, P. S., Vedder, L. J., Timmerman, H. H., Heisterkamp, S., van Loveren, H., Vos, J. G., Reijnders, P. J. H. and Osterhaus, A. (1994) Impairment of immune function in harbor seals (*Phoca vitulina*) feeding on fish from polluted waters. *Ambio* **23**, 155 - 159.
- Debier, C., Pomeroy, P. P., Dupont, C., Joiris, C., Comblin, V., Le Boulengé, E., Larondelle, Y. and Thomé, J. P. (2003) Quantitative dynamics of PCB transfer from mother to pup during lactation in UK grey seals *Halichoerus grypus*. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **247**, 237-248.
- Decker, T. and Lohmann-Matthes, M.-L. (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* **15**, 61-69.
- Dich, J., Vind, C. and Grunnet, N. (1988) Long-term culture of hepatocytes: Effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity. *Hepatology* **8**, 39-45.
- Dickens, H., Ullrich, A., Runge, D., Mueller, B., Olszewsk, U. and Hamilton, G. (2008) Anticancer drug cis-4-hydroxy-L-proline: Correlation of preclinical toxicology with clinical parameters of liver function. *Mol. Med. Rep.* **1**, 459-464.
- Dietz, R., Heide-Jørgensen, M. P. and Härkönen, T. (1989) Mass deaths of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Europe. *Ambio* **18**, 258 - 264.
- Donato, M. T., Castell, J. V. and Gómez-Lechón, M. J. (1999) Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *Journal of Hepatology* **31**, 542-549.
- Dubois, M., PfohlLeszkowicz, A., Grosse, Y. and Kremers, P. (1995) DNA adducts and P450 induction in human, rat and avian liver cells after exposure to polychlorobiphenyls. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol.* **345**, 181-190.
- Fang, X. M., Zhang, L. J., Feng, Y. X., Zhao, Y. and Dai, J. Y. (2008) Immunotoxic effects of perfluorononanoic acid on BALB/c mice. *Toxicol. Sci.* **105**, 312-321.

- Farkas, D., Bhat, V. B., Mandapati, S., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (2005) Characterization of the secreted proteome of rat hepatocytes cultured in collagen sandwiches. *Chemical Research in Toxicology* **18**, 1132-1139.
- Fent, K. (2007) Ökotoxikologie. Thieme, Stuttgart, 3. Edition.
- Fisk, A. T., Hobson, K. A. and Norstrom, R. J. (2001) Influence of Chemical and Biological Factors on Trophic Transfer of Persistent Organic Pollutants in the Northwater Polynya Marine Food Web. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 732-738.
- Fossi, M. C., Casini, S., Bucalossi, D. and Marsili, L. (2008) First detection of CYP1A1 and CYP2B induction in Mediterranean cetacean skin biopsies and cultured fibroblasts by Western blot analysis. *Marine Environmental Research* **66**, 3-6.
- Fossi, M. C., Marsili, L., Casini, S. and Bucalossi, D. (2006) Development of new-tools to investigate toxicological hazard due to endocrine disruptor organochlorines and emerging contaminants in Mediterranean cetaceans. *Marine Environmental Research* **62**, 200-204.
- Fountoulakis, M., de Vera, M. C., Cramer, F., Boess, F., Gasser, R., Albertini, S. and Suter, L. (2002) Modulation of gene and protein expression by carbon tetrachloride in the rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **183**, 71-80.
- Franco-Gou, R., Ben Mosbah, I., Serafin, A., Ben Abdennebi, H., Rosello-Catafau, J. and Peralta, C. (2007) New preservation strategies for preventing liver grafts against cold ischemia reperfusion injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 1120-1126.
- Freshney, R. I. (2005) Culture of Animal Cells. *John Wiley & Sons 5th Edition*.
- Fröhlich, A. K. (2004) Studium neuer Phase II-Reaktionen von ausgewählten Arzneistoffen mithilfe von Hepatozytenkulturen und UDP-Glucuronyltransferasen, Dissertation, Universität Kiel.
- Fröhlich, A. K., Girreser, U. and Clement, B. (2005) Metabolism of N-Hydroxyguanidines (N-Hydroxydebrisoquine) in Human and Porcine Hepatocytes: Reduction and Formation of Glucuronides *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1532–1537.
- Frouin, H., Lebeuf, M., Hammill, M., Masson, S. and Fournier, M. (2010) Effects of individual polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners on harbour seal immune cells in vitro. *Mar. Pollut. Bull.* **60**, 291-298.
- Garrick, R. A., Woodin, B. R., Wilson, J. Y., Middlebrooks, B. L. and Stegeman, J. J. (2006) Cytochrome P4501A is induced in endothelial cell lines from the kidney and lung of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Aquatic Toxicology* **76**, 295-305.
- Gauthier, J. M., Dubeau, H., Rassart, E., Jarman, W. M. and Wells, R. S. (1999) Biomarkers of DNA damage in marine mammals. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **444**, 427-439.

- Gerbal-Chaloin, S., Pichard-Garcia, L., Fabre, J. M., Sa-Cunha, A., Poellinger, L., Maurel, P. and Daujat-Chavanieu, M. (2006) Role of CYP3A4 in the regulation of the aryl hydrocarbon receptor by omeprazole sulphide *Cellular Signalling* **18**, 740-750.
- Gibson, G. G., Plant, N. J., Swales, K. E., Ayrton, A. and El-Sankary, W. (2002) Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica* **32**, 165-206.
- Giesy, J. P. and Kannan, K. (2001) Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 1339-1342.
- Gilroy, C., Connell, B. J., Singh, A., Suidgeest, P. and Chu, I. (1998) PCB congener 77-induced ultrastructural alterations in the rat liver: a quantitative study. *Toxicology* **127**, 179-185.
- Godard, C. A. J., Wise, S. S., Kelly, R. S., Goodale, B., Kraus, S., Romano, T., O'Hara, T. and Wise, S. J. P. (2006) Benzo[a]pyrene cytotoxicity in right whale (*Eubalaena glacialis*) skin, testis and lung cell lines. *Marine Environmental Research* **62**, S20-S24.
- Gómez-Lechón, M., López, P., Donato, M. T., Montoya, A., Larrauri, A., Giménez, P., Trullenque, R., Fabra, R. and Castell, J. V. (1990) Culture of human hepatocytes from small surgical liver biopsies. Biochemical characterization and comparison with *in vivo*. *In Vitro Cell Development and Biology* **26**, 67-74.
- Gómez-Lechón, M. J., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, M. T., Jover, R. and Castell, J. V. (2003) Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **17**, 675-680.
- Görg, A., Weiss, W. and Dunn, M. J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-3685.
- Graham, M. J. and Lake, B. G. (2008) Induction of drug metabolism: Species differences and toxicological relevance. *Toxicology* **254**, 184-191.
- Guguen-Guillouzo, C., Clement, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morelchany, E., Glaise, D. and Guillouzo, A. (1983) Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial-cell type. *Exp. Cell Res.* **143**, 47-54.
- Guillouzo, A., Morel, F., Fardel, O. and Meunier, B. (1993) Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology* **82**, 209-219.
- Guruge, K. S., Yamanaka, N., Hasegawa, J. and Miyazaki, S. (2009) Differential induction of cytochrome P450 1A1 and 1B1 mRNA in primary cultured bovine hepatocytes treated with TCDD, PBDD/Fs and feed ingredients. *Toxicology Letters* **185**, 193-196.
- Hall, A. J., Thomas, G. O. and McConnell, B. J. (2009) Exposure to Persistent Organic Pollutants and First-Year Survival Probability in Gray Seal Pups. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 6364-6369.

- Hamel, F., Grondin, M., Denizeau, F., Averill-Bates, D. A. and Sarhan, F. (2006) Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes. *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 661-670.
- Hammond, J. A., Hall, A. J. and Dyrinda, E. A. (2005) Comparison of polychlorinated biphenyl (PCB) induced effects on innate immune functions in harbour and grey seals. *Aquatic Toxicology* **74**, 126-138.
- Harvell, C. D., Kim, K., Burkholder, J. M., Colwell, R. R., Epstein, P. R., Grimes, D. J., Hofmann, E. E., Lipp, E. K., Osterhaus, A., Overstreet, R. M., Porter, J. W., Smith, G. W. and Vasta, G. R. (1999) Review: Marine ecology - Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. *Science* **285**, 1505-1510.
- Hasselmeier, I., Fonfara, S., Driver, J. and Siebert, U. (2008) Differential Hematology Profiles of Free-Ranging, Rehabilitated, and Captive Harbor Seals (*Phoca vitulina*) of the German North Sea. *Aquatic Mammals* **34**, 149-156.
- Hatfield, T. (2001a) Hydrolysis Reactions of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS). *3M Environmental Laboratory*
- Hatfield, T. (2001b) Screening studies on the aqueous photolytic degradation of potassium perfluorooctane sulfonate (PFOS). *3M Environmental Laboratory*.
- Helle, E., Olsson, M. and Jenssen, S. (1976) PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri. *Ambio* **5**, 261-263.
- Hewitt, N. J., Lechón, M. J. G., Houston, J. B., Hallifax, D., Brown, H. S., Maurel, P., Kenna, J. G., Gustavsson, L., Lohmann, C., Skonberg, C., Guillouzo, A., Tuschl, G., Li, A. P., LeCluyse, E., Groothuis, G. M. M. and Hengstler, J. G. (2006) Primary hepatocytes: Current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies; in *1st Medicon Valley Hepatocyte User Form Symposium*, pp. 159-234, Taylor & Francis Inc, Copenhagen, Denmark.
- Higuchi, A., Satoh, M., Kobayashi, K., Cho, C. S., Akaike, T., Tak, T. M., Egashira, S., Matsuoka, Y. and Natori, S. H. (2006) Albumin and urea production by hepatocytes cultured on polyurethane foaming membranes coated with extracellular matrix. *Journal of Membrane Science* **280**, 983-989.
- Holdt, Y. (2009) Proteomanalysen aus Plasmaproben frei lebender Seehund-Jungtiere (*Phoca vitulina*) durch 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS, Diplomarbeit, Fachhochschule Lübeck.
- Horn, D. B. and Squire, C. R. (1967) An improved method for estimation of ammonia in blood plasma. *Clin. Chim. Acta* **17**, 99-105.
- Hoskins, J. M., Meynell, G. G. and Sanders, F. K. (1956) A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells. *Exp. Cell Res.* **11**, 297-305.

- Houde, M., Bujas, T. A. D., Small, J., Wells, R. S., Fair, P. A., Bossart, G. D., Solomon, K. R. and Muir, D. C. G. (2006) Biomagnification of Perfluoroalkyl Compounds in the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Food Web. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4138-4144.
- Howard, R. B., Christen.Ak, Gibbs, F. A. and Pesch, L. A. (1967) Enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J. Cell Biol.* **35**, 675-684.
- Hsu, Y.-L., Kuo, P.-L. and Lin, C.-C. (2004) Acacetin inhibits the proliferation of HepG2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochemical Pharmacology* **67**, 823-829.
- Hu, W. Y., Jones, P. D., Upham, B. L., Trosko, J. E., Lau, C. and Giesy, J. P. (2002) Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated compounds in rat liver and dolphin kidney epithelial cell lines *in vitro* and sprague-dawley rats *in vivo*. *Toxicol. Sci.* **68**, 429-436.
- Hu, X. Z. and Hu, D. C. (2009) Effects of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate exposure on hepatoma Hep G2 cells. *Arch. Toxicol.* **83**, 851-861.
- Ingelman-Sundberg, M. (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics Journal* **5**, 6-13.
- Integra Biosciences (2003) Tips and Tricks for cell cultivation: http://www.integrabiosciences.com/pdf/cell_culture/labstories_8.pdf [15.11.2010]
- Invitrogen (2001) OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/2017.pdf> [15.11.2010].
- Ishibashi, H., Iwata, H., Kim, E. Y., Tao, L., Kannan, K., Tanabe, S., Batoev, V. B. and Petrov, E. A. (2008) Contamination and effects of perfluorochemicals in Baikal Seal (*Pusa sibirica*). 2. Molecular characterization, expression level, and transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 2302-2308.
- Jasmund, I., Schwientek, S., Acikgöz, A., Langsch, A., Machens, H. G. and Bader, A. (2007) The influence of medium composition and matrix on long-term cultivation of primary porcine and human hepatocytes. *Biomolecular Engineering* **24**, 59-69.
- Jauregui, H. O., McMillan, P. N., Driscoll, J. and Naik, S. (1986) Attachment and long term survival of adult rat hepatocytes in primary monolayer cultures: comparison of different substrata and tissue culture media formulations. *In Vitro Cell Development and Biology* **22**, 13-22.
- Jepson, P. D., Bennett, P. M., Allchin, C. R., Law, R. J., Kuiken, T., Baker, J. R., Rogan, E. and Kirkwood, J. K. (1999) Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Science of the Total Environment* **244**, 339-348.

