

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Einfluß fünf verschiedener nicht-genotoxischer Karzinogene
auf das Wachstum spontan entstandener präneoplastischer
Herde in der Leber alter Wistar Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
HENDRIKE STEPHAN

Giessen 2001

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**Einfluß fünf verschiedener nicht-genotoxischer Karzinogene
auf das Wachstum spontan entstandener präneoplastischer
Herde in der Leber alter Wistar Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von

HENDRIKE STEPHAN

Tierärztin aus Osterode/Harz (Niedersachsen)

Giessen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2001

INHALTSVERZEICHNIS

| Kapitel | Seite |
|--|-------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 2 LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 2.1 Chemische Karzinogenese | 2 |
| 2.1.1 Initiation | 2 |
| 2.1.2 Promotion | 2 |
| 2.1.3 Progression | 2 |
| 2.2 Charakterisierung chemischer Karzinogene | 3 |
| 2.2.1 Genotoxische Karzinogene | 3 |
| 2.2.2 Nicht-genotoxische Karzinogene | 3 |
| 2.3 Hepatokarzinogenese | 4 |
| 2.3.1 Leber | 4 |
| 2.3.2 Präneoplastische Herde in der Leber: „Foci of altered hepatocytes“ (FAH) | 5 |
| 2.3.2.1 Klassifikation der FAH | 6 |
| 2.3.2.2 Phänotypische Instabilität | 7 |
| 2.3.3.3 Nachweis der FAH | 7 |
| 2.3.3.4 Spontan entstandene FAH | 8 |
| 2.3.3.4.1 FAH-Typen in der alten Ratte | 9 |
| 2.2.3.4.2 GST-P-Expression in spontan entstandenen FAH | 10 |
| 2.3.3.4.3 Zonale Verteilung der spontan entstanden FAH | 10 |
| 2.3.3.5 Wirkung von Promotoren auf FAH | 10 |
| 2.3.3.5.1 Zelluläre Mechanismen der Promotion | 11 |
| 2.3.3.6 Nutzung der FAH für die Vorhersage der potentiell karzinogenen Wirkung einer Substanz | 11 |
| 2.4 Zellproliferation | 12 |
| 2.4.1 Bedeutung der Zellproliferation in der Karzinogenese | 12 |
| 2.4.2 Zellproliferation in der Leber | 13 |
| 2.4.2.1 Zellproliferation im unveränderten Lebergewebe | 13 |
| 2.4.2.1.1 Zonale Unterschiede in der Zellproliferation | 13 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 2.4.2.2 | Zellproliferation in FAH | 14 |
| 2.4.2.3 | Messung der Zellproliferation | 15 |
| 2.4.2.3.1 | Messung der zonalen Zellproliferation in der Leber | 16 |
| 2.4.2.4 | Labelling-Index in der Leber: Kontrollwerte | 17 |
| 2.5 | Apoptose | 18 |
| 2.5.1 | Merkmale der Apoptose | 18 |
| 2.5.2 | Nachweis der Apoptose | 19 |
| 2.5.3 | Apoptose-Index in der Leber: Kontrollwerte | 20 |
| 2.6 | Prüfsubstanzen | 21 |
| 2.6.1 | Phenobarbital | 21 |
| 2.6.1.1 | Allgemeine Wirkung von Phenobarbital auf die Leber | 21 |
| 2.6.1.2 | Hepatokarzinogene Wirkung von Phenobarbital | 21 |
| 2.6.1.2.1 | Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation | 21 |
| 2.6.1.3 | Promovierende Wirkung von Phenobarbital | 22 |
| 2.6.1.3.1 | Hepatokarzinogene Wirkung in Initiations-Promotions-Protokollen | 22 |
| 2.6.1.3.2 | FAH | 22 |
| 2.6.1.3.2.1 | FAH-Typen | 23 |
| 2.6.1.3.3 | Zellproliferation und Apoptose | 23 |
| 2.6.1.3.4 | Mechanismen der Tumorpromotion | 25 |
| 2.6.1.4 | Wirkung von Phenobarbital auf die Leber alter Ratten | 26 |
| 2.6.2 | Chloroform | 27 |
| 2.6.2.1 | Allgemeine Wirkung von Chloroform auf die Leber | 27 |
| 2.6.2.2 | Hepatokarzinogene Wirkung von Chloroform | 28 |
| 2.6.2.2.1 | Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation | 28 |
| 2.6.2.3 | Promovierende Wirkung von Chloroform | 29 |
| 2.6.2.3.1 | FAH und FAH-Typen | 29 |
| 2.6.2.3.2 | Zellproliferation und Apoptose | 29 |
| 2.6.2.3.3 | Mechanismus der Tumorpromotion | 30 |
| 2.6.2.4 | Wirkung von Chloroform auf die Leber alter Ratten | 30 |
| 2.6.3 | Wyeth-14,643 | 31 |
| 2.6.3.1 | Allgemeine Wirkung von Wyeth-14,643 auf die Leber | 31 |
| 2.6.3.2 | Hepatokarzinogene Wirkung von Wyeth-14,643 | 31 |
| 2.6.3.2.1 | Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation | 32 |
| 2.6.3.3 | Promovierende Wirkung von Wyeth-14,632 | 32 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 2.6.3.3.1 | Hepatokarzinogene Wirkung in Initiations-Promotions-Protokollen | 32 |
| 2.6.3.3.2 | FAH | 32 |
| 2.6.3.3.2.1 | FAH-Typen | 33 |
| 2.6.3.3.3 | Zellproliferation und Apoptose | 33 |
| 2.6.3.3.4 | Mechanismus der Tumorpromotion | 34 |
| 2.6.3.4 | Wirkung von Wyeth-14,643 auf die Lebern alter Ratten | 36 |
| 2.6.4 | Ethinylestradiol | 36 |
| 2.6.4.1 | Allgemeine Wirkung von Ethinylestradiol auf die Leber | 36 |
| 2.6.4.2 | Hepatokarzinogene Wirkung von Ethinylestradiol | 37 |
| 2.6.4.2.1 | Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation | 37 |
| 2.6.4.3 | Promovierende Wirkung von Ethinylestradiol | 38 |
| 2.6.4.3.1 | Hepatokarzinogene Wirkung in Initiations-Promotions-Protokollen | 38 |
| 2.6.4.3.2 | FAH | 38 |
| 2.6.4.3.2.1 | FAH-Typen | 38 |
| 2.6.4.3.3 | Zellproliferation und Apoptose | 39 |
| 2.6.4.3.4 | Mechanismus der Tumorpromotion | 40 |
| 2.6.5 | PCB 126 | 40 |
| 2.6.5.1 | Allgemeine Wirkung von PCB 126 auf die Leber | 41 |
| 2.6.5.2 | Hepatokarzinogene Wirkung | 42 |
| 2.6.5.2.1 | Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation | 42 |
| 2.6.5.3 | Promovierende Wirkung von PCB 126 | 42 |
| 2.6.5.3.1 | Hepatokarzinogene Wirkung in Initiations-Promotions-Protokollen | 42 |
| 2.6.5.3.2 | FAH | 42 |
| 2.6.5.3.2.1 | FAH-Typen | 43 |
| 2.6.5.3.3 | Zellproliferation und Apoptose | 43 |
| 2.6.5.3.4 | Mechanismus der Tumorpromotion | 44 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 45 |
| 3.1 | Tiere und Haltungsverhältnisse | 45 |
| 3.2 | Versuchsdurchführung | 45 |
| 3.3 | Histopathologische Präparation | 46 |
| 3.3.1 | Trimmen und Fixierung der Proben | 46 |
| 3.3.2 | Einbettung der Proben | 46 |