- Jepson, P. D., Bennett, P. M., Deaville, R., Allchin, C. R., Baker, J. R. and Law, R. J. (2005) Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 238-248.
- Jones, P. D., Hu, W. Y., De Coen, W., Newsted, J. L. and Giesy, J. P. (2003) Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 2639-2649.
- Jones, S. A., Moore, L. B., Shenk, J. L., Wisely, G. B., Hamilton, G. A., McKee, D. D., Tomkinson, N. C. O., LeCluyse, E. L., Lambert, M. H., Willson, T. M., Kliever, S. A. and Moore, J. T. (2000) The pregnane x receptor: A promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Molecular Endocrinology* **14**, 27-39.
- Jover, R., Ponsoda, X., Castell, J. V. and Gómez-Lechón, M. J. (1992) Evaluation of the cytotoxicity of ten chemicals on human cultured hepatocytes: Predictability of human toxicity and comparison with rodent cell culture systems. *Toxicology in Vitro* **6**, 47-52.
- Kakuschke, A., Valentine-Thon, E., Griesel, S., Fonfara, S., Siebert, U. and Prange, A. (2005) Immunological impact of metals in harbor seals (*Phoca vitulina*) of the North Sea. *Env Sci Technol* **39**, 7568 - 7575.
- Kaltenbach, J. P. (1954) The preparation and utilization of whole cell suspensions obtained from solid mammalian tissues. *Exp. Cell Res.* **7**, 568-571.
- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Oehme, G., Focardi, S. and Giesy, J. P. (2002) Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 3210-3216.
- Kannan, K., Koistinen, J., Beckmen, K., Evans, T., Gorzelany, J. F., Hansen, K. J., Jones, P. D., Helle, E., Nyman, M. and Giesy, J. P. (2001) Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 1593-1598.
- Kannan, K., Perrotta, E. and Thomas, N. J. (2006) Association between perfluorinated compounds and pathological conditions in southern sea otters. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4943-4948.
- Kannan, K., Tanabe, S., Borrell, A., Aguilar, A., Focardi, S. and Tatsukawa, R. (1993) Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated-biphenyls in striped dolphins affected by an epizootic in the western Mediterranean-Sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **25**, 227-233.
- Katsura, N., Ikai, I., Mitaka, T., Shiotani, T., Yamanokuchi, S., Sugimoto, S., Kanazawa, A., Terajima, H., Mochizuki, Y. and Yamaoka, Y. (2002) Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions. *J. Surg. Res.* **106**, 115-123.
- Katynski, A. L., Vijayan, M. M., Kennedy, S. W. and Moon, T. W. (2004) 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126) impacts hepatic lipid peroxidation, membrane fluidity and beta-adrenoceptor kinetics in chick embryos. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* **137**, 81-93.

- Keil, D. E., Mehlmann, T., Butterworth, L. and Peden-Adams, M. M. (2008) Gestational exposure to perfluorooctane sulfonate suppresses immune function in B6C3F1 mice. *Toxicol. Sci.* **103**, 77-85.
- Kelly, B. C., Ikonomidou, M. G., Blair, J. D., Surridge, B., Hoover, D., Grace, R. and Gobas, F. (2009) Perfluoroalkyl Contaminants in an Arctic Marine Food Web: Trophic Magnification and Wildlife Exposure. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 4037-4043.
- Kemp, D. C. and Brouwer, K. L. R. (2004) Viability assessment in sandwich-cultured rat hepatocytes after xenobiotic exposure. *Toxicology in Vitro* **18**, 869-877.
- Key, B. D., Howell, D. J. and Criddle, C. S. (1998) Defluorination of Organofluorine Sulfur Compounds by *Pseudomonas Sp.* Strain D2. *Env Sci Technol* **32**, 2283-2287.
- Kim, B., Ejaz, S., Chekarova, I., Sukura, A., Ashraf, M. and Lim, C. W. (2008) Cytotoxicity of Fumonisin B1 in Spheroid and Monolayer Cultures of Rat Hepatocytes. *Drug and Chemical Toxicology* **31**, 339-352.
- King, J. E. (1983) Seals of the world. *British Museum and Oxford University Press, London, Oxford.*
- Knowles, B. B., Howe, C. C. and Aden, D. P. (1980) Human hepatoblastoma cell line secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**, 497-499.
- Koebe, H. G., Mühlhling, B., Deglmann, C. J. and Schildberg, F. W. (1999) Cryopreserved porcine hepatocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* **121**, 99-115.
- Koebe, H. G., Pahernik, S., Sproede, M., Thasler, W. and Schildberg, F. W. (1995) Porcine hepatocytes from slaughterhouse organs: An unlimited resource for bioartificial liver devices. *Journal of the American Society for Artificial Internal Organs* **41**, 189-193.
- Koebe, H. G., Pahernik, S. A. and Schildberg, F. W. (2000) Isolation and culture of porcine hepatocytes; in *The Hepatocyte Review*, Berry, M. N. and Edwards, A. M. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Korff, V. K. (2010) Assessment of Cell Viability and Specific Metabolism in Primary Seal Hepatocytes (*Phoca vitulina*) after *in vitro* Exposure to PFOS and PCBs. Diplomarbeit, Leuphana Universität Lüneburg.
- Kremers, P., Roelandt, L., Todaro, A., Stouvenakers, N., Louvet, M., Goffinet, G. and Thome, J. P. (1992) Use of cultured-hepatocytes as an alternative method to study the effects of PCBs on living organisms; in *7th International Workshop on in Vivo Toxicology (Invitox 92)*, pp. 433-&, Pergamon-Elsevier Science Ltd, Domaine De Seillac, France.
- Kudo, N. and Kawashima, Y. (2003) Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals. *Journal of Toxicological Sciences* **28**, 49-57.

-
- Kurenbach, M. (2008) Praktikumsbericht zur Optimierung einer Methode der Proteinextraktion aus Zellen der humanen Zelllinie HepG2 vor dem Hintergrund der Übertragung der erzielten Ergebnisse auf die Proteinextraktion aus Seehundhepatozyten (*Phoca vitulina*). *Praktikumsbericht, Leuphana Universität Lüneburg*.
- Lalancette, A., Morin, Y., Measures, L. and Fournier, M. (2003) Contrasting changes of sensitivity by lymphocytes and neutrophils to mercury in developing grey seals. *Developmental & Comparative Immunology* **27**, 735-747.
- Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (1995) Stoffbericht Polychlorierte Biphenyle (PCB): <http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/10060/?COMMAND=DisplayBericht&FIS=161&OBJECT=10060&MODE=METADATA> [15.11.2010]
- Last, L. (2008) Entwicklung einer Methode der Probenvorbereitung zur vergleichenden Proteomanalyse von Plasmaproben und Zellkulturüberständen aus dem Seehund (*Phoca vitulina*), Bachelor-Thesis, Leuphana Universität Lüneburg.
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A. and Seed, J. (2007) Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* **99**, 366-394.
- Lau, Y. Y., Sapidou, E., Cui, X. M., White, R. E. and Cheng, K. C. (2002) Development of a novel *in vitro* model to predict hepatic clearance using fresh, cryopreserved, and sandwich-cultured hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 1446-1454.
- LeCluyse, E. L. (2001) Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* **134**, 283-289.
- Leonel, J., Kannan, K., Tao, L., Fillmann, G. and Montone, R. C. (2008) A baseline study of perfluorochemicals in Franciscana dolphin and Subantarctic fur seal from coastal waters of Southern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* **56**, 778-781.
- Letcher, R. J., Bustnes, J. O., Dietz, R., Jenssen, B. M., Jørgensen, E. H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M. M. and Gabrielsen, G. W. (2010) Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Science of the Total Environment* **408**, 2995–3043.
- Letcher, R. J., Lemmen, J. G., van der Burg, B., Brouwer, A., Bergman, A., Giesy, J. P. and van den Berg, M. (2002) *In vitro* antiestrogenic effects of aryl methyl sulfone metabolites of polychlorinated biphenyls and 2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene on 17 beta-estradiol-induced gene expression in several bioassay systems. *Toxicol. Sci.* **69**, 362-372.
- Li, A. P. (1998) Primary Hepatocyte Cultures as an *In Vitro* Experimental Model for Xenobiotic Metabolism and Toxicology. *Toxicol. Sci.* **6**, 199-220.
- Liebich, H. G. (1990) Funktionelle Histologie. Schattauer, Stuttgart.
-

- Lindl, T. and Gstrunthaler, G. (2008) Zell- und Gewebekultur. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg* **6. Auflage**.
- Liu, C., Yu, K., Shi, X., Wang, J., Lam, P. K. S., Wu, R. S. S. and Zhou, B. (2007) Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology* **82**, 135-143.
- Liu, H.-L., Wang, Y.-J., Guo, H.-T., Wang, Y.-M., Liu, J. and Yu, Y.-C. (2004) Cryopreservation and gel collagen culture of porcine hepatocytes. *World Journal of Gastroenterology* **10**, 1010-1014.
- López-Aparicio, P., Merino, M. J., Sánchez, E., Recio, M. N. and Pérez-Albarsanz, M. A. (1997) Effect of Aroclor 1248 and Two Pure PCB Congeners upon the Membrane Fluidity of Rat Renal Tubular Cell Cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **57**, 54-62.
- Lu, Y. N., Aguirre, A. A., Wang, Y., Zeng, L. B., Loh, P. C. and Yanagihara, R. (2003) Viral susceptibility of newly established cell lines from the Hawaiian monk seal *Monachus schauinslandi*. *Dis. Aquat. Org.* **57**, 183-191.
- Marsili, L., Fossi, M. C., Neri, G., Casini, S., Gardi, C., Palmeri, S., Tarquini, E. and Panigada, S. (2000) Skin biopsies for cell cultures from Mediterranean free-ranging cetaceans. *Marine Environmental Research* **50**, 523-526.
- Martin, J. W., Smithwick, M. M., Braune, B. M., Hoekstra, P. F., Muir, D. C. G. and Mabury, S. A. (2004) Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the Canadian Arctic. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 373-380.
- Martin, M. T., Brennan, R. J., Hu, W. Y., Ayanoglu, E., Lau, C., Ren, H. Z., Wood, C. R., Corton, J. C., Kavlock, R. J. and Dix, D. J. (2007) Toxicogenomic study of triazole fungicides and perfluoroalkyl acids in rat livers predicts toxicity and categorizes chemicals based on mechanisms of toxicity. *Toxicol. Sci.* **97**, 595-613.
- Martineau, D., Beland, P., Desjardins, C. and Lagace, A. (1987) Levels of organochlorine chemicals in tissues of Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **16**, 137-147.
- Martineau, D., Lemberger, K., Dallaire, A., Labelle, P., Lipscomb, T. P., Michel, P. and Mikaelian, I. (2002) Cancer in wildlife, a case study: Beluga from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. *Environ. Health Perspect.* **110**, 285-292.
- Maurel, P. (1996) The use of adult human hepatocytes in primary culture and other *in vitro* systems to investigate drug metabolism in man. *Advanced Drug Delivery Reviews* **22**, 105-132.
- Michalopoulos, G. and Pitot, H. C. (1975) Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Exp. Cell Res.* **94**, 70-78.
- Miller, K. A., Assunção, M. G. L., Dangerfield, N. J., Bandiera, S. M. and Ross, P. S. (2005) Assessment of cytochrome P450 1A in harbour seals (*Phoca vitulina*) using a minimally-invasive biopsy approach. *Marine Environmental Research* **60**, 153-169.