| | |
|---|----|
| 3.3.3. Schneiden der Paraffinblöcke | 46 |
| 3.3.4 Färbungen | 46 |
| 3.3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) | 46 |
| 3.3.4.2 Immunhistologischer Nachweis des in die DNA eingebauten BrdUs | 47 |
| 3.3.4.3 Immunhistologischer Nachweis des GST-P | 48 |
| 3.3.4.4 Negativkontrollen | 49 |
| 3.4. Auswertung der Schnitte | 50 |
| 3.4.1 Hilfsmittel zur Auswertung | 50 |
| 3.4.2 „Foci of altered hepatocytes“ (FAH) | 50 |
| 3.4.2.1 Histologische Klassifizierung der FAH | 50 |
| 3.4.2.2 Meßparameter | 50 |
| 3.4.2.3 Zellproliferation in FAH | 51 |
| 3.4.2.4 Apoptose in FAH | 52 |
| 3.4.2.5 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens | 52 |
| 3.4.3 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 52 |
| 3.5 Statistische Auswertung | 53 |
| 3.5.1 FAH und Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 53 |
| 3.5.2 Körpergewichte, absolute und relative Lebergewichte | 54 |
| | |
| 4 ERGEBNISSE | 55 |
| | |
| 4.1 Kontrolle | 56 |
| 4.1.1 Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht | 56 |
| 4.1.2 Makroskopische Befunde | 56 |
| 4.1.3 Histologische Befunde | 56 |
| 4.1.4 FAH | 57 |
| 4.1.4.1 Prozentuale Verteilung der FAH-Typen | 57 |
| 4.1.4.2 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens | 57 |
| 4.1.4.3 Anzahl der FAH pro cm ² Leberfläche | 58 |
| 4.1.4.4 Zellzahl pro FAH-Querschnitt | 59 |
| 4.1.4.5 Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH | 61 |
| 4.1.5 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 63 |
| 4.2 Phenobarbital | 64 |
| 4.2.1 Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht | 64 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.2.2 | Makroskopische Befunde | 64 |
| 4.2.3 | Histologische Befunde | 64 |
| 4.2.4. | FAH | 65 |
| 4.2.4.1 | Prozentuale Verteilung der FAH-Typen | 65 |
| 4.2.4.2 | Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens | 65 |
| 4.2.4.3 | Anzahl der FAH pro cm ² Leberfläche | 66 |
| 4.2.4.4 | Zellzahl pro FAH-Querschnitt | 67 |
| 4.2.4.5 | Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH | 68 |
| 4.2.5 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 69 |
| 4.3 | Chloroform | 70 |
| 4.3.1 | Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht | 70 |
| 4.3.2 | Makroskopische Befunde | 71 |
| 4.3.3 | Histologische Befunde | 71 |
| 4.3.4. | FAH | 71 |
| 4.3.4.1 | Prozentuale Verteilung der FAH-Typen | 71 |
| 4.3.4.2 | Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens | 72 |
| 4.3.4.3 | Anzahl der FAH pro cm ² Leberfläche | 73 |
| 4.3.4.4 | Zellzahl pro FAH-Querschnitt | 73 |
| 4.3.4.5 | Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH | 74 |
| 4.3.5 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 75 |
| 4.4 | Wyeth-14,643 | 76 |
| 4.4.1 | Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht | 76 |
| 4.4.2 | Makroskopische Befunde | 76 |
| 4.4.3 | Histologische Befunde | 76 |
| 4.4.4. | FAH | 77 |
| 4.4.4.1 | Prozentuale Verteilung der FAH-Typen | 77 |
| 4.4.4.2 | Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens | 78 |
| 4.4.4.3 | Anzahl der FAH pro cm ² Leberfläche | 79 |
| 4.4.4.4 | Zellzahl pro FAH-Querschnitt | 80 |
| 4.4.4.5 | Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH | 81 |
| 4.4.5 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 83 |
| 4.5 | Ethinylestradiol | 84 |
| 4.5.1 | Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht | 84 |
| 4.5.2 | Makroskopische Befunde | 84 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| 4.5.3 | Histologische Befunde | 84 |
| 4.5.4. | FAH | 85 |
| 4.5.4.1 | Prozentuale Verteilung der FAH-Typen | 85 |
| 4.5.4.2 | Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens | 86 |
| 4.5.4.3 | Anzahl der FAH pro cm ² Leberfläche | 87 |
| 4.5.4.4 | Zellzahl pro FAH-Querschnitt | 88 |
| 4.5.4.5 | Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH | 89 |
| 4.5.5 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 90 |
| 4.6 | PCB 126 | 91 |
| 4.6.1 | Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht | 91 |
| 4.6.2 | Makroskopische Befunde | 91 |
| 4.6.3 | Histologische Befunde | 92 |
| 4.6.4. | FAH | 92 |
| 4.6.4.1 | Prozentuale Verteilung der FAH-Typen | 92 |
| 4.6.4.2 | Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens | 93 |
| 4.6.4.3 | Anzahl der FAH pro cm ² Leberfläche | 94 |
| 4.6.4.4 | Zellzahl pro FAH-Querschnitt | 95 |
| 4.6.4.5 | Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH | 96 |
| 4.6.5 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 97 |
| 5 | DISKUSSION | 98 |
| 5.1 | Material und Methoden | 98 |
| 5.1.1 | Versuchsmodell | 98 |
| 5.1.2 | Untersuchung der promovierenden Eigenschaften der Prüfsubstanzen | 99 |
| 5.1.2.1 | Untersuchung des Wachstumsverhaltens der FAH | 99 |
| 5.1.2.1.1 | Nachweis der FAH | 99 |
| 5.1.2.1.2 | Klassifizierung der FAH | 100 |
| 5.1.2.1.3. | Wahl der Meßparameter | 100 |
| 5.1.2.1.3.1 | Größe und Anzahl der FAH | 101 |
| 5.1.2.1.3.2 | Messung der Zellproliferation | 101 |
| 5.1.2.1.3.3 | Wahl des Markers und dessen Applikation | 101 |
| 5.1.2.1.3.4 | Apoptose | 102 |
| 5.1.2.2 | Messung der extrafokalen Zellproliferation | 103 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 5.2 | Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit Literaturangaben | 105 |
| 5.2.1 | Kontrolltiere | 105 |
| 5.2.1.1 | FAH | 105 |
| 5.2.1.2 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 110 |
| 5.2.1.3 | Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten | 111 |
| 5.3 | Phenobarbital | 112 |
| 5.3.1 | Allgemeine Wirkung auf die Leber | 112 |
| 5.3.2 | FAH | 112 |
| 5.3.3 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 117 |
| 5.3.4 | Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten | 119 |
| 5.4 | Chloroform | 119 |
| 5.4.1 | Allgemeine Wirkung auf die Leber | 119 |
| 5.4.2 | FAH | 120 |
| 5.4.3 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 121 |
| 5.4.4 | Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten | 122 |
| 5.5 | Wyeth-14,643 | 122 |
| 5.5.1 | Allgemeine Wirkung auf die Leber | 122 |
| 5.5.2 | FAH | 123 |
| 5.5.3 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 126 |
| 5.5.4 | Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten | 127 |
| 5.6 | Ethinylestradiol | 127 |
| 5.6.1 | Allgemeine Wirkung auf die Leber | 127 |
| 5.6.2 | FAH | 128 |
| 5.6.3 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 131 |
| 5.6.4 | Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten | 132 |
| 5.7 | PCB 126 | 132 |
| 5.7.1 | Allgemeine Wirkung auf die Leber | 132 |
| 5.7.2 | FAH | 133 |
| 5.7.3 | Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe | 134 |
| 5.7.4 | Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten | 135 |
| 5.8 | Versuchsmodell | 135 |
| 5.9 | Vergleich der fünf Promotoren | 138 |
| 5.10 | Zonale Proliferationsmuster und der Einfluß der extrafokalen Proliferation auf die Promotion der FAH | 143 |

| | | |
|------|--------------------------------|-----|
| 5.11 | Bedeutung der GST-P-Expression | 144 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 146 |
| 7 | SUMMARY | 148 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 150 |
| 9 | ANHANG | 175 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------------|---|
| AAF | 2-Acetylaminofluoren |
| Abb. | Abbildung |
| AI | Apoptose-Index |
| AK | Apoptotische Körperchen |
| Ah-Rezeptor | Arylhydrocarbon-Rezeptor |
| APTS | 3-Aminopropyltriethoxysilan |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCF | basophilic cell focus |
| BCF-NOS | basophilic cell focus - not otherwise specified |
| BrdU | 5`-Bromo-2-desoxyuridin |
| CCF | clear cell focus |
| CHL | Chloroform |
| DEN | Diethylnitrosamin |
| DEHP | Di(2ethylhexyl)phthalat |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| ECF | eosinophilic cell focus |
| EGF | epidermal growth factor |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| et al. | et alteri |
| F344 | Fischer 344 |
| FAH | foci of altered hepatocytes |
| GGT | Gamma-Glutamyltranspeptidase |
| GST-P | Glutathion-S-Transferase (plazentare Form) |
| HE | Hämatoxylin und Eosin |
| HGF | hepatocyte growth factor |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| LAB | labelled avidin-biotin-technique |
| LI | Labelling-Index |
| LI _{GES} | Gesamt-Labelling-Index |
| LI _{Z1/Z2/Z3} | Labelling-Index in Zone 1/Zone 2/Zone 3 |

| | |
|---------------------|---|
| LZM | lobule dependent zonal measurement |
| m | männlich |
| MCF | mixed cell focus |
| M6P/IGF II | mannose 6-phosphohate/insulin-like growth factor-II |
| Mo | Monat |
| NAH | im HE-Schnitt nicht abgrenzbare Herde |
| NNM | N-Nitrosomorpholin |
| PB | Phenobarbital |
| PCB | polychlorierte Biphenyle |
| PCB 126 | 3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl |
| PCNA | Proliferating Cell Nuclear Antigen |
| ppm | parts per million |
| ppb | parts per billion |
| PPAR α | peroxisome proliferator activated receptor α |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| SD | Standardabweichung |
| SF | Streufaktor |
| SPF | spezifisch pathogenfrei |
| Tab. | Tabelle |
| TCDD | 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin |
| TGF- α/β | transforming growth factor α/β |
| TGF- β -LAP | transforming growth factor- β latent-associated protein |
| TNF α | tumor necrosis factor α |
| TUNEL | terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling |
| TW | Trinkwasser |
| w | weiblich |
| Wo | Wochen |
| Wyeth-14,643 | [4-chloro-(2,3-xylidino)2-pyrimidinylthio]acetic acid |