-
- Miranda, K. C., Metcalfe, T. L., Metcalfe, C. D., Robaldo, R. B., Muelbert, M. M. C., Colares, E. P., Martinez, P. E. and Bianchini, A. (2007) Residues of persistent organochlorine contaminants in Southern elephant seals (*Mirounga leonina*) from Elephant Island, Antarctica. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 3829-3835.
- Modest, D. P. (2009) Schutz vor hypothermer Schädigung in Kulturen von primären humanen Hepatozyten. *Dissertation, Charité Berlin*.
- Mollenhauer, M. A. M., Carter, B. J., Peden-Adams, M. M., Bossart, G. D. and Fair, P. A. (2009) Gene expression changes in bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, skin cells following exposure to methylmercury (MeHg) or perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquatic Toxicology* **91**, 10-18.
- Monsinjon, T. and Knigge, T. (2007) Proteomic applications in ecotoxicology. *Proteomics* **7**, 2997-3009.
- Montie, E. W., Fair, P. A., Bossart, G. D., Mitchum, G. B., Houde, M., Muir, D. C. G., Letcher, R. J., McFee, W. E., Starczak, V. R., Stegeman, J. J. and Hahn, M. E. (2008) Cytochrome P4501A1 expression, polychlorinated biphenyls and hydroxylated metabolites, and adipocyte size of bottlenose dolphins from the Southeast United States. *Aquatic Toxicology* **86**, 397-412.
- Mössner, S. and Ballschmiter, K. (1997) Marine mammals as global pollution indicators for organochlorines. *Chemosphere* **34**, 1285-1296.
- Muir, D. C. G., Ford, C. A., Rosenberg, B., Norstrom, R. J., Simon, M. and Beland, P. (1996) Persistent organochlorines in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence River estuary .1. Concentrations and patterns of specific PCBs, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Environmental Pollution* **93**, 219-234.
- Muir, D. C. G., Norstrom, R. J. and Simon, M. (1988) Organochlorine Contaminants in Arctic Marine Food-Chains - Accumulation of Specific Polychlorinated-Biphenyls and Chlordane-Related Compounds. *Environ. Sci. Technol.* **22**, 1071-1079.
- Müller-Esterl, W. (2004) Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler, Elsevier, 1. Auflage.
- Muto, T., Imano, N., Nakaaki, K., Takahashi, H., Hano, H., Wakui, S. and Furusato, M. (2003) Estrous cyclicity and ovarian follicles in female rats after prenatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Toxicology Letters* **143**, 271-277.
- Navas, J. M. and Segner, H. (2006) Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for *in vitro* screening of the (anti) estrogenic activity of chemical substances. *Aquatic Toxicology* **80**, 1-22.
- Nussler, A. K., Wang, A., Neuhaus, P., Fischer, J., Yuan, J., Liu, L. G., Zeilinger, K., Gerlach, J., Arnold, P. J. and Albrecht, W. (2001) The suitability of hepatocyte culture models to study various aspects of drug metabolism. *Altex Altern. Tierexp.* **18**, 91-101.
-

- Nyman, M., Bergknut, M., Fant, M. L., Raunio, H., Jestoi, M., Bengs, C., Murk, A., Koistinen, J., Bäckman, C., Pelkonen, O., Tysklind, M., Hirvi, T. and Helle, E. (2003) Contaminant exposure and effects in Baltic ringed and grey seals as assessed by biomarkers. *Marine Environmental Research* **55**, 73-99.
- O'Brien, P. J., Chan, K. and Silber, P. M. (2004) Human and animal hepatocytes *in vitro* with extrapolation *in vivo*. *Chemico-Biological Interactions* **150**, 97-114.
- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Olsson, M., Karlsson, B. and Ahnland, E. (1993) Diseases and environmental contaminants in seals from the Baltic and the Swedish west coast; in *International Symposium on Marine Pollution - Mammals and Toxic Contaminants/5th Annual International Symposium of the International-Marine-Biological-Research-Institute*, pp. 217-227, Elsevier Science Bv, Kamogawa, Japan.
- Pappenheimer, A. M. (1917) Experimental studies upon lymphocytes. I. The reaction of lymphocytes under various experimental conditions. *Journal of Experimental Medicine* **25**, 633-650.
- Pascussi, J. M., Drocourt, L., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J. M., Maurel, P. and Vilarem, M. J. (2001) Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes - Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor *European Journal of Biochemistry* **268**, 6346-6357.
- Peden-Adams, M. M., Keller, J. M., EuDaly, J. G., Berger, J., Gilkeson, G. S. and Keil, D. E. (2008) Suppression of humoral immunity in mice following exposure to perfluorooctane sulfonate. *Toxicol. Sci.* **104**, 144-154.
- Pesonen, M. and Andersson, T. B. (1997) Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. *Aquatic Toxicology* **37**, 253-267.
- Poland, A., Glover, E. and Kende, A. S. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol: evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **251**, 4936-4946.
- Ponsoda, X., Gómez-Lechón, M. and Castell, J. V. (1998) Toxicity and Cell Density Monitoring in Monolayer and Three-dimensional Cultures with the XTT Assay. *Alternatives to Laboratory Animals* **26**, 331-342.
- Ponsoda, X., Pareja, E., Gomez-Lechon, M. J., Fabra, R., Carrasco, E., Trullenque, R. and Castell, J. V. (2001) Drug biotransformation by human hepatocytes. *In vitro/in vivo* metabolism by cells from the same donor. *Journal of Hepatology* **34**, 19-25.
- Powley, C. R., George, S. W., Russell, M. H., Hoke, R. A. and Buck, R. C. (2008) Polyfluorinated chemicals in a spatially and temporally integrated food web in the Western Arctic. *Chemosphere* **70**, 664-672.

-
- Quabius, E. S., Nolan, D. T., Balm, P. H. M. and Bonga, S. E. W. (1998) The influence of polychlorinated biphenyl 126 on Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) liver. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* **120**, 57-63.
- Reese, J. A. and Byard, J. L. (1981) Isolation and culture of adult hepatocytes from liver biopsies. *In Vitro* **17**, 935-940.
- Reijnders, P., Randall, W., Aguilar, A., Donovan, G., Bjørge, A., O'Hara, T., Rowles, T. and Siebert, U. (2007) Report from POLLUTION 2000+:Phase I. *J. Cetacean. Res. Manage.* **9 (Suppl.)**, 261-274.
- Reijnders, P. J. H. (1986) Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* **324**, 456 - 457.
- Reijnders, P. J. H. (2003b) Reproductive and developmental effects of environmental organochlorines on marine mammals; in *Toxicology of Marine Mammals*, pp. 55-66, Taylor & Francis Ltd, London.
- Reijnders, P. J. H., Abt, K. F., Brasseur, S. M. J. M., Camphuysen, K. C. J., Reineking, B., Scheidat, M., Siebert, U., Stede, M., Tougaard, J. and Tougaard, S. (2005) Marine Mammals; in *Wadden Sea Quality Status Report 2004*, pp. 305-318, CWSS Common Wadden Sea Secretariat.
- Reijnders, P. J. H., Abt, K. F., Brasseur, S. M. J. M., Tougaard, S., Siebert, U. and Vareschi, E. (2003a) Sense and sensibility in evaluating aerial counts of harbour seals in the Wadden Sea. *Wadden Sea Newsletter* **28**, 9-12.
- Reijnders, P. J. H., Ries, E. H., Tougaard, S., Nørgaard, N., Heidemann, G., Schwarz, J., Vareschi, E. and Traut, I. M. (1997) Population development of harbour seals *Phoca vitulina* in the Wadden Sea after the 1988 virus epizootic. *Journal of Sea Research* **38**, 161-168.
- Richert, L., Alexandre, E., Lloyd, T., Orr, S., Viollon-Abadie, C., Patel, R., Kingston, S., Berry, D., Dennison, A., Heyd, B., Manton, G. and Jaek, D. (2004) Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver International* **24**, 371-378.
- Roche (2006) Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH): <https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCProductDisplay?storeId=10201&catalogId=10201&langId=-3&countryId=de&forCountryId=de&productId=3.5.3.27.1.14> [15.11.2010].
- Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M. and Glasebrook, A. L. (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods* **142**, 257-265.
- Roelandt, L., Todaro, A., Thomé, J. P. and Kremers, P. (1995) Effects of PCBs (Aroclor 1254) on cytochrome-P450 expression and monooxygenase activities in cultured fetal-rat hepatocytes. *Toxicology* **98**, 95-103.
- Ross, P., De Swart, R., Addison, R., Van Loveren, H., Vos, J. and Osterhaus, A. (1996b) Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: Wildlife at risk? *Toxicology* **112**, 157-169.
-

- Ross, P. S. (2002) The Role of Immunotoxic Environmental Contaminants in Facilitating the Emergence of Infectious Diseases in Marine Mammals. *Human and Ecology Risk Assessment* **8**, 277-292.
- Ross, P. S., DeSwart, R. L., Timmerman, H. H., Reijnders, P. J. H., Vos, J. G., VanLoveren, H. and Osterhaus, A. (1996a) Suppression of natural killer cell activity in harbour seals (*Phoca vitulina*) fed Baltic Sea herring. *Aquatic Toxicology* **34**, 71-84.
- Ross, P. S., DeSwart, R. L., vanderVliet, H., Willemsen, L., deKlerk, A., vanAmerongen, G., Groen, J., Brouwer, A., Schipholt, I., Morse, D. C., vanLoveren, H., Osterhaus, A. and Vos, J. G. (1997) Impaired cellular immune response in rats exposed perinatally to Baltic Sea herring oil or 2,3,7,8-TCDD. *Arch. Toxicol.* **71**, 563-574.
- Ross, P. S., Vos, J. G., Birnbaum, L. S. and M. E. Osterhaus, A. D. (2000) PCBs Are a Health Risk for Humans and Wildlife. *Science* **289**, 1878d-1879.
- Safe, S. (2001) Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicology Letters* **120**, 1-7.
- Sager, D. B. and Girard, D. (1993) Long-Term Effects on Reproductive Parameters in Female Rats after Translactational Exposure to PCBs. *Environmental Research* **66**.
- Sánchez-Alonso, J. A., López-Aparicio, P., Recio, M. N. and Pérez-Albarsanz, M. A. (2004) Polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) induce apoptosis via Bcl-2, Bax and caspase-3 proteins in neuronal cell cultures. *Toxicology Letters* **153**, 311-326.
- Sanderson, J. T., Kennedy, S. W. and Giesy, J. P. (1998) In vitro induction of ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrins by halogenated aromatic hydrocarbons in avian primary hepatocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 2006-2018.
- Schmitz, S. (2009) Der Experimentator Zellkultur. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg* **2. Auflage**.
- Schröder, H. F. and Meesters, R. J. W. (2005) Stability of fluorinated surfactants in advanced oxidation processes: A follow up of degradation products using flow injection-mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple stage mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1082**, 110-119.
- Schultz, M. M., Higgins, C. P., Huset, C. A., Luthy, R. G., Barrofsky, D. F. and Field, J. A. (2006) Fluorochemical Mass Flows in a Municipal Wastewater Treatment Facility. *Env Sci Technol* **40**, 7350-7357.
- Schulze-Bergkamen, H., Untergasser, A., Dax, A., Vogel, H., Buchler, P., Klar, E., Lehnert, T., Friess, H., Buchler, M. W., Kirschfink, M., Stremmel, W., Krammer, P. H., Muller, M. and Protzer, U. (2003) Primary human hepatocytes - a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* **38**, 736-744.

-
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. (1988) Evaluation of a soluble Tetrazolium Formazan Assay for cell-growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor-cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827-4833.
- Seglen, P. O. (1972) Preparation of rat-liver cells 1. Effect of Ca^{2+} on Enzymatic Dispersion of Isolated, Perfused Liver. *Exp. Cell Res.* **74**, 450-454.
- Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in Cell Biology* **13**, 29-83.
- Seiler, P., Fischer, B., Lindenau, A. and Beier, H. M. (1994) Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on fertility and embryonic development in the rabbit *Human Reproduction* **9**, 1920-1926.
- Serralta, A., Donato, M. T., Orbis, F., Castell, J. V., Mir, J. and Gomez-Lechon, M. J. (2003) Functionality of cultured human hepatocytes from elective samples, cadaveric grafts and hepatectomies. *Toxicology in Vitro* **17**, 769-774.
- Shaw, S., Berger, M. L., Brenner, D., Tao, L., Wu, Q. and Kannan, K. (2009) Specific accumulation of perfluorochemicals in harbor seals (*Phoca vitulina concolor*) from the northwest Atlantic. *Chemosphere* **74**, 1037-1043
- Siebert, U. (2003) Monitoring the Health Status of Harbour Seals: Pathological Investigations before and during the PDV-virus Outbreak; in *Management of North Sea Harbour and Grey Seal Populations. Proceedings of the International Symposium at EcoMare, Texel, The Netherlands, November 29-30, 2002*, Secretariat, C. C. W. S. (ed.) Vol. 17, CWSS Common Wadden Sea Secretariat, Wilhelmshaven, Germany.
- Siebert, U., Wohlsein, P., Lehnert, K. and Baumgärtner, W. (2007) Pathological findings in harbour seals (*Phoca vitulina*): 1996-2005. *J. Comp. Pathol.* **137**, 47-58.
- Silkworth, J. B., Koganti, A., Illouz, K., Possolo, A., Zhao, M. and Hamilton, S. B. (2005) Comparison of TCDD and PCB CYP1A Induction Sensitivities in Fresh Hepatocytes from Human Donors, Sprague-Dawley Rats, and Rhesus Monkeys and HepG2 Cells. *Toxicol. Sci.* **87**, 508-519.
- Sjögren, E., Bredberg, U., Allard, E., Arvidsson, B., Bergquist, J., Andersson, T. B. and Lennernas, H. (2010) Hepatic Disposition of Ximelagatran and Its Metabolites in Pig; Prediction of the Impact of Membrane Transporters Through a Simple Disposition Model. *Pharm. Res.* **27**, 597-607.
- Skaare, J. U., Larsen, H. J., Lie, E., Bernhoft, A., Derocher, A. E., Norstrom, R., Ropstad, E., Lunn, N. F. and Wiig, Ø. (2002) Ecological risk assessment of persistent organic pollutants in the arctic. *Toxicology* **181-182**, 193-197.
- Skett, P. (1994) Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/metabolism-based toxicity testing--Solutions? *Toxicology in Vitro* **8**, 491-504.
- Smith, D. A. (2000) Induction and drug development. *Eur. J. Pharm. Sci.* **11**, 185-189.
-

- Smith, D. A., Abel, S. M., Hyland, R. and Jones, B. C. (1998) Human cytochrome P450s: selectivity and measurement *in vivo*. *Xenobiotica* **28**, 1095-1128.
- Sobek, A., McLachlan, M. S., Borgå, K., Lillemor Asplund, Lundstedt-Enkel, K., Polder, A. and Gustafsson, Ö. (2010) A comparison of PCB bioaccumulation factors between an arctic and a temperate marine food web. *Science of the Total Environment* **408**, 2753-2760.
- Sonne, C., Dietz, R., Born, E. W., Riget, F. F., Kirkegaard, M., Hyldstrup, L., Letcher, R. J. and Muir, D. C. G. (2004) Is Bone Mineral Composition Disrupted by Organochlorines in East Greenland Polar Bears (*Ursus maritimus*)? *Environmental Health Perspectives* **112**, 1711-1716.
- Sørmo, E. G., Larsen, H. J. S., Johansen, G. M., Skaare, J. U. and Jenssen, B. M. (2009) Immunotoxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCB) in Free-Ranging Gray Seal Pups with Special Emphasis on Dioxin-Like Congeners. *J. Toxicol. Env. Health Pt A* **72**, 266-276.
- Sørmo, E. G., Skaare, J. U., Lydersen, C., Kovacs, K. M., Hammill, M. O. and Jenssen, B. M. (2003) Partitioning of persistent organic pollutants in grey seal (*Halichoerus grypus*) mother-pup pairs. *Science of The Total Environment* **302**, 145-155.
- Southard, J. H. and Belzer, F. O. (1995) Organ Preservation. *Annu. Rev. Med.* **46**, 235-247.
- Spotorno, V. G., Hidalgo, A., Barbich, M., Lorenti, A. and Zabal, O. (2006) Culture of bovine hepatocytes: a non-perfusion technique for cell isolation. *Cytotechnology* **51**, 51-56.
- Steinberg, R. M., Walker, D. M., Juenger, T. E., Woller, M. J. and Gore, A. C. (2008) Effects of perinatal polychlorinated biphenyls on adult female rat reproduction: Development, reproductive physiology, and second generational effects. *Biology of Reproduction* **78**, 1091-1101.
- Stockholmer Konvention (2009) Text der Konvention:
<http://chm.pops.int/Convention/tabid/54/language/en-US/Default.aspx#convtext> [15.11.2010]
- Sweat, J. M., Johnson, C. M. and Gibbs, E. P. J. (2003) In vitro development and characterization of a manatee bronchial cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* **39**, 249-256.
- Tanabe, S., Iwata, H. and Tatsukawa, R. (1994) Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Science of The Total Environment* **154**, 163-177.
- Tanabe, S., Tanaka, H. and Tatsukawa, R. (1984) Polychlorobiphenyl, DDT, and hexachlorocyclohexane isomers in the western North Pacific ecosystem. *Arch Environ Contam Toxicol* **13**, 731-738.
- Tanabe, S., Watanabe, S., Kan, H. and Tatsukawa, R. (1988) Capacity and Mode of PCB Metabolism in Small Cetaceans. *Mar. Mamm. Sci.* **4**, 103-124.

- Teoh, N. C. and Hartley, J. (2007) Modifications to the UW: Simple solutions to the 'sticky' problem of preservation injury in liver transplantation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 1557–1565.
- Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R. K., Lehec, S. C. and Hughes, R. D. (2005) Preincubation of rat and human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function upon thawing. *Liver Transplant.* **11**, 1533-1540.
- Thieme Römpf online (2006) Perfluorierte Verbindungen, <http://www.roempp.com/prod/> Dokumentkennung RD-16-01000 [01.11.2010].
- Thomé, J. P., Roelandt, L., Goffinet, G., Stouvenakers, N. and Kremers, P. (1995) Cytotoxic effects of Aroclor 1254 on ultrastructure and biochemical parameters in cultured fetal rat hepatocytes. *Toxicology* **98**, 83-94.
- Todo, S., Nery, J., Yanaga, K., Podesta, L., Gordon, R. D. and Starzl, T. E. (1989) Extended Preservation of Human Liver Grafts With UW Solution. *Journal of the American Medical Association* **261**, 711-714.
- Tomy, G. T., Budakowski, W., Halldorson, T., Helm, P. A., Stern, G. A., Friesen, K., Pepper, K., Tittlemier, S. A. and Fisk, A. T. (2004) Fluorinated organic compounds in an eastern Arctic marine food web. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 6475-6481.
- Troisi, G. M. and Mason, C. F. (1997) Cytochromes P450, P420 & mixed-function oxidases as biomarkers of polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in harbour seals (*Phoca vitulina*). *Chemosphere* **35**, 1933-1946.
- Ulbrich, B. and Stahlmann, R. (2004) Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data. *Arch. Toxicol.* **78**, 252-268.
- Upham, B. L., Deocampo, N. D., Wurl, B. and Trosko, J. E. (1998) Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail. *Int. J. Cancer* **78**, 491-495.
- Vagts, A. (1992) Nachweis ausgewählter Organochlorverbindungen in Organen des Seehundes (*Phoca vitulina*) – Ein Beitrag zur Aufklärung der Ursachen des Seehundsterbens 1988, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Van de Vijver, K. I., Hoff, P., Das, K., Brasseur, S., Van Dongen, W., Esmans, E., Reijnders, P., Blust, R. and De Coen, W. (2005) Tissue distribution of perfluorinated chemicals in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the Dutch Wadden Sea. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 6978-6984.
- Vanden Berghe, M., Mat, A., Arriola, A., Polain, S., Stekke, V., Thomé, J.-P., Gaspart, F., Pomeroy, P., Larondelle, Y. and Debier, C. (2010) Relationships between vitamin A and PCBs in grey seal mothers and pups during lactation. *Environmental Pollution* **158**, 1570–1575.

- Vecitis, C. D., Park, H., Cheng, J., Mader, B. T. and Hoffmann, M. R. (2008) Kinetics and Mechanism of the Sonolytic Conversion of the Aqueous Perfluorinated Surfactants, Perfluorooctanoate (PFOA), and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) into Inorganic Products. *J. Phys. Chem. A.* **112**, 4261-4270.
- Vignati, L. A., Bogni, A., Grossi, P. and Monshouwer, M. (2004) A human and mouse pregnane X receptor reporter gene assay in combination with cytotoxicity measurements as a tool to evaluate species-specific CYP3A induction. *Toxicology* **199**, 23-33.
- Vondran, F. W. R., Katenz, E., Schwartlander, R., Morgul, M. H., Raschzok, N., Gong, X. B., Cheng, X. D., Kehr, D. and Sauer, I. M. (2008) Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: Criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artif. Organs* **32**, 205-213.
- Weijs, L., Dirtu, A. C., Das, K., Gheorghe, A., Reijnders, P. J. H., Neels, H., Blust, R. and Covaci, A. (2009a) Inter-species differences for polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in marine top predators from the Southern North Sea: Part 1. Accumulation patterns in harbour seals and harbour porpoises. *Environmental Pollution* **157**, 437-444.
- Weijs, L., Dirtu, A. C., Das, K., Gheorghe, A., Reijnders, P. J. H., Neels, H., Blust, R. and Covaci, A. (2009b) Inter-species differences for polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in marine top predators from the Southern North Sea: Part 2. Biomagnification in harbour seals and harbour porpoises. *Environmental Pollution* **157**, 445-451.
- Wilson, J. Y., Wells, R., Aguilar, A., Borrell, A., Tornero, V., Reijnders, P., Moore, M. and Stegeman, J. J. (2007) Correlates of cytochrome P450 1A1 expression in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) integument biopsies. *Toxicol. Sci.* **97**, 111-119.
- Wise, S. S., Shaffley, F., LaCerte, C., Goertz, C. E. C., Dunn, J. L., Gulland, F. M. D., Aboueissa, A. E., Zheng, T. Z. and Wise, J. P. (2009) Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to Steller sea lion lung cells. *Aquatic Toxicology* **91**, 329-335.
- Wolkers, H., Hammill, M. O. and van Bavel, B. (2006) Tissue-specific accumulation and lactational transfer of polychlorinated biphenyls, chlorinated pesticides, and brominated flame retardants in hooded seals (*Cistophora cristata*) from the Gulf of St. Lawrence: Applications for monitoring. *Environmental Pollution* **142**, 476-486.
- Wolkers, H., Lydersen, C. and Kovacs, K. M. (2004) Accumulation and lactational transfer of PCBs and pesticides in harbor seals (*Phoca vitulina*) from Svalbard, Norway. *Science of The Total Environment* **319**, 137-146.
- Wundt, J. (2009) Charakterisierung von NeoHepatozyten als Ersatz für humane Hepatozyten und Induktionsuntersuchungen, Dissertation, Universität Kiel.
- Yagi, K., Sumiyoshi, N., Nakashima, Y., Michibayashi, N., Kawase, M., Miura, Y. and Mizoguchi, T. (1998) Stimulation of liver functions in hierarchical co-culture of bone marrow cells and hepatocytes. *Cytotechnology* **26**, 5-12.