1 EINLEITUNG

Chemische Karzinogene können ihre Wirkung über verschiedene Mechanismen entfalten. Nicht-genotoxische Karzinogene agieren häufig als Promotoren, d. h. sie fördern das selektive Wachstum initiiertes, präneoplastischer Zellen. In der Nager-Leber resultiert die Promotion initiiertes Hepatozyten in der Entstehung phänotypisch und genotypisch veränderter Herde, sogenannter „foci of altered hepatocytes“ (FAH). FAH gelten als Tumorstufen.

In der biomedizinischen Forschung dient die Entstehung von FAH in Initiations-Promotions-Protokollen als Indikator für die promovierende Eigenschaft einer Substanz. FAH können aber auch spontan entstehen. In der Leber unbehandelter Ratten finden sich FAH, deren Häufigkeit, Anzahl und Größe mit fortschreitendem Alter ansteigt. In dieser Studie wurde die Auswirkung einer 1-, 4- und 13-wöchigen Applikation fünf nicht-genotoxischer Karzinogene ohne vorherige Initiation auf das Wachstum von FAH in der Leber ca. 2 Jahre alter Wistar Ratten, die sich durch eine große Anzahl spontan entstandener FAH auszeichnen, untersucht. Die verwendeten Substanzen sind als Lebertumor-Promotoren bekannt: Phenobarbital, Chloroform, Wyeth-14,643, Ethinylestradiol und PCB 126. Festzustellen war, ob die promovierende Wirkung der Substanzen auch in diesem Testsystem deutlich wird. Dazu wurde neben der Ermittlung von Größe und Anzahl der FAH das Zellproliferations- und Apoptoseverhalten analysiert.

Zellproliferation nimmt vermutlich eine Schlüsselrolle in der chemischen Karzinogenese ein. Daher wurde weiterhin der Einfluß der extrafokalen Proliferation auf die Promotion untersucht.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Chemische Karzinogenese

Die Karzinogenese ist ein komplexer Prozeß, der nach dem Mehrstufenkonzept in die Stadien Initiation, Promotion und Progression unterteilt wird.

2.1.1 Initiation

Initiation ist charakterisiert durch eine irreversible Schädigung des genetischen Materials einer Zelle, die der Zelle und ihren Tochterzellen das Potential zur malignen Transformation verleiht (SCHULTE-HERMANN, 1985). Ursächlich für den Schaden können neben anderen Ursachen z. B. während der DNA-Replikation einwirkende genotoxische Chemikalien, radioaktive Strahlen, UV-Strahlen oder Spontanmutationen sein. Betroffen von der Schädigung sind an der Wachstumskontrolle beteiligte Gene (Protooncogene oder Tumorsuppressorgene) (BUTTERWORTH et al., 1992). Werden solche Läsionen nicht von zelleigenen DNA-Reparatursystemen behoben, wird der Schaden bei der nächsten Zellteilung als Mutation fixiert (COHEN und ELLWEIN, 1991; POPP und MARSMAN, 1991).

2.1.2 Promotion

Promotion ist definiert als Selektion und klonale Expansion initiiertter Zellen durch eine chemische Substanz oder andere Faktoren (SCHULTE-HERMANN, 1985). Der Promotionsprozess erfordert die kontinuierliche Anwesenheit des promovierenden Stimulus über einen längeren Zeitraum und gilt - zumindest in der frühen Phase - als reversibel (SCHULTE-HERMANN et al., 1982; HENDRICH et al., 1986).

2.1.3 Progression

Das Stadium der Progression ist gekennzeichnet durch weitere irreversible genetische Veränderungen, durch die es zum Verlust der Wachstumskontrolle und damit zur Entstehung maligner Tumoren kommt. Merkmale der Progression sind biochemische und morphologische Veränderungen, kariotypische Instabilität, invasives Wachstum und Metastasenbildung (PITOT et al., 1981; PITOT, 1989; BUTTERWORTH et al., 1992).

Initiation und Promotion sind experimentell in Initiations-Promotions-Studien in verschiedenen Organen und Geweben, u. a. Haut (BERENBLUM und SHUBIK, 1947), Pankreas (ROEBUCK et al., 1981), Colon (REDDY et al., 1975), Mamma (CARROLL, 1980) und

Leber (PITOT und SIRICA, 1980) demonstriert worden. In Initiations-Promotions-Studien wird nach der Verabreichung einer initiiierend wirkenden Substanz eine promovierend wirkende Substanz über einen längeren Zeitraum appliziert. Diese Studien dienen der Aufdeckung einer potentiell karzinogenen Wirkung einer Substanz und machen eine Unterscheidung zwischen Promotoren und Initiatoren möglich. Die zu testende Substanz wird entweder als Promotor oder Initiator eingesetzt und mit einem bekannten Initiator bzw. Promotor kombiniert.

2.2 Charakterisierung chemischer Karzinogene

Alle drei Stadien der Karzinogenese können durch chemische Karzinogene beeinflusst werden. Karzinogene können ihre Wirkung durch genotoxische oder nicht-genotoxische Mechanismen entfalten.

2.2.1 Genotoxische Karzinogene

Genotoxische Karzinogene oder ihre Metabolite interagieren direkt mit der DNA und induzieren dort Mutationen oder chromosomale Veränderungen (Punktmutationen, Insertionen, Deletionen oder Veränderung in der Chromosomenstruktur- und -zahl) (BUTTERWORTH, 1990). Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß Substanzen mit genotoxischer Aktivität karzinogene Wirkung entfalten (TENNANT et al., 1987). Genotoxische Karzinogene, die die Zellteilungsrate erhöhen (regenerative Zellproliferation nach zytotoxischer Wirkung oder mitogene Wirkung), sind besonders effektive Karzinogene (PITOT und SIRICA, 1980; BUTTERWORTH et al., 1995). Initiatoren sind generell DNA-reaktiv, und eine einmalige Exposition reicht aus, initiierte Zellen zu erzeugen (BUTTERWORTH, 1990).

2.2.2 Nicht-genotoxische Karzinogene

Nicht-genotoxische Karzinogene führen ohne direkte Schädigung der DNA nach Langzeitanwendung zur Entstehung von Tumoren. Ein häufig beobachteter Wirkmechanismus ist die Steigerung der Zellproliferation, die sekundär durch die Erhöhung des Auftretens spontaner Mutationen zu Veränderungen am Genom führen kann (BUTTERWORTH, 1990; COHEN und ELL-WEIN, 1990, 1991).

BUTTERWORTH (1990) nimmt eine weitere Unterteilung der nicht-genotoxischen Karzinogene in mitogen und zytotoxisch wirkende nicht-genotoxische Karzinogene vor. Mitogene steigern die Zellproliferation direkt, zytotoxische Karzinogene verursachen im Zielorgan einen vermehrten Zelluntergang mit nachfolgender regenerativer Zellproliferation.

Die karzinogene Wirkung nicht-genotoxischer Karzinogene kann weiterhin mit der Hemmung der Apoptose in initiierten Zellen assoziiert sein, wodurch sich deren Überlebenszeit verlängert (BURSCH et al., 1984; ROBERTS et al., 1995).

Es besteht eine enge Beziehung zwischen nicht-genotoxischen Karzinogenen und Tumorpromotoren. Nahezu alle Mitglieder beider Gruppen haben die Eigenschaft, in ihrem Erfolgsorgan Wachstumsvorgänge auszulösen oder zu beschleunigen. Alle bisher bekannten Tumorpromotoren können auch bei alleiniger Gabe kanzerogen wirken. Dabei können die Promotoren auf spontan initiierte Zellen wirken oder auch selbst durch Steigerung der Zellproliferation sekundär Schäden an der DNA verursachen. Weiterhin sind in Initiations-Promotions-Protokollen getestete nicht-genotoxische Karzinogene in der Regel als Tumorpromotoren anerkannt worden (SCHULTE-HERMANN et al., 1994).