- Yu, J., Kindy, M. S., Ellis, B. C., Baatz, J. E., Peden-Adams, M., Ellingham, T. J., Wolff, D. J., Fair, P. A. and Gattoni-Celli, S. (2005) Establishment of Epidermal Cell Lines Derived From the Skin of the Atlantic Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **287A**, 1246–1255.
- Yuan, J., Lu, W. Q., Zou, Y. L., Wei, W., Zhang, C., Xie, H. and Chen, X. M. (2009) Influence of Aroclor 1254 on Benzo(a)Pyrene-Induced DNA Breakage, Oxidative DNA Damage, and Cytochrome P4501A Activity in Human Hepatoma Cell Line. *Environ. Toxicol.* **24**, 327-333.
- Zhou, B. S., Liu, C. S., Wang, J. X., Lam, P. K. S. and Wu, R. S. S. (2006) Primary cultured cells as sensitive in vitro model for assessment of toxicants-comparison to hepatocytes and gill epithelia. *Aquatic Toxicology* **80**, 109-118.

8 Anhang

8.1 Herstellung und Zusammensetzung der Puffer und Mediumzusätze

Für die Isolierung der Hepatozyten aus Seehund und Schwein werden zwei Puffer verwendet, die in den verschiedenen Spülschritten unterschiedliche Zusätze enthalten (Zusammensetzung der Puffer s. Tabelle 8-1, 8-2 und 8-3).

Tabelle 8-1: Zusatz zum Perfusionspuffer

| | |
|--------------------------------|---|
| Konzentration im Medium | CaCl₂-Lösung 0,2 M |
| Ansatzgröße | 100 ml |
| Substanz | CaCl ₂ x 2 H ₂ O |
| Menge | 2,94 g |
| Lösungsmittel | Reinstwasser |
| Aliquote | sterilfiltrieren á 10 ml in 15 ml Röhrchen abfüllen |
| Lagerung | RT |
| Einsatzmenge | 10 ml/500 ml |

Tabelle 8-2 Präperfusionspuffer

| Substanz | mmol/l | g/5 l |
|--------------------|--------|-------|
| EDTA | 1,0 | 1,45 |
| Hepes | 20,0 | 23,85 |
| KCl | 5,6 | 2,1 |
| NaCl | 154,0 | 45,0 |
| NaHCO ₃ | 25 | 10,5 |
| + Glucose | 5 | 5 x 1 |

Alle Substanzen (bis auf die Glucose) wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend durch einen 0,2 µm Membranfilter in 1 l Flaschen steril filtriert und im Kühlschrank gelagert. Kurz vor der Verwendung wurde pro Liter Puffer 1 g Glucose zugegeben. Für die Präperfusion wurden für beide Spezies ca. 2 l verwendet.

Tabelle 8-3: Perfusionspuffer

| Substanz | mmol/l | g/2 l |
|-----------------------------------|--------|-----------|
| Hepes | 20,0 | 9,54 |
| KCl | 5,6 | 0,82 |
| NaCl | 154,0 | 18,0 |
| NaHCO ₃ | 25 | 4,2 |
| + Glucose | 5 | 4 x 0,5 |
| + CaCl ₂ -Lsg. (0,2 M) | 4,0 | 4 x 10 ml |

Die Herstellung des Perfusionspuffers erfolgte analog zum Präperfusionspuffer. Der Puffer wurde in 0,5 l Flaschen abgefüllt. Pro Perfusion wurden 0,5 l Puffer benötigt. Kurz vor der Verwendung wurden 0,5 g Glucose und 10 ml CaCl₂-Lösung zugefügt. Anschließend wurde der Puffer nach folgendem Schema aufgeteilt:

- Perfusion: 150 ml + Collagenase (300 U/ml)
- Puffer zur Isolierung der Zellen: 200 ml + 8 mg DNase
- Zwischenschritt: 150 ml ohne weitere Zusätze

Die Hepatozyten wurden in WME Medium kultiviert. Das Kulturmedium wurde hergestellt in dem 436 ml WME Medium mit den Zusätzen aus Tabelle 8-4 und Tabelle 8-5 versetzt wurde.

Tabelle 8-4: Zusätze zum Kulturmedium 1

| Konzentration im Medium | Glucagon 0,014 µg/ml | Prednisolon 0,6 µg/ml | Insulin 0,16 U/mg |
|-------------------------|---|--------------------------|---|
| Ansatzgröße | 100 ml | 2,0 ml | 10,0 ml |
| Substanz | Glucagon | Prednisolon | Insulin |
| Menge | 0,28 mg | 40 mg | ~50 mg |
| Lösungsmittel | 0,15 M NaCl-Lsg* | Ethanol 96 % | In 2 ml Reinstwasser suspendieren + 0,01 M HCl [#] |
| Aliquote | Sterilfiltrieren á 6 ml in 15 ml Röhrchen | á 300 µl in 1,5 ml Eppis | á 650 µl in 1,5 ml Eppis |
| Lagerung | -20°C | -20°C | -20°C |
| Einsatzmenge | 2,5 ml/500 ml | 240 µl/500 ml | 600 µl/500 ml |

* 0.15 M NaCl-Lösung: 0.877 g/100 ml

Anhang

0.01 M HCl: 1000 µl HCl 36% ad 100.0 ml

Tabelle 8-5: Zusätze zum Kulturmedium 2

| Konzentration im Medium | Fötales Kälberserum 10% | Glutamin 2 mM | Penicillin/Streptomycin 100 U/ml / 100 µg/ml |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|--|
| Aliquote | á 25 ml in 50 ml Röhrchen | á 1 ml in 1,5 ml Eppis | á 1 ml in 1,5 ml Eppis |
| Lagerung | -20°C | -20°C | -20°C |
| Einsatzmenge | 50 ml/500 ml | 5 ml/500 ml | 5 ml/500 ml |

Tabelle 8-6: Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers

| | Endkonzentration | Menge |
|------------------------------|------------------|-------------------------|
| Harnstoff (FW 60,06) | 8 M | 4,8 g |
| CHAPS | 2% (w/v) | 0,2 g |
| Bio-Lyte® 3/10 (100x, 40%ig) | 0,2% (w/v) | 5 µl |
| Bromphenolblau | 0,001% | 10 µl der 1%igen Lösung |
| Reinstwasser | | auf 10 ml auffüllen |

Tabelle 8-7: Zusammensetzung der UW-Lösung

| Substanz | Konzentration | g/l |
|---------------------------------|---------------|-------|
| PEG | 0,03 mM | 1,05 |
| Lactobionsäure | 100 mM | 35,8 |
| Adenosin | 5 | 1,34 |
| Allopurinol | 1 mM | 0,14 |
| NaOH (5 M) | 25 mM | 5 ml |
| KH ₂ PO ₄ | 25 mM | 3,4 |
| MgSO ₄ | 5 mM | 0,6 |
| Gluthathion | 3 mM | 0,92 |
| Raffinose | 30 mM | 17,8 |
| KOH (5 M) | 125 mM | 20 ml |

8.2 Erläuterung der medizinischen Fachbegriffe

Tabelle 8-8: Erläuterung der medizinischen Fachbegriffe der Befunde der Seehunde (s. Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3)

| Medizinischer Fachbegriff | Erläuterung |
|----------------------------------|---|
| Aneurysma | lokale, spindel- oder sackförmige Erweiterung der Blutgefäße |
| Enteritis | Darmentzündung |
| Endoparasitose | Befall eines Wirtes mit Endoparasiten z.B. Würmer |
| Meningoenzephalitis | Hirnhautentzündung |
| Kachexie | Auszehrung, pathologischer (krankhafter) Gewichtsverlust |
| Gastroenteritis | Magen-Darm-Entzündung |
| Bronchopneumonie | Lungenentzündung |
| Phlegmone | eitrige, Infektionserkrankung der Weichteile (des interstitiellen Bindegewebes) |

8.3 Zusätzliche Abbildungen zum XTT-Test

8.3.1 Veränderung der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen im XTT-Test nach Schadstoffinkubation

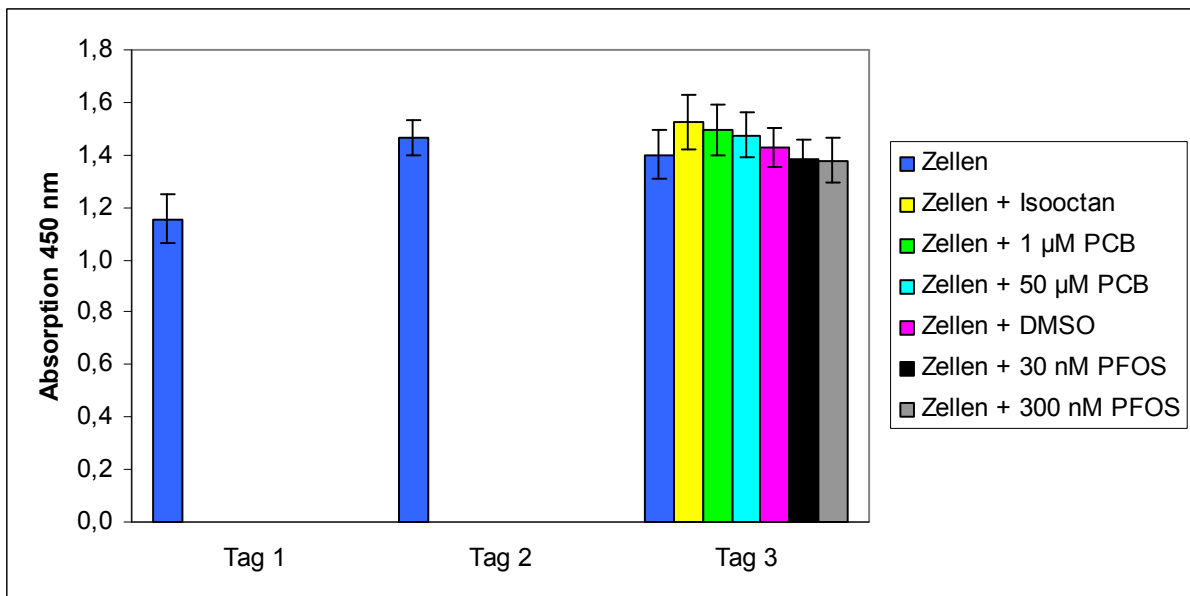


Abbildung 8-1: Veränderung der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen (H 4) nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

8.3.2 Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test nach Schadstoffinkubation