Nach HILDEBRAND et al. (1991) sollten die Begriffe „nicht-genotoxisches Karzinogen“ und „Tumorpromotor“ aber nicht gleichgesetzt werden. Die Autoren schlugen vor, den Begriff „Tumorpromotor“ nur für Substanzen anzuwenden, nach deren Applikation in Initiations-Promotions-Modellen Tumoren entstehen. Eine Substanz sollte nur dann als „nicht-genotoxisches Karzinogen“ bezeichnet werden, wenn sie sich im Ames-Test als negativ erwiesen hat, aber die zweijährige alleinige Verabreichung in der Entstehung maligner Tumoren resultiert.

2.3 Hepatokarzinogenese

2.3.1 Leber

Die Leber übernimmt neben ihren vielfältigen Aufgaben im Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel auch die Metabolisierung vieler Fremdstoffe. Toxische Substanzen werden entgiftet, andererseits können inaktive Substanzen auch in toxische Metabolite umgewandelt werden. Die Leber stellt somit auch ein Zielorgan für viele chemische Karzinogene dar. Von den vom National Cancer Institute und National Toxicology Program bis 1987 an der Maus getesteten 299 Substanzen erwiesen sich 57 %, von den 354 an der Ratte getesteten Substanzen 40 % als hepatokarzinogen (GOLD et al., 1991).

Die kleinste morphologische Einheit der Leber ist das Leberläppchen, das eine polygonale Form aufweist. Die Ecken des Polygons werden von den Portalfeldern gebildet, die aus Ästen der Vena portae, Ästen der A. hepatica und Gallengängen bestehen. Die Leberzellbälkchen und die dazwischen liegenden Sinusoide verlaufen radiär von der Peripherie des Leberläpp-

chens bis zur im Zentrum liegenden Zentralvene. Als kleinste funktionelle Einheit gilt der Azinus, der Bereich, der sich beidseits der interlobulären Grenzfläche von einem Portalfeld ausgehend bis zu den beiden angrenzenden Zentralvenen erstreckt. Der Gehalt des Blutes an Sauerstoff, Substraten und Hormonen verringert sich mit dem Blutfluß vom Portalfeld bis zur Zentralvene. Nach dem Konzept von RAPPAPORT et al. (1954) können anhand des abnehmenden O₂-Partialdruckes im Azinus drei Zonen unterschieden werden: Zone 1 liegt nahe des Portalfeldes, Zone 3 nahe der Zentralvene, reicht aber umschrieben auch bis in die morphologische Läppchenperipherie. Der dazwischen liegende Bereich wird als Zone 2 bezeichnet. Die zonalen Unterschiede der Hepatozyten spiegeln sich auch in Anzahl und Größe der Zellorganellen, der enzymatischen Ausstattung und folglich auch der metabolischen Kapazität der Hepatozyten wieder (JUNGERMANN und KATZ, 1989).

2.3.2 Präneoplastische Herde in der Leber: „Foci of altered hepatocytes“ (FAH)

Das Mehrstufenkonzept der Karzinogenese findet auch in der Leber Anwendung. Durch die Promotion initiiierter Einzelzellen entstehen Herde phäno- und genotypisch veränderter Hepatozyten, sogenannte „Foci of altered hepatocytes“ (FAH). Obwohl FAH kein autonomes Wachstum zeigen (WILLIAMS, 1976) und sich die meisten induzierten FAH nicht zu Neoplasien entwickeln (PITOT und SIRICA, 1980; WILLIAMS, 1982), gelten sie als präneoplastische Herde (BANNASCH et al., 1989), da sie

1. in vielen morphologischen und metabolischen Eigenschaften Ähnlichkeiten zu hepatozellulären Tumoren aufweisen,
2. bei der Induktion von hepatozellulären Tumoren (z. B. durch Chemikalien, Strahlen oder Viren) immer vor deren Entstehung erscheinen (FARBER und SARMA, 1987),
3. nach Beendigung der Behandlung mit einem chemischen Karzinogen persistieren können,
4. eine höhere Zellproliferationsrate aufweisen als das Umgebungsgewebe (SCHULTEHERMANN et al., 1983 a),
5. direkte morphologische Übergänge zu hepatozellulären Adenomen oder Karzinomen aufweisen können (DRAGAN et al., 1995),
6. eine statistische Korrelation zwischen dem durch sie eingenommenen Volumenanteil der Leber und dem Auftreten hepatozellulärer Tumoren zeigen (ZERBAN et al., 1988).

2.3.2.1 Klassifikation der FAH

Nach der internationalen Klassifikation (MOHR, 1997) weisen FAH folgende Merkmale auf: FAH besitzen meist eine runde oder ovoide Form. Sie sind oftmals vom Umgebungsgewebe nur durch tinktorielle Abweichungen des Zytoplasmas in der HE-Färbung zu unterscheiden, da die Architektur der Leberzellbalken innerhalb des Focus erhalten ist und das Umgebungsgewebe nicht oder nur geringgradig komprimiert wird. Die Größe kann von wenigen Zellen bis zu mehreren Leberläppchen variieren. Anhand ihrer phänotypischen Unterschiede kann folgende Einteilung in verschiedenen FAH-Typen vorgenommen werden:

Tab. 1: FAH-Typen

| FAH –Typ | Morphologie der Zellen | | | Ultrastruktur |
|----------------------|---|--|--|--|
| | Größe | Zytoplasma | Kern | |
| Klarzelliger Focus | normal oder vergrößert | klar | oft klein und dunkel, manchmal auch vergrößert | Glykogenspeicherung +++ |
| Eosinophiler FAH | meist vergrößert | fein granuliert eosinophil („ground-glass“) | vergrößert, Nucleolus deutlich und zentral lokalisiert | Glykogen ++, glattes ER vermehrt |
| Basophiler FAH | diffus: normal oder leicht vergrößert | homogen basophil | pleomorph mit vergrößerten und deutlichen Nucleoli | Ribosomen +++ |
| | tigroid: meist klein, vergrößerte Zellen können auftreten | enthält basophile Körperchen, die paranukleär oder in peripheren Regionen Klumpen oder Bänder formen | hyperchromatisch | rauhes Endoplasmatisches Retikulum +++ |
| Gemischtzelliger FAH | Kombination von basophilen und klarzelligen oder eosinophilen Hepatozyten | | | |
| Amphophiler FAH | vergrößert | gleichmäßig granuliertes eosinophiles Zytoplasma mit schwacher Basophilie | leicht vergrößert | glykogenarm bzw. -frei |

FAH = Focus of altered hepatocytes; ER = endoplasmatisches Retikulum, + bis +++ = geringe bis starke Ausprägung

BANNASCH und ZERBAN (1994) unterscheiden weiterhin den intermediären FAH, dessen Zellen mit klaren, eosinophilen und basophilen Anteilen gemischte färberische Merkmale des Zytoplasmas aufweisen, sowie den vakuolisierten FAH. STRÖBEL et al. (1998) klassifizieren

zusätzlich den xenomorphen FAH mit vergrößerten Zellen, die reichlich Glykogen sowie glattes und rauhes Endoplasmatisches Retikulum enthalten.

2.3.2.2 Phänotypische Instabilität

Die Signifikanz der verschiedenen Phänotypen wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren vertreten die Ansicht, die verschiedenen Phänotypen stellen im Rahmen der „Progressiven Phänotypischen Instabilität“ verschiedene Stadien einer Folge von morphologischen und metabolischen Veränderungen dar (BANNASCH, 1968; ENZMANN und BANNASCH, 1987; MOORE et al. 1982; WEBER und BANNASCH, 1994). Diese Folge erstreckt sich von den zuerst erscheinenden glykogenreichen klarzelligen und eosinophilen FAH über die gemischtzelligen FAH zu den glykogenarmen basophilen FAH. Die basophilen FAH werden als Vorläufer von hepatozellulären Karzinomen angesehen. Versuche mit dem genotoxischen Karzinogen N-Nitrosomorpholin, das auch Promotorwirkung besitzt, haben gezeigt, daß die zelluläre Zusammensetzung der FAH von der Dauer der Verabreichung und vom Untersuchungszeitpunkt abhängig ist (ENZMANN und BANNASCH, 1987). Der morphologische Wandel geht mit biochemischen Veränderungen einher (HACKER et al., 1982). Dagegen gehen GOLDSWORTHY und PITOT (1985) sowie PERAINO et al. (1984) von der Stabilität histochemischer Phänotypen aus.

FAH können sich im Rahmen der „Phänotypischen Reversion“, insbesondere nach Absetzen des promovierenden Stimulus, wieder zurückbilden (SCHULTE-HERMANN et al., 1982; 1983 a; MOORE et al., 1983 a). Es wird vermutet, daß die FAH, die sich nach Beendigung der Promotorbehandlung nicht zurückbilden, das größte Potential zur Tumorentwicklung besitzen (GLAUERT et al., 1986 b).