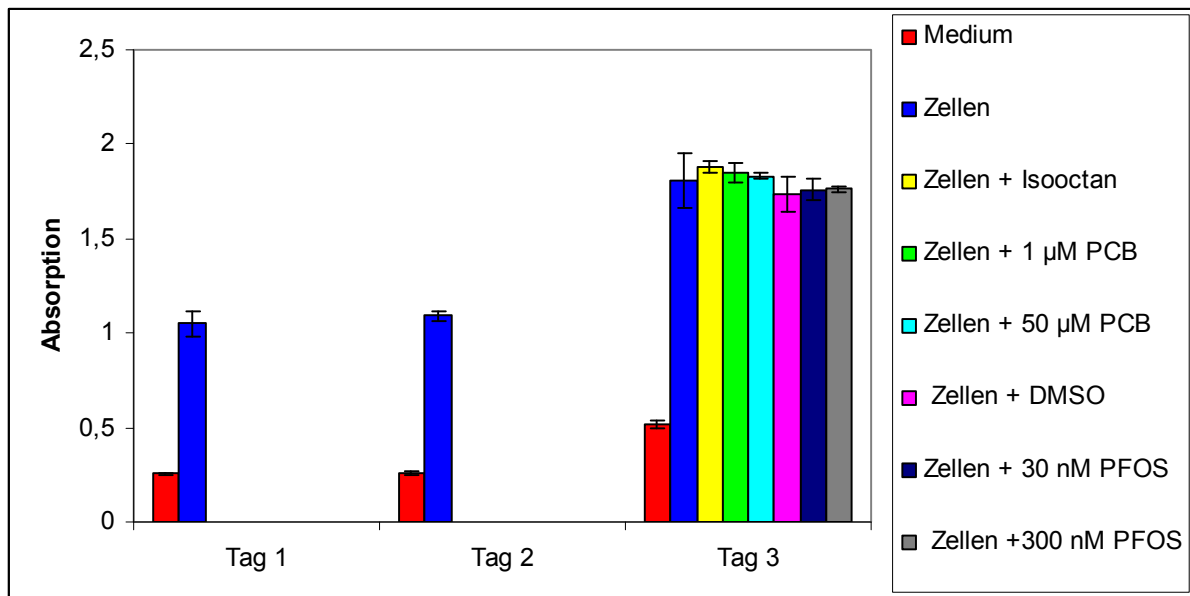


Abbildung 8-2: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten (S23) nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*)

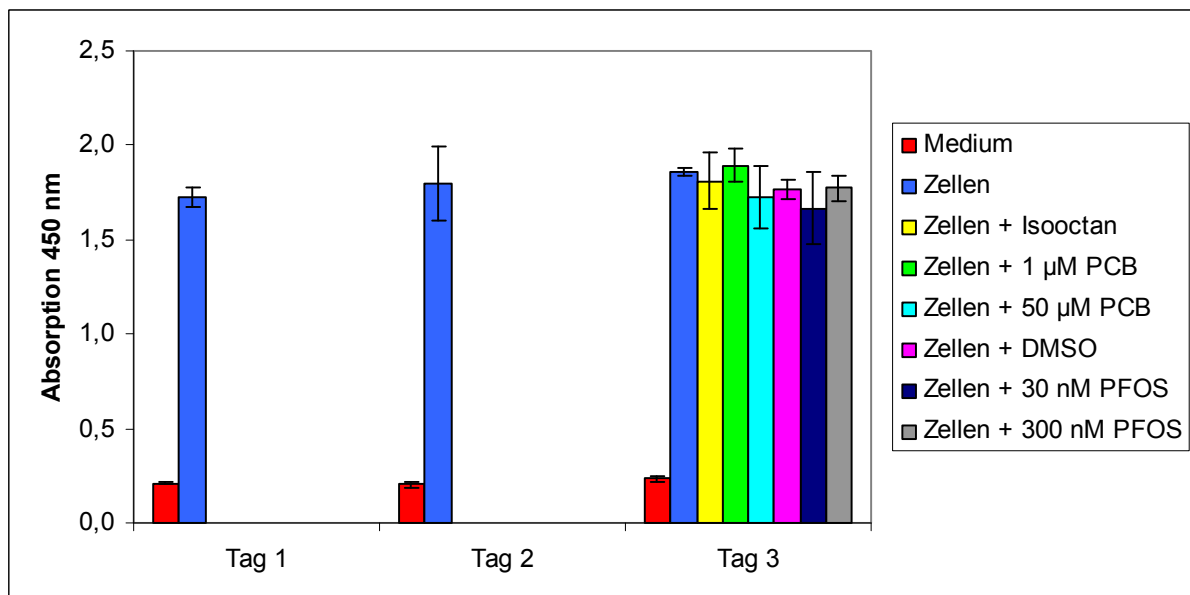


Abbildung 8-3: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten (S29) nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*)

8.3.3 Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test nach Schadstoffinkubation

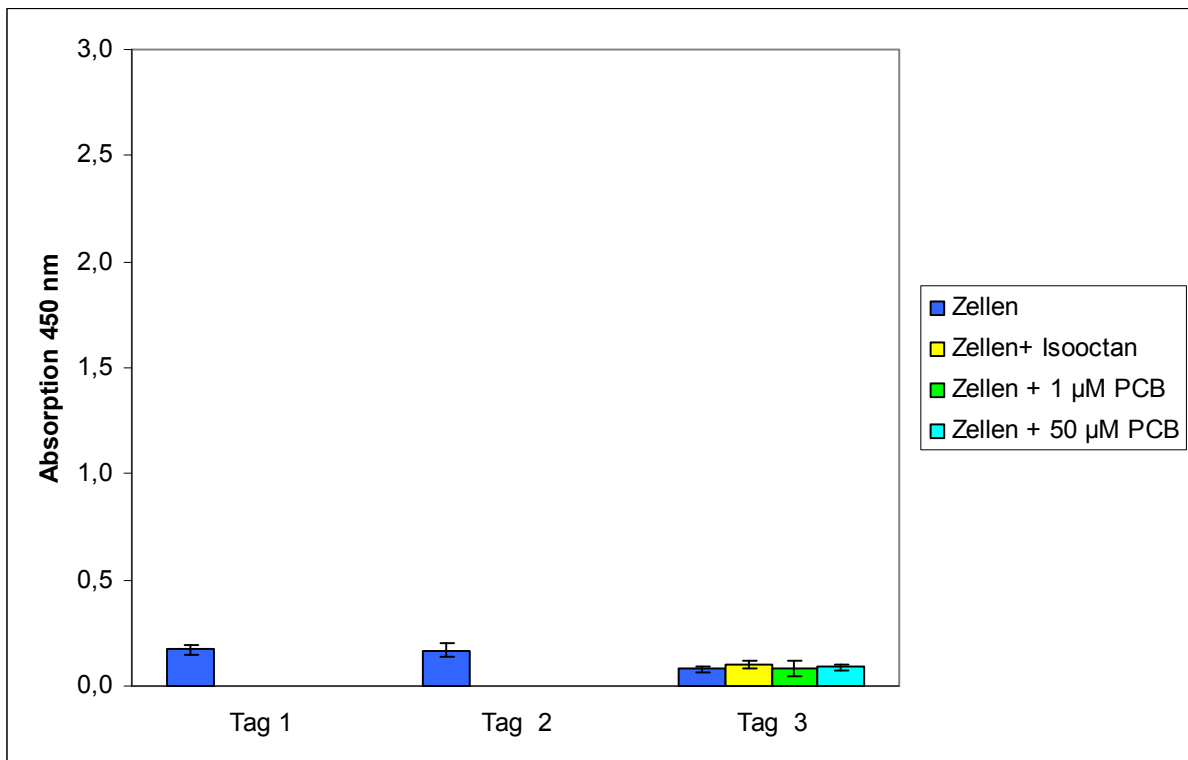


Abbildung 8-4: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten aus Pv 19 nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

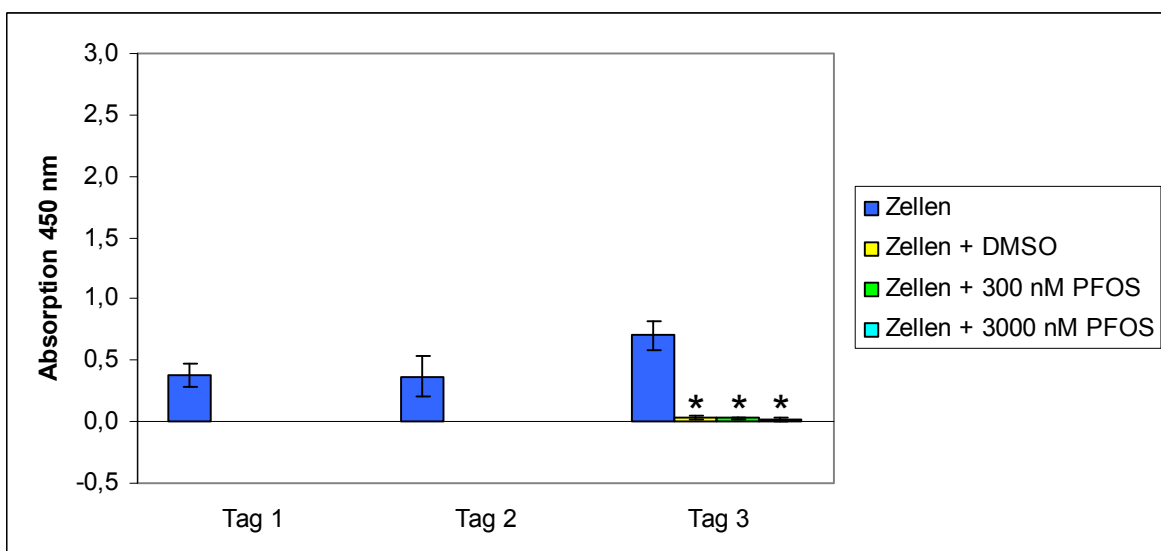


Abbildung 8-5: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten aus Pv 20 nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. Die Schadstoffkonzentrationen hätten 30 nM bzw. 300 nM PFOS sein müssen.

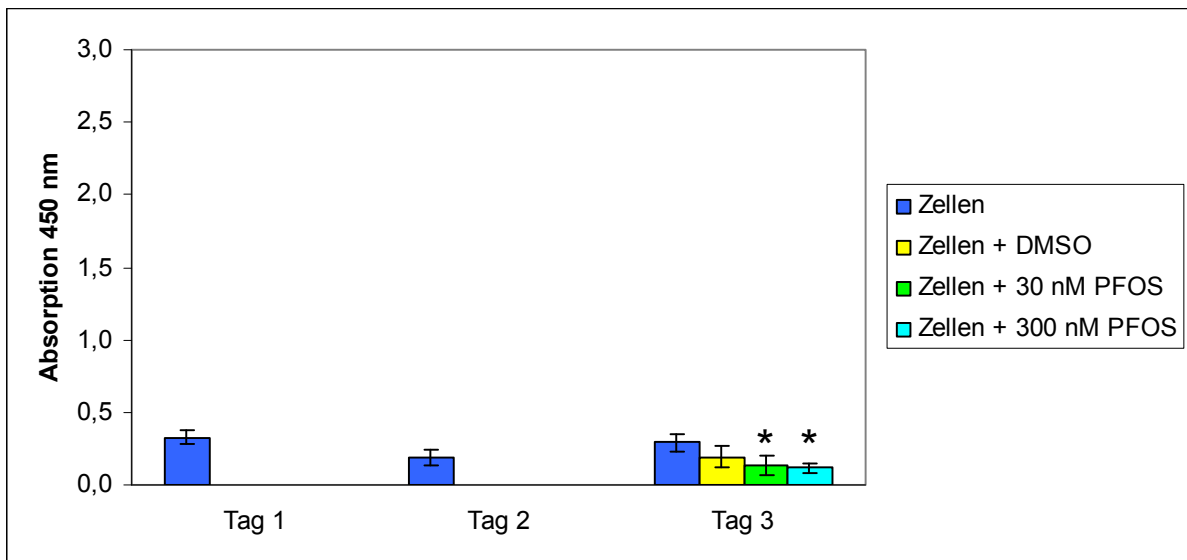


Abbildung 8-6: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten aus Pv 21 nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