2.3.3.3 Nachweis der FAH

Neben den histologisch erkennbaren Veränderungen macht man sich vom unveränderten Lebergewebe abweichende Enzymaktivitäten der FAH zum Nachweis zu Nutze. Man unterscheidet positive Marker, die eine erhöhte Aktivität zeigen, von negativen Markern mit einer herabgesetzten Aktivität. Beispiele für positive Marker sind Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (HACKER et al. 1982), Pyridine-Diphosphat-Glucuronyltransferase (FISCHER et al., 1983), γ -Glutamyltranspeptidase und Glutathione-S-transferase (plazentare Form; GST-P) (SATO et al., 1984). Als negative Marker können Glucose-6-Phosphatase, Adenosin-Triphosphatase (SCHERER, 1984), Glykogen-Phosphorylase (HACKER et al.

1982), L-Pyruvatkinase (REINACHER et al., 1986; FISCHER et al., 1987) und Adenylat-Cyclase (EHEMANN et al., 1986) genutzt werden.

Es ist kein Marker bekannt, durch den sich alle FAH nachweisen lassen. Das größte Spektrum an FAH soll im Vergleich zu anderen Markern bei der Verwendung von GST-P erfaßt werden. (HENDRICH et al., 1987; TATEMATSU et al., 1987, 1988). Der größte Anteil von 58 nicht-genotoxischen Chemikalien mit bekanntem karzinogenen Potential hätte nach Initiation und achtwöchiger Verabreichung durch die Entstehung GST-P-positiver FAH als Karzinogen eingestuft werden können. Ausnahmen waren die Peroxisomenproliferatoren Clofibrate und DEHP (ITO et al., 1992). Vorzugsweise sollte immer eine Kombination von histologischer Beurteilung (HE-Färbung) und der Verwendung von Markern erfolgen, da FAH zwar abweichende Enzymaktivitäten aufweisen können, im HE-Schnitt aber eventuell nicht erkennbar sind und umgekehrt (BANNASCH et al., 1989; ENZMANN et al., 1989).

2.3.3.4 Spontan entstandene FAH

Auch in der Leber unbehandelter Ratten finden sich FAH, deren Prävalenz, Anzahl pro Leber und Größe mit fortschreitendem Alter ansteigt.

Tab. 2: FAH-Prävalenz und Anzahl/cm²

| Rattenstamm (Geschlecht) | Alter | Prävalenz (%) | Anzahl/cm ² | Anmerkung | Referenz |
|--------------------------|-------------------------|---------------|------------------------|---|--------------------------------|
| F344 (m) | 6 Monate | 50 | 0,4 | | HARADA et al., 1989 |
| | 12 Monate | 83,3 | 3,3 | | |
| | 15 Monate | 100 | 3,8 | | |
| | 24 Monate | 100 | 13,9 | | |
| F344 (w) | 6 Monate | 53,8 | 0,7 | | HARADA et al., 1989 |
| | 12 Monate | 84,6 | 3,3 | | |
| | 15 Monate | 94 | 5,9 | | |
| | 24 Monate | 100 | 15,7 | | |
| F344 (m/w) | 24 Monate | 10-100 | | | WARD, 1981 |
| Wistar (w) | 24 Monate | 100 | | | SCHULTE-HERMANN et al., 1983 a |
| Wistar (m) | 12 Wochen | | 0 | GGT-positiv | OGAWA et al., 1981 |
| | 48 Wochen | | 0,62 | | |
| | 105 Wochen | | 2,52 | | |
| F344 (m) | 24 Wochen | | 0,03 | GGT-positiv | OGAWA et al., 1981 |
| | 72 Wochen | | 1,6 | | |
| F344/NCr (w) | 78 Wochen 102 Wochen | | 1,31 5,69 | GST-P-positiv, einschließlich GST-P-pos. Einzelzellen | WARD und HENNE-MANN, 1990 |

F344 = Fischer 344 Ratten; GGT = γ -Glutamyltranspeptidase; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); m = männlich; w = weiblich

Fortsetzung Tab. 2: FAH-Prävalenz und Anzahl/cm²

| Rattenstamm (Geschlecht) | Alter | Prävalenz (%) | Anzahl/cm ² | Anmerkung | Referenz |
|--------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|--|--------------------------|
| F344/DuCrj (m) | 18 Monate 23 Monate | | 7,68 0,07 11,64 1,09 | GST-P-positiv GST-P-negativ GST-P-positiv GST-P-negativ | MITAKA und TSUKADA, 1987 |
| F344/DuCrj (w) | 18 Monate 23 Monate | | 1,01 3,16 1,09 7,43 | GST-P-positiv GST-P-negativ GST-P-positiv GST-P-negativ | MITAKA und TSUKADA, 1987 |
| Sprague-Dawley (m) | 50 Wochen 80 Wochen | | 7,37 8,33 | | WEBER und BANNASCH, 1994 |
| Sprague-Dawley (m) | ca. 90 Wochen | | 17,32 | | STRÖBEL et al., 1998 |

F344 = Fischer 344 Ratten; GGT = γ -Glutamyltranspeptidase; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); m = männlich; w = weiblich

Die Ursache für die spontane Entwicklung von FAH in der Rattenleber ist nicht geklärt. Vermutet wird eine Kontamination des Futters oder der Umwelt mit geringen Mengen an Karzinogenen sowie eine genetische Disposition bestimmter Rattenstämme (BUREK, 1978; WARD, 1981).

2.3.3.4.1 FAH-Typen in der alten Ratte

Die in der Leber alter Ratten spontan entstandenen FAH sollen hinsichtlich morphologischer und biochemischer Eigenschaften den in jungen Ratten durch Applikation eines Hepatokarzinogens erzeugten FAH ähneln (SCHULTE-HERMANN et al., 1983 b). Es sind alle FAH-Typen vertreten, wobei die prozentuale Verteilung in verschiedenen Studien variiert und von Geschlecht und Rattenstamm abhängig ist. Bei der Untersuchung von 2700 männlichen und weiblichen Fischer 344 Ratten (WARD, 1981) sowie in Studien von POPP et al. (1985) an CDF (F344)/CrIBR Ratten und SCHULTE-HERMANN et al. (1983 a) an weiblichen Han-Wistar Ratten war der basophile FAH der am häufigsten nachgewiesene Typ. Geschlechtsunterschiede wurden bei F344 Ratten (HARADA et al., 1989: Studie des National Toxicology Program) und F344/DuCrj Ratten (MITAKA und TSUKADA, 1987) beobachtet: Bei weiblichen Ratten waren die meisten FAH basophil, hingegen dominierten bei männlichen F344 Ratten die basophilen und klarzelligen FAH, bei männlichen F344/DuCrj Ratten die klarzelligen und eosinophilen FAH. KRAUPP-GRASL et al. (1991) berichteten ebenfalls vom Überwiegen der klarzelligen und eosinophilen FAH bei 26 Monaten alten männlichen Wistar Ratten. Bei männlichen Sprague Dawley Ratten sind klarzellige FAH und klarzell/eosinophil-gemischte FAH am stärksten vertreten (WEBER und BANNASCH, 1994).

2.2.3.4.2 GST-P-Expression in spontan entstandenen FAH

MITAKA und TSUKADA (1987) beschrieben bei F344/DuCrj Ratten geschlechtsabhängige Unterschiede in der GST-P-Expression spontan entstandener FAH: Mehr als 90 % der FAH in männlichen Tieren, weniger als 20 % der FAH in weiblichen Tieren zeigten eine GST-P-Expression. In einer Studie von WARD und HENNEMANN (1990) erwiesen sich nur 5,7 % der bei weiblichen F344/NCr Ratten spontan entstandenen basophilen FAH als GST-P-positiv.

2.3.3.4.3 Zonale Verteilung der spontan entstanden FAH

HARADA et al. (1989) konnten für spontan entstandene FAH in alten F344 Ratten keine Hauptlokalisationszone feststellen. In Studien von WARD (1981), WARD und HENNEMANN (1990) und WARD und OHSHIMA (1985) dagegen lag der prozentual höchste Anteil der FAH in periportalen Bereichen.

2.3.3.5 Wirkung von Promotoren auf FAH

Während der Applikation eines Promotors kommt es zur Expansion initiiertter Zellen und deren Nachkommen und damit zu einer Erhöhung der Anzahl und/oder der durchschnittlichen Größe der FAH (SCHULTE-HERMANN et al., 1982; SCHULTE-HERMANN et al., 1983 b; YAGER et al., 1984). Die Erhöhung der Anzahl mit einer bestimmten Methode erkennbarer FAH kann auch durch die Induktion von phänotypischen Veränderungen in bereits „latent“ vorliegenden FAH bedingt sein. Die FAH werden erst durch die Promotorwirkung nachweisbar. Weiterhin steigt während der Verabreichung des Promotors der prozentuale Anteil an FAH mit mehreren Abweichungen vom normalen Phänotyp an (SCHULTE-HERMANN et al., 1982). Verschiedene Versuchsprotokolle haben eine Korrelation zwischen Anzahl und/oder Größe der FAH sowie Dosis und Dauer der Karzinogenbehandlung aufgezeigt (BANNASCH et al., 1986).

Der veränderte Phänotyp bietet FAH einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber unveränderten Hepatozyten während der Applikation eines Promotors. In der normalen Leber und auch in FAH induzieren nicht-hepatotoxische Promotoren adaptive Reaktionen wie die Synthese bestimmter Proteine, Bildung von Zellorganellen und Organwachstum einschließlich Steigerung der Zellteilungsrate und Inhibition der Apoptose (SCHULTE-HERMANN, 1985). Nach der „over response hypothesis“ kommt es aufgrund regulatorischer Defekte der Wachstumskontrolle zu einer überproportionalen Antwort der Hepatozyten in FAH auf Promotoren (SCHULTE-HERMANN et al., 1986). Hepatotoxische Tumorpromotoren dagegen inhibieren

die Zellproliferation in normalen Hepatozyten, während die initiierten Hepatozyten und ihre Tochterzellen resistent gegenüber diesem Effekt sind (“resistant cell hypothesis”) (SOLT und FARBER, 1976). Diese Resistenz resultiert aus einer verstärkten Expression detoxifizierender Systeme innerhalb der initiierten Zellen (OKITA et al., 1976).

2.3.3.5.1 Zelluläre Mechanismen der Promotion

Es sind eine Reihe zellulärer Mechanismen bekannt, über die Promotoren ihre Wirkung ausüben können. Verschiedene Substanzen hemmen die interzelluläre Kommunikation (BAGER et al., 1994, 1997; REN und RUCH, 1996), die u.a. eine Kontrollfunktion in der Gewebshomöostase innehat (YAMASAKI et al., 1991). Die Inhibition der interzellulären Kommunikation korreliert mit einer ansteigenden DNA-Synthese (TROSKO und GOODMAN, 1994). Weiterhin können primär nicht-genotoxische Karzinogene in der Zelle oxidativen Stress, d. h. eine Imbalance im Auf- und Abbau oxidativ wirkender Substanzen, verursachen. Oxidative Radikale können sekundär die DNA schädigen (STEVENSON et al., 1995). Ein weiterer Mechanismus besteht in der Modulation der Expression und Wirkung von Faktoren, die das Wachstum einer Zelle regulieren wie Wachstumsfaktoren (EGF, HGF, $TNF\alpha$, $TGF\alpha$, $TGF\beta$), Onkogene und Tumorsuppressorgene.

2.3.3.6 Nutzung der FAH für die Vorhersage der potentiell karzinogenen Wirkung einer Substanz

Eine signifikante Vermehrung der FAH in der Leber behandelte Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe läßt auf das karzinogene Potential einer Substanz schließen. Die Unterscheidung zwischen persistierenden und reversiblen FAH kann jedoch nur in einem Stop-Experiment erfolgen, in dem weitere Untersuchungen auch nach der Beendigung der Applikation durchgeführt werden (BANNASCH, 1986). OGISO et al. (1985) und ITO et al. (1989) konnten zeigen, daß der Grad der Induktion GST-P-positiver Foci in einem Versuchsprotokoll mit achtwöchiger Verabreichung verschiedener Karzinogene nach Initiation und partieller Hepatektomie mit der Prävalenz hepatozellulärer Karzinome im Langzeit-Versuch korreliert.

Weiterhin werden FAH als Beurteilungskriterium in Initiations-Promotions-Studien genutzt, um die initiiierende oder promovierende Wirkung der zu testenden Substanzen aufzudecken (SCHULTE-HERMANN, 1985).

2.4 Zellproliferation

Die ca. eine Stunde dauernde Mitosephase (M-Phase), in der aus der Ursprungszelle zwei Tochterzellen entstehen, stellt nur eine der verschiedenen Phasen des Zellzyklus dar. An sie schließt sich die G1-Phase an. Bis zu einem bestimmten Zeitpunkt in dieser Phase kann die Zelle in die G0-Phase, die Ruhephase, übertreten, ansonsten erfolgt die Synthese von Proteinen, Membranlipiden, Sacchariden und Bausteinen für die Nucleinbiosynthese. In der darauf folgenden Synthese (S)-Phase, deren Dauer zwischen sechs und acht Stunden liegt, repliziert sich die genomische DNA. In der prämitotischen Ruhephase (G2-Phase) erfolgt eine weitere RNA- und Proteinsynthese (HENKES et al., 1993; SCHRÖDER und DIENER, 2000).

Die Zellteilungsrate eines Gewebes zeigt tierart-, stamm- und geschlechtsspezifische Unterschiede. Beim Einzeltier wird sie durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So zeigt sich fünf bis acht Stunden nach Futteraufnahme in der Leber eine Erhöhung (SCHULTEHERMMANN, 1977), nach Kalorienrestriktion eine Verringerung der Zellteilungsrate (HITAKA et al., 1997). Weiterhin existieren in Abhängigkeit vom Licht-Dunkel-Rhythmus zircadiane Schwankungen (LOURY et al., 1986). In einigen Organen verändert sich das Zellteilungsverhalten in Abhängigkeit vom Alter. Da wachsende Tiere erhöhte basale Zellproliferationsraten und eine hohe Variabilität aufweisen, sollten Ratten bei Versuchsbeginn mindestens 10 bis 12 Wochen alt sein (GOLDSWORTHY et al., 1991).

2.4.1 Bedeutung der Zellproliferation in der Karzinogenese

In allen drei Phasen der Karzinogenese stellt die Zellproliferation einen bedeutenden Faktor dar (COHEN und ELLWEIN, 1990):

Die Fixation eines während der **Initiation** entstehenden Defektes der DNA als Mutation erfolgt bei der Teilung der Zelle. Folge gesteigerter Zellproliferation ist eine Verkürzung der Zeitspanne, in der zelleigene Reparatursysteme Schäden an der DNA beheben können. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, daß Schäden (spontan oder durch genotoxische Karzinogene verursacht) ohne Reparatur an Tochterzellen weitergegeben werden (COHEN und ELLWEIN, 1991; POPP und MARSMAN, 1991). Die Erhöhung der Zellteilungsrate entspricht auch indirekt einer mutagenen Wirkung, da einerseits das Auftreten spontaner Mutationen steigt, andererseits die in der Replikationsphase einzelsträngige DNA empfänglicher für Schädigungen ist als die in der Ruhephase doppelsträngig vorliegende (AMES et al., 1993).

Während der **Promotion** fördert die Zellproliferation die klonale Expansion initiiertter Zellen (PITOT et al., 1991). Im Stadium der **Progression** erhöht sich mit einer Steigerung der Zellproliferation die Wahrscheinlichkeit weiterer Mutationen von Wachstumskontrollgenen,

woraus eine schrittweise Transformation zum malignen Tumor resultieren kann (BUTTERWORTH et al., 1992).

Nach KLAUNIG et al. (1991) besteht eine hohe Korrelation zwischen der Fähigkeit einer Substanz, die Zellproliferation zu induzieren und ihrer Karzinogenität. Für andere Autoren stellt die Erhöhung der Zellproliferation an sich keinen Risikofaktor dar. So kam es trotz Erhöhung der Zellteilung nach der mehrfachen Verabreichung verschiedener Mitogene nach der Applikation einer initiierenden Substanz nicht immer zur Entstehung von FAH (COLUMBANO et al., 1987, 1990). WARD et al. (1988) fanden bei dem Vergleich verschiedener Substanzen bei Untersuchungszeitpunkten von 2 bis 40 Wochen auch gesteigerte Zellproliferationsraten bei nicht karzinogenen Substanzen und nicht erhöhte Werte bei nicht-genotoxischen Karzinogenen. Die Autoren sehen daher keinen Beweis dafür, daß die Steigerung der Zellproliferation einen notwendigen Faktor in der Karzinogenese darstellt.

2.4.2 Zellproliferation in der Leber

2.4.2.1 Zellproliferation im unveränderten Lebergewebe

Hepatozyten gehören zu den reversibel postmitotischen Zellen mit einem hohen Differenzierungsgrad und einer sehr geringen basalen Zellteilungsrate (Mitoseindex: DEML und OESTERLE, 1982: ~0,3 %; BLAZEY, 2001: 0,034 %-0,05 %). Sie besitzen aber ein hohes Proliferationspotential, so daß sie auf entsprechende Stimulation mit Teilung reagieren können (MICHALOPOULOS und DeFRANCES, 1997). Nach dem Konzept der „Streaming liver“ (ZAJICEK et al., 1985; WERLICH et al., 1998) proliferieren die Hepatozyten überwiegend in der periportalen Region des Leberläppchens und wandern dann im Verlaufe von ca. 200 Tagen bis zur Zentralvene, wo sie zugrunde gehen. Diesem Konzept widersprechen allerdings Untersuchungen von BRALET et al. (1994), KENNEDY et al. (1995) und PONDER (1996). Nach der Meinung dieser Autoren können sich die Hepatozyten unabhängig von ihrer Lokalisation teilen und wandern nicht. BURKHARDT (2001) konnte das Konzept der „Streaming liver“ an der Leber unbehandelter B6C3F1 und C57BL Mäusen nicht nachvollziehen. Sie konnte die Zone 2 als Hauptproliferationszone identifizieren.

2.4.2.1.1 Zonale Unterschiede in der Zellproliferation

In Abhängigkeit vom mitogenen Stimulus bestehen zonale Unterschiede im Proliferationsverhalten der Hepatozyten. Eine Anzahl von Studien hat gezeigt, daß verschiedene chemische

Substanzen unterschiedliche Proliferationsmuster hervorrufen, die sich aus Reaktionsstärke, Zone der Proliferation und deren Veränderungen über die Zeit ergeben (SCHULTE-HERMANN et al., 1986; MAYOL et al. 1992; BAHNEMANN, 2000).

Nach einer partiellen Hepatektomie oder der Induktion einer regenerativen Zellteilung durch eine zytotoxische Substanz zeigt die Regeneration der Leber einen typischen Verlauf. Die Zellteilung beginnt, unabhängig von der Lokalisation der Schädigung, in periportalen Regionen. Zu späteren Zeitpunkten finden sich die höchsten Zellteilungsraten in perivenösen Bereichen (LEE et al., 1998; RABES et al., 1976).

2.4.2.2 Zellproliferation in FAH

FAH zeichnen sich als Folge der veränderten Wachstumsregulation durch ein vom Umgebungsgewebe abweichendes Wachstumsverhalten aus. Sowohl die durch chemische Karzino-gene erzeugten als auch die spontan entstandene FAH reagieren im Vergleich zu den unveränderten Hepatozyten überproportional auf die mitogenen Effekte eines Tumorpromotors (SCHULTE-HERMANN et al., 1983 b; GRASL-KRAUPP et al., 1993).

Die DNA-Syntheserate in FAH zwei Jahre alter unbehandelter Ratten liegt fünf bis zehn mal höher als in den unveränderten Hepatozyten (SCHULTE-HERMANN et al., 1983 a). Ohne den Einfluß von Tumorpromotoren wachsen FAH langsamer, als die Höhe der Zellproliferationsrate erwarten ließe. Als Ursache wird eine in FAH erhöhte Apoptoserate vermutet (SCHULTE-HERMANN et al., 1982). SCHULTE-HERMANN et al. (1983 a) konnten zwischen den verschiedenen FAH-Typen keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Synthese erkennen. ZERBAN et al. (1994) dagegen zeigten, daß die verschiedenen FAH-Typen nach siebenwöchiger Verabreichung von N-Nitrosomorpholin unterschiedliche Zellproliferationsraten aufweisen. Dabei ließen die amphophilen, die basophilen sowie die gemischtzelligen FAH die höchsten Labelling-Indizes erkennen.

Über den Zusammenhang zwischen der Größe der FAH und der DNA-Syntheserate liegen unterschiedliche Beobachtungen vor. Nach SCHULTE-HERMANN et al. (1983 a, 1990) und TSUDA et al. (1992) besteht keine Korrelation, MOSER et al. (1996) dagegen konnten eine Beziehung zwischen dem Volumen der FAH und der Höhe des Proliferationsindex feststellen. Die Stärke der histochemischen phänotypischen Abweichung scheint mit dem Proliferationsindex zu korrelieren (TSUDA et al., 1992). FAH, die Aktivitätsänderungen zweier oder mehrerer Enzyme zeigten, wiesen höhere Zellteilungsraten auf als FAH mit nur einer Veränderung (PUGH und GOLDFARB, 1978).

2.4.2.3 Messung der Zellproliferation

Grundlage für die Messung der Zellproliferation ist die quantitative Erfassung der sich teilenden Zellen. Das ermittelte Ergebnis wird in Relation zur Gesamtzellzahl (GOLDWORTHY et al., 1991) oder zu Längen- oder Flächenparametern gesetzt (MONTICELLO et al., 1990).

Messungen der Zellproliferation können am histologischen Schnitt oder am Gewebehomogenat durchgeführt werden (FOSTER, 1997).

Histologische Methoden

1. Bestimmung des Mitose-Indexes (VAN DIEST et al., 1992): Bei der Zählung der mitotischen Figuren werden die Zellen erfaßt, die sich tatsächlich im Teilungsvorgang befinden. Nachteilig ist die kurze Dauer der histologisch erkennbaren Mitose-Phase (M-Phase) (ca. 1 Stunde).
2. S-Phasen-Nachweis: Diese Methode beruht auf dem Nachweis von exogenen Markern, die dem Tier vor dem Tode zugeführt worden sind. Verwendung finden das radioaktive [³H]-Thymidin und das nicht radioaktive Thymidinanalogon 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU), die während der S-Phase kompetitiv anstelle des natürlich vorliegenden Thymidins in die DNA eingebaut werden (SOULEIL und PANIJEL, 1973). Die Marker werden entweder einmalig per Injektion (Puls-Methode) oder über einen längeren Zeitraum verabreicht. Bei der länger andauernden Applikation summieren sich die teilungsaktiven Kerne, so daß die Beeinflussung durch diurnale Unterschiede im Proliferationsverhalten minimiert wird (GOLDWORTHY et al., 1991).

Tab. 3: Methoden der Marker-Verabreichung

| Methode | Vorteile/Nachteile |
|--|---|
| Puls-Methode: Injektion (subkutan, intraperitoneal oder intravenös) | <ul style="list-style-type: none"> • Erfassung eines nur kleinen Zeitfensters, da nur Zellen, die sich innerhalb der Halbwertszeit der Marker (30-60 Minuten) in der S-Phase befinden, markiert werden • Ermittlung genauer Kurvenverläufe möglich, wenn der Marker mehrmals in kurzen Zeitabständen injiziert wird |
| Trinkwasser-Applikation | <ul style="list-style-type: none"> • individuelle und diurnale Unterschiede in der Wasseraufnahme • geringe Toxizität, geeignet für Langzeitstudien |
| Slow-release-Pellet (subkutane Implantation) | <ul style="list-style-type: none"> • kontinuierliche Abgabe des Markers • Toxizitätsprobleme an der Implantationsstelle |
| Osmotische Minipumpe (subkutane oder intraperitoneale Implantation) | <ul style="list-style-type: none"> • kontinuierliche Abgabe des Markers • Arbeitsaufwand (Füllen und Implantieren der Pumpen) |

Die Wahl der Applikationsmethode ist von der Fragestellung und der basalen Zellteilungsrate des zu untersuchenden Organs abhängig. Mittels Puls-Methode kann eine Momentdarstellung des Zellteilungsverhaltens erfolgen. Sie ist damit zur Ermittlung genauer Kurvenverläufe, z. B. nach einmaliger Verabreichung einer Substanz, geeignet. In Organen mit sich häufig teilenden Zellen (z. B. Darm oder Knochenmark) können mit dieser Methode ausreichend hohe Kontrollwerte erreicht werden (DeFAZIO et al., 1987). In Organen mit einer niedrigen basalen Zellteilungsrate (z. B. Leber) dagegen können als Folge der Betrachtung eines nur kleinen Zeitfensters Effekte nicht erkannt oder verfälscht werden (MARSMAN et al., 1988). Weiterhin ist für die aussagekräftige Interpretation von Substanzeffekten ein hoher Kontrollwert notwendig, der nur durch eine Erhöhung der Zahl markierter Zellkerne erlangt werden kann (GOLDSWORTHY et al., 1991).

Die Angabe des Ergebnisses erfolgt als Labelling-Index (LI). Dieser stellt den prozentualen Anteil der Zellen, in deren DNA der Marker eingebaut worden ist, an der Gesamtzellzahl dar (ELDRIDGE et al., 1990).