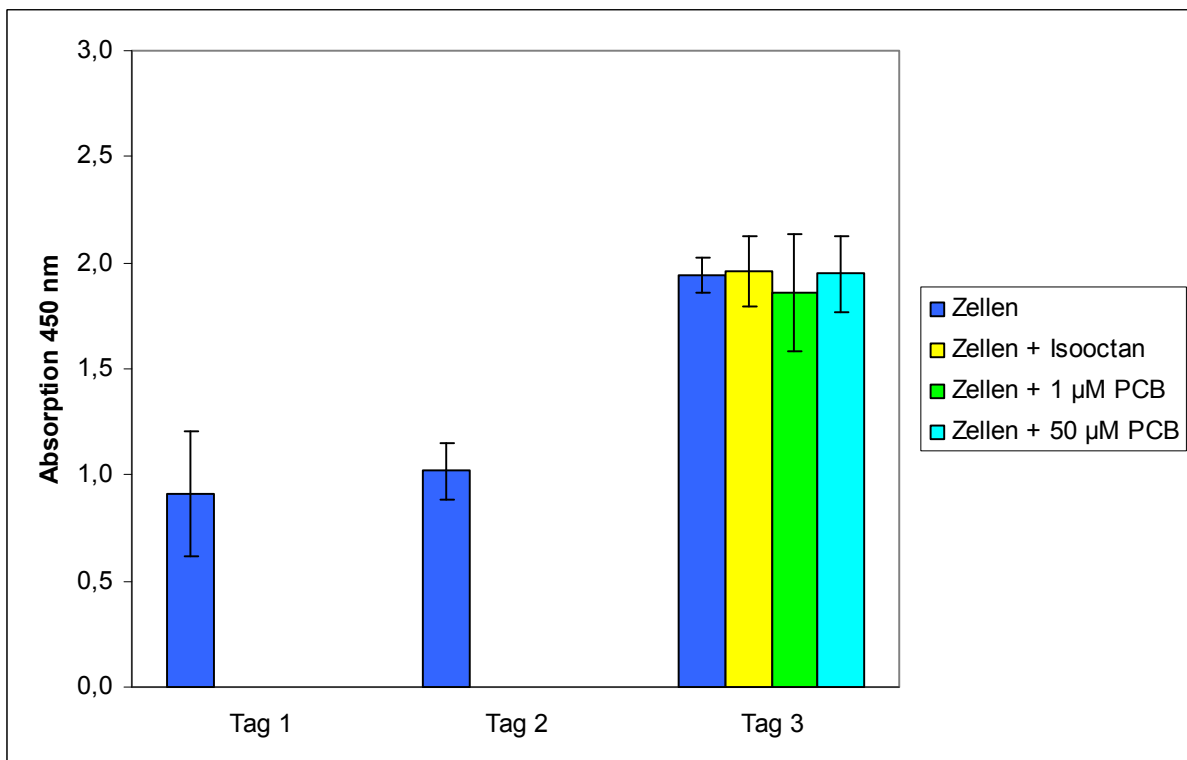


Abbildung 8-7: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten aus Pv 23 nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen.

9 Erklärung zur selbständigen Anfertigung der Arbeit

Ich versichere, daß ich die eingereichte Dissertation „Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung des Schadstoffeinflusses auf Seehunde (*Phoca vitulina*)“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfaßt habe. Anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel und Schriften habe ich mich nicht bedient. Alle wörtlich oder sinngemäß den Schriften anderer Autorinnen oder Autoren entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.

Antonia Wargel

Hannover,

10 Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde im Helmholtz-Zentrum Geesthacht im Institut für Küstenerforschung in der „Arbeitsgruppe schadstoff-induzierte Proteinexpression“ angefertigt. Ein besonderer Dank geht an meine Arbeitsgruppenleiterin und Betreuerin Prof. Dr. Veronika Hellwig. Vielen Dank für die Ermöglichung der Durchführung meiner Doktorarbeit, für das große Interesse, Engagement und die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Für seine Tätigkeit als Zweitgutachter danke ich sehr herzlich Herr Prof. W. Ruck von der Leuphana Universität Lüneburg.

Ich möchte mich sehr herzlich bei PD. Dr. U. Siebert vom Forschungs- und Technologiezentrum Westküste der Universität Kiel in Büsum bedanken. Nur mit ihrer Hilfe war die Durchführung dieser Arbeit möglich. Vielen Dank für die Unterstützung bei den Probenahmen, für die Möglichkeit die Räumlichkeiten des FTZs zu nutzen sowie für die Bereitstellung der medizinischen Daten und für das Interesse an meiner Arbeit.

Meinen herzlichsten Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Clement von der Universität Kiel aussprechen für die Möglichkeit bei ihm die Leberbiopsie Perfusion zu erlernen. Ein besonders großes Dankeschön geht an Frau Dr. J. Wundt dafür, dass sie sich viel Zeit genommen hat, um mich geduldig und ausführlich in der Leberbiopsie Perfusion zu unterweisen hat. Vielen Dank dafür, dass ich bei Fragen jederzeit anrufen konnte!

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter der FTZ für die tolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe (ihr habt mich mit offenen Armen empfangen) und die vielfältige Unterstützung! Besonders bedanken möchte ich mich bei allen, die mir bei der Probenahme so prima geholfen haben (auch zu unmöglichen Uhrzeiten!): Henrike, Ilka, Janne, Katharina, Konny, Kristina, Sabine sowie Hanna und Frederike.

Mein herzlicher Dank gebührt ebenfalls Herrn Dr. J. Driver für seine Unterstützung bei den Probenahmen.

Danksagung

Für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit möchte ich mich ebenfalls sehr herzlich bei den Seehundjägern aus Schleswig Holstein bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei T. Rosenberger und dem Team der Seehundstation Friedrichskoog für die Unterstützung meiner Arbeit bedanken! Es hat mir große Freude bereitet mit Euch zusammenzuarbeiten!

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen „Schadstoff-induzierte Proteinexpression“ und „Marine bioanalytische Chemie“ der GKSS bedanken. Vielen Dank für die gute Arbeitsatmosphäre, die vielen guten Gespräche, die Aufmunterung und Motivation. Es war eine tolle Zeit mit Euch!!!

Für die Bestimmung der PFOS-Konzentrationen bedanke mich sehr herzlich bei Dr. Lutz Ahrens.

Ein besonders großes Dankeschön gebührt meinen lieben Kolleginnen Annika, Danijela und Vera. Tausend Dank für Eure Unterstützung in allen Labor- und Lebenslagen!!! Für die Unterstützung bei der Durchführung der Zelltests möchte ich mich sehr herzlich bei LiLin bedanken!

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen zahlreichen Korrekturlesern für ihre großartige Hilfe!!! Danke für Eure Unterstützung: Annika, Danijela, Katharina, Kristina, Nico, Petra, Tina, Vera und Yvonne.

Ein riesiges Dankeschön gebührt auch meinen lieben GKSS-Kollegen Anne, Alena, Elke, Ivonne, Jonas, Janna, Kerstin, Mechthild, Moritz und Nik. Ohne Euch wäre die Zeit nur halb so gut gewesen!!!!

Zuletzt möchte ich meinen Eltern von ganzem Herzen dafür danken, dass ich mir jederzeit ihrer liebevollen Unterstützung, ihrem Verständnis und ihrem Vertrauen sicher sein kann.

Meine tiefste Dankbarkeit gebührt meinem Freund Jan, der alle Tiefs miterleben musste und tapfer ertragen hat! Danke für unsere wunderbare Reise, Deine Geduld und die Rundum-Verpflegung!

11 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 3-1: Juvenile Seehunde in der Seehundstation Friedrichskoog e. V. | 14 |
| Abbildung 3-2: Seehundpopulation im Wattenmeer 1975-2009 (CWSS, 2009a); Die Farben kennzeichnen die verschiedenen Seehundpopulationen. Gelb: Niederlande; grün: Dänemark; weiß: Niedersachsen und Hamburg; blau: Schleswig-Holstein; rot: Gesamtbestand | 16 |
| Abbildung 3-3: Spaltung von XTT zu Formazan (Scudiero <i>et al.</i> , 1988) | 30 |
| Abbildung 3-4 Harnstoff-Nachweis | 31 |
| Abbildung 3-5: LDH-Nachweis (Roche, 2006) | 33 |
| Abbildung 3-6: Allgemeine Strukturformel für Polychlorierte Biphenyle | 34 |
| Abbildung 3-7: Strukturformel von PFOS | 40 |
| Abbildung 3-8: Übersicht über einen vollständigen Inkubationsansatz mit PCB (nach Behr 2008a) | 46 |
| Abbildung 3-9: Schematische Darstellung der Hepatozyten Kultivierung (nach Korff, 2010) | 50 |
| Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Leberentnahme | 57 |
| Abbildung 4-2: Perfusionsapparatur | 63 |
| Abbildung 4-3: In der Perfusionsapparatur platziertes Stück einer Schweineleber vor der Präperfusion (1) und nach Abschluss derselbigen (2) | 64 |
| Abbildung 4-4: Belegungsplan für den XTT-Test. gelbe Felder: 1×10^4 Zellen; blaue Felder: Medium | 69 |
| Abbildung 5-1: Primäre Seehund-Hepatozyten (Pv 4) 96 h nach der Isolierung (GdS), Medium: Opti-MEM; roter Pfeil: Hepatozyten; schwarze Pfeile: Zelltrümmer; Vergr.: 200x | 82 |
| Abbildung 5-2: Primäre Seehund-Hepatozyten (Pv 13) 24 h nach der Isolierung, Medium: Hepatozyte-SFM, rote Pfeile: Hepatozyten; weiße Pfeile Erythrozyten; schwarze Pfeile: Zelltrümmer; Vergr.: 200x, Messbalken: 100 μ m | 84 |
| Abbildung 5-3: Primäre Schweine-Hepatozyten (S 28) 48 h nach der Isolierung, Medium: Hepatozyte-SFM, rote Pfeile: Hepatozyten; weiße Pfeile: Erythrozyten; grüne Pfeile: Zelltrümmer; Vergr.: 200x, Phasenkontrast-Aufnahme | 86 |
| Abbildung 5-4: Primäre Schweine-Hepatozyten 3 h nach der Isolierung (S 29), Medium: WME, rote Pfeile: ausgebreitete Hepatozyten; grüne Pfeile: nicht ausgebreitete Hepatozyten; weiße Pfeile: Erythrozyten; Verg. 200x, Phasenkontrast-Aufnahme | 87 |
| Abbildung 5-5: Primäre Seehund-Hepatozyten (Pv 22) 24 h nach der Isolierung, Medium: WME, rote Pfeile: ausgebreitete Hepatozyten; schwarze Pfeile: nicht ausgebreitete Hepatozyten; weiße Pfeile: Erythrozyten; Vergr.: 400x; Messbalken: 50 μ m | 88 |
| Abbildung 5-6: Primäre Schweine-Hepatozyten (S 28) 72 h nach Isolierung, Medium: WME, rote Pfeile: ausgebreitete Hepatozyten; blauer Pfeil: Zellkern; weißer Pfeil: Erythrozyt; grüner Pfeil: Zelltrümmer; Vergr.: 200x, Phasenkontrast | 90 |
| Abbildung 5-7: HepG2-Zellen 48 h nach der Aussaat (6.8.2008), Medium: RPMI, rote Pfeile: ausgebreitete Zellen; schwarzer Pfeile: nicht ausgebreitete Zellen; Vergr.: 200x | 96 |
| Abbildung 5-8: Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten im XTT-Test. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus je 8 Messungen; 1×10^4 Zellen/well. Die Absorptionen der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionen der Proben subtrahiert. | 98 |