3. Nachweis von nukleären Proteinen, die nur während bestimmter Phasen des Zellzyklus, nicht aber in der G₀-Phase, exprimiert werden (endogene Marker). Dazu gehören PCNA („Proliferation cell nuclear antigen“) (DIETRICH, 1993), histon-assoziierte Proteine (ALLISON et al., 1994) sowie Ki-67 (TETER et al., 1995). Diese Methoden erlauben auch retrospektive Untersuchungen des Zellteilungsverhaltens.

Messungen der Zellproliferation am **Gewebehomogenat** können mittels Szintillationzählung (³H]-Thymidin) (FOSTER et al., 1990), Durchflußzytometrie (BrdU) (LATT, 1977) oder ELISA (zellzyklusassoziierte Proteine) (MONTICELLO et al., 1995) erfolgen. Nachteilig bei diesen Methoden ist, daß morphologisch keine Differenzierung zwischen verschiedenen proliferierenden Zellpopulationen eines Gewebes vorgenommen werden kann (FOSTER, 1997).

2.4.2.3.1 Messung der zonalen Zellproliferation in der Leber

Es existieren verschiedene Ansätze, um die zonalen Unterschiede in der Zellproliferation quantifizieren zu können. Nach der LZM („Lobule-dependent zonal measurement“)-Methode wird die Fläche zwischen Portalfeld und Zentralvene eines Leberläppchens in drei gleich große, die drei Leberzonen repräsentierende, ca. 100 Zellen umfassende Abschnitte unterteilt (BAHNEMANN und MELLERT, 1997). KOLOJA et al. (1996 a) definieren den Bereich von

5 Hepatozyten, LEE et al. (1993) von 7 Hepatozyten um die Zentralvene bzw. Portalvene herum als perivenös bzw. periportal. KOLAJA et al. (1996 a) bezeichneten Hepatozyten, die in einem Abstand von mehr als 5 Hepatozyten von der Zentral- bzw. Portalvene entfernt lagen, als midzonal gelegen.

2.4.2.4 Labelling-Index in der Leber: Kontrollwerte

Tab. 4: Labelling-Index (%) im extrafokalen Lebergewebe (Kontrollwerte)

| Rattenstamm Geschlecht | Alter | Labelling-Methode | LI (%) | Referenz |
|-------------------------------|---------------------------------|---|------------------------------------|----------------------------------|
| F344 (m) | 10-32 Wo | 6-d-Pumpe [³ H]-Thymidin | 0,3-0,7 | MARSMAN et al., 1992 |
| F344 (m) | 60 Wo | 7-d-Pumpe [³ H]-Thymidin | 0,8 | MARSMAN und POPP, 1994 |
| F344 (m) | 9 Mo | 3-d im TW BrdU | 0,8±0,1 | MAYOL et al., 1992 |
| F344/NCr (w) | 26-32 Mo | 1-h-Puls [³ H]- Thymidin | 0,7-1,3 | WARD und OHSHIMA, 1985 |
| Lewis (w) | 9-11 Wo 12-14 Wo 15-17 Wo | 7-d-Pumpe BrdU | 13,3±1,7 ~ 4 ~ 4 | YAGER et al., 1994 |
| Wistar (m) | ca. 18 Wo | 7-d-Pumpe BrdU | 2,19±0,97 | GÖTTEL, 1997 |
| Wistar (m) | 7 Wo 12 Wo 19 Wo | 7-d-Pumpe BrdU | 14,9±2,7 2,48±0,36 1,31±0,33 | BAHNEMANN und MEL- LERT, 1997 |
| Wistar (w) | 16-32 Wo | 3-d-Pumpe BrdU | 0,34-0,4 | STINCHCOMBE et al., 1995 |
| Wistar (w) | 52 Wo | 14-d-Pumpe [³ H]- Thymidin | ~3 | SCHULTE-HERMANN et al., 1990 |
| Sprague-Dawley (m) | ca. 30-64 Wo | 2-d-Pumpe [³ H]- Thymidin | 0,128 | ZERBAN et al., 1994 |
| Sprague-Dawley (m) | 11-20 Wo | 2-h-Puls [³ H]- Thymidin | 0,6-1,8 | ABANOBI et al., 1982 |
| Harlan-Sprague- Dawley (w) | 9 Mo | Puls BrdU (Injektio- nen 10 und 2 h vor der Tötung) | 0,93±011 | DRAGAN et al., 1996 |

BrdU = 5-Bromo-2'-desoxyuridin; d = Tag; F344 = Fischer Ratte 344; h = Stunde; LI = Labelling-Index; Mo = Monate; m = männlich; TW = Trinkwasser; w = weiblich; Wo = Wochen

Tab. 5: Labelling-Index (%) (7-d-Pumpe BrdU) in verschiedenen Leberzonen bei männlichen Kontroll-Wistar Ratten

| Alter | Zone 1 | Zone 2 | Zone 3 | Referenz |
|---------------|-----------|-----------|-----------|----------------------------------|
| ca. 18 Wochen | 2,75±0,81 | 1,65±0,58 | 2,28±1,46 | GÖTTEL, 1997 |
| 7 Wochen | 16,86 | 19,12 | 8,73 | BAHNEMANN und MEL- LERT, 1997 |
| 12 Wochen | 3,41 | 2,44 | 1,6 | |
| 19 Wochen | 2,58 | 0,82 | 0,55 | |

Tab. 6: Labelling-Index (%) in spontan entstandenen FAH

| Rattenstamm Geschlecht Alter | Labelling-Methode | FAH-Typ | LI (%) | Referenz |
|------------------------------------|---|-----------------|---------|---------------------------|
| Wistar (m) 2 Jahre | Puls [³ H]-Thymidin (Injektionen 26, 20, 14, 8 und 2 h vor der Tötung) | keine Angabe | ca. 3,5 | GRASL-KRAUPP et al., 1993 |
| F344/NCr (w) 26-32 Mo | 1-h-Puls [³ H]- Thymidin | BCF | 2,2-4,0 | WARD und OHSHIMA, 1985 |

F344 = Fischer Ratte 344; BCF = „basophilic cell focus“; h = Stunde; LI = Labelling-Index; Mo = Monate; m = männlich; w = weiblich; Wo = Wochen

2.5 Apoptose

Die Apoptose, eine Form des aktiven Zelltods, stellt als Gegenpart zur Zellproliferation einen bedeutsamen Faktor in der Gewebshomöostase dar. Auch im Rahmen der Hepatokarzinogenese spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. Sie repräsentiert einen Gegeneffekt gegen karzinogen-induzierte Zellschädigungen, da durch sie das Überleben veränderter Zellen in verschiedenen Stadien der Karzinogenese verhindert wird (WYLLIE et al., 1980; MAJINO und JORIS, 1995). Andererseits sollen verschiedene Karzinogene durch Hemmung des apoptotischen Prozesses die Überlebenszeit präkanzeröser und kanzeröser Zellen verlängern können (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1990; ROBERTS et al., 1995).

SCHULTE-HERMANN et al. (1983 b) bemerkten eine Diskrepanz zwischen dem auf der Basis einer erhöhten Zellproliferationsrate kalkulierten und dem tatsächlichen Wachstum von FAH. Die Autoren vermuteten daher eine in FAH erhöhte Zelltodrate. Unterstützt wird diese Hypothese von den Ergebnissen von BURSCH et al. (1984) und STINCHCOMBE et al. (1995), die in unpromovierten FAH eine 10- bis 20-fach gegenüber dem unveränderten Umgebungsgewebe erhöhte Apoptoserate maßen. Auch die Regression von FAH nach Beendigung der Pomotor-Verabreichung soll eine Folge einer erhöhten Apoptoserate sein (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1990).

Die Ergebnisse von ZERBAN et al. (1994) unterstützen die These, daß die Apoptose als Gegenpart der Zellproliferation in FAH eine wichtige Rolle spielt, jedoch nicht. Die Autoren konnten in keinem FAH-Typ (induziert durch NNM) eine gegenüber dem Umgebungsgewebe signifikant erhöhte Apoptoserate feststellen.

2.5.1 Merkmale der Apoptose

1. Morphologisch gekennzeichnet ist der Beginn der Apoptose durch das Schrumpfen der Zelle mit Kondensation des Cytoplasmas und der halbmondförmigen Kondensation des

Chromatins an der Kernmembran. Der Kern kann fragmentieren, und die Zelle formt Vorwölbungen („budding phenomenon“), die dann von der Zelle abgeschnürt werden. Diese apoptotischen Körperchen, die häufig nukleäre Fragmente enthalten, werden von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert und abgebaut oder verbleiben extrazellulär (KERR et al., 1972; KERR und HARMON, 1991)

2. Es ist keine oder nur eine geringe Schwellung von Mitochondrien oder anderen Zellorganellen erkennbar (KERR et al., 1972).
3. Die DNA