- Abbildung 5-9: Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten (Pv 22) im XTT-Test nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.** 99
- Abbildung 5-10: Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test (in WME). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus je 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.** 103
- Abbildung 5-11: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten (S 25) im XTT-Test nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, Zellkulturmedium: WME; signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*)** 104
- Abbildung 5-12: Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode (Leberbiopsie Perfusion und GdM). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, Medium: WME, signifikanter Unterschied zum entsprechenden Medium: $p < 0,05$ (*)** 105
- Abbildung 5-13: Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten im XTT-Test in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus je 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well. Isolierungsmethode: LbP; die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9), H = Hepatozyme-SFM, W = WME. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.** 106
- Abbildung 5-14: Primäre Schweine-Hepatozyten 48 h nach Isolierung (S 27), A: Hepatozyme-SFM, B: WME; rote Pfeile: ausgebreiteten Hepatozyten; blaue Pfeile: Zellkern; grüne Pfeile: Zelltrümmer; weiße Pfeile: Erythrozyten; gelbe Pfeile: nicht ausgebreitete Hepatozyten; Vergr.: 200x, Phasenkontrast** 107
- Abbildung 5-15: Stoffwechselaktivität der HeG2-Zellen im XTT-Test. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus je mind. 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.** 110
- Abbildung 5-16: Veränderung der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen (H 3 und H 5) nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Absorptionswerten der Proben subtrahiert.** 111
- Abbildung 5-17: Von den primären Seehund-Hepatozyten ($3,8 \times 10^6$ Zellen) gebildete Harnstoffmengen vor und nach Isooctan- bzw. PCB-Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Messungen. Zugabe von Isooctan und PCB an Tag 2. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.** 113
- Abbildung 5-18: Von den primären Seehund-Hepatozyten ($3,8 \times 10^6$ Zellen) gebildete Harnstoffmengen vor und nach PFOS-Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Messungen. Zugabe von DMSO und PFOS an Tag 2. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.** 114
- Abbildung 5-19: Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9). Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert.** 117

- Abbildung 5-20:** Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($1,6 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2-3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9). Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert. 118
- Abbildung 5-21:** Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($1,6 \times 10^6$ Zellen) in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 Parallelproben und je 3 Messungen. GdM=Gewebe-dissoziation in Medium, LbP=Leberbiopsie Perfusion, signifikanter Unterschied zwischen den Methoden: $p < 0,05$ (*). Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert. 119
- Abbildung 5-22:** Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($1,6 \times 10^6$ Zellen) in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3 Messungen. H=Hepatozyte-SFM, W=WME, signifikanter Unterschied zwischen den Zellen in den verschiedenen Medien: $p < 0,05$ (*). Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert. 120
- Abbildung 5-23:** Von den primären Schweine-Hepatozyten gebildete Harnstoffmengen ($1,6 \times 10^6$ Zellen) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (S 27-29). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 Parallelproben und je 3 Messungen. Die roten Pfeile markieren die Tage, an denen in den zwei vorangegangenen Tagen kein Mediumwechsel stattfand. 121
- Abbildung 5-24:** Primäre Schweine-Hepatozyten an Tag 0 (A), Tag 5 (B), Tag 8 (C) und Tag 12 (D) nach der Isolierung (S 28), Leberbiopsie Perfusion, Medium: WME, rote Pfeile: ausgebreitete Hepatozyten; grüne Pfeile: Zelltrümmer; gelbe Pfeile: Lücke im Zellrasen; Vergr.: 200x, Phasenkontrast 122
- Abbildung 5-25:** Von den HepG2-Zellen gebildete Harnstoffmengen ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert. 124
- Abbildung 5-26:** Von den HepG2-Zellen gebildete Harnstoffmengen ($3,8 \times 10^6$ Zellen) vor und nach Inkubation mit Isooctan bzw. PCB. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zugabe von Isooctan und PCB erfolgte an Tag 2. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert. 125
- Abbildung 5-27:** Von den HepG2-Zellen gebildete Harnstoffmengen ($3,8 \times 10^6$ Zellen) vor und nach Inkubation mit DMSO und PFOS. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zugabe von DMSO und PFOS erfolgte an Tag 2. Die Harnstoffwerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den dazugehörigen Harnstoffwerten der Proben subtrahiert. 126
- Abbildung 5-28:** LDH-Freisetzung der primären Seehund-Hepatozyten vor und nach Inkubation mit Isooctan und $50 \mu\text{M}$ PCB ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Messungen. Die Zugabe von Isooctan und PCB erfolgte an Tag 2. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 129
- Abbildung 5-29:** LDH-Freisetzung der primären Seehund-Hepatozyten vor und nach Inkubation mit DMSO und PFOS ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Messungen. Die Zugabe von DMSO und PFOS erfolgte an Tag 2. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 130
- Abbildung 5-30:** LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($3,8 \times 10^6$ Zellen; aus S 25 und S27). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 132

- Abbildung 5-31: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2-3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Schweineleber, aus der die Hepatozyten isoliert wurden (s. Tabelle 5-9). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 133
- Abbildung 5-32: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit 2 Parallelproben und je 3 Messungen. GdM=Gewebedissoziation in Medium, LbP=Leberbiopsie Perfusion. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 134
- Abbildung 5-33: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen) in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3 Messungen. H=Hepatozyte-SFM, W=WME. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 135
- Abbildung 5-34: LDH-Freisetzung der primären Schweine-Hepatozyten ($1,6 \times 10^6$ Zellen) im Verlauf einer 14-tägigen Kultivierung in WME. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2 Parallelproben und 3 Messungen. Die roten Pfeile markieren die Tage, an denen in den zwei vorangegangenen Tagen kein Mediumwechsel erfolgte. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 136
- Abbildung 5-35: LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen ($3,8 \times 10^6$ Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 138
- Abbildung 5-36: LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen ($3,8 \times 10^6$ Zellen) nach der Inkubation mit Isooctan bzw. PCB. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 139
- Abbildung 5-37: LDH-Freisetzung der HepG2-Zellen ($3,8 \times 10^6$ Zellen) nach der Inkubation mit DMSO bzw. PFOS. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 3 Parallelproben mit je 3 Messungen. Das Datum in der Legende bezieht sich auf den Zeitpunkt der Aussaat. Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 140
- Abbildung 5-38: Reaktionen der Seehund-Hepatozyten auf die Schadstoffinkubation im XTT-, Harnstoff- und LDH-Test. Dargestellt sind die Veränderungen nach Schadstoffeinfluss an Tag 3 im Vergleich zu Tag 2 (vor Schadstoffgabe); Spalte: beprobtes Tier; Zeile: Schadstoffkonzentration 144
- Abbildung 5-39: Reaktionen der Schweine-Hepatozyten auf eine Schadstoffinkubation im XTT-Test. Dargestellt sind die Veränderungen nach Schadstoffeinfluss an Tag 3 im Vergleich zu Tag 2 (vor Schadstoffinkubation); Spalte: beprobtes Tier; Zeile: Schadstoffkonzentration 148
- Abbildung 5-40: Reaktionen der HepG2-Zellen auf eine Schadstoffinkubation im XTT-, Harnstoff- und LDH-Test. Dargestellt sind die Veränderungen nach Schadstoffeinfluss an Tag 3 im Vergleich zu Tag 2 (vor Schadstoffinkubation); Spalte: Zellpräparation; Zeile: Schadstoffkonzentration 150
- Abbildung 8-1: Veränderung der Stoffwechselaktivität der HepG2-Zellen (H 4) nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. 188
- Abbildung 8-2: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten (S23) nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*) 189

| | |
|---|------------|
| Abbildung 8-3: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Schweine-Hepatozyten (S29) nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 4 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*) | 189 |
| Abbildung 8-4: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten aus Pv 19 nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. | 190 |
| Abbildung 8-5: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten aus Pv 20 nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. Die Schadstoffkonzentrationen hätten 30 nM bzw. 300 nM PFOS sein müssen. | 190 |
| Abbildung 8-6: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten aus Pv 21 nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen. | 191 |
| Abbildung 8-7: Veränderung der Stoffwechselaktivität der Seehund-Hepatozyten aus Pv 21 nach Schadstoffinkubation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus 8 Messungen, 1×10^4 Zellen/well, signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen an Tag 3: $p < 0,05$ (*). Die Absorptionswerte der jeweiligen Mediumkontrollen wurden von den Absorptionswerten der dazugehörigen Proben abgezogen | 191 |

12 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Tabelle 2-1: Exemplarische Übersicht über die bereits durchgeführten Arbeiten an Zellen aus marinen Säugetieren | 10 |
| Tabelle 4-1: Beprobte Seehunde 2006-2008 | 56 |
| Tabelle 4-2: Beprobte Schweine | 58 |
| Tabelle 4-3: Übersicht über die mit Seehund-Hepatozyten durchgeführten Inkubationsexperimente | 74 |
| Tabelle 5-1: Übersicht über die durchgeführten Vitalitätstests mit Seehund-, Schweine-Hepatozyten und HepG2-Zellen. Pv = Seehund; S = Schwein; H = HepG2; X = XTT-Test; H = Harn-stoffsynthese; H+ Iso = Harnstoffsynthese bei verschiedenen Isolierungsmethoden (Gewebe-dissoziation in Medium, Leberbiopsie Perfusion); H+ Med. = Harnstoffsynthese in 2 verschiedenen Medien (Hepatozyme-SFM, WME); L = LDH-Freisetzung; L+ Iso = LDH-Freisetzung bei verschiedenen Isolierungsmethoden (Gewebedissoziation in Medium, Leberbiopsie Perfusion); L+ Med. = LDH-Freisetzung in 2 verschiedenen Medien (Hepatozyme-SFM, WME) | 77 |
| Tabelle 5-2: Befunde der Heuler (Erläuterung der medizinischen Fachbegriffe s. Tabelle 8-8 im Anhang) | 79 |
| Tabelle 5-3: Befunde der Jungtiere (Erläuterung der medizinischen Fachbegriffe s. Tabelle 8-8 im Anhang) | 79 |
| Tabelle 5-4: Ausbeute und Vitalität der isolierten Seehund-Hepatozyten (Methode: GdS) | 81 |
| Tabelle 5-5: Ausbeute und Vitalität der isolierten Seehund-Hepatozyten (Methode: GdP) | 83 |
| Tabelle 5-6: Ausbeute und Vitalität der isolierten Seehund-Hepatozyten (Methode: GdM) | 84 |
| Tabelle 5-7: Ausbeute und Vitalität der isolierten Schweine-Hepatozyten (Methode: GdM) | 85 |
| Tabelle 5-8: Ausbeute der isolierten Seehund-Hepatozyten (Methode: LbP) | 88 |
| Tabelle 5-9: Ausbeute und Vitalität der isolierten Schweine-Hepatozyten (Methode: LbP) | 89 |
| Tabelle 5-10: Optimierungsversuche zur Leberbiopsie Perfusion. Ausbeute und Vitalität der isolierten Schweine-Hepatozyten. | 94 |
| Tabelle 5-11: Übersicht über die durchgeführten Experimente mit HepG2-Zellen | 96 |
| Tabelle 8-1: Zusatz zum Perfusionspuffer | 184 |
| Tabelle 8-2 Präperfusionspuffer | 184 |
| Tabelle 8-3: Perfusionspuffer | 185 |
| Tabelle 8-4: Zusätze zum Kulturmedium 1 | 185 |
| Tabelle 8-5: Zusätze zum Kulturmedium 2 | 186 |
| Tabelle 8-6: Zusammensetzung des Rehydrierungspuffers | 186 |
| Tabelle 8-7: Zusammensetzung der UW-Lösung | 186 |
| Tabelle 8-8: Erläuterung der medizinischen Fachbegriffe der Befunde der Seehunde (s. Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3) | 187 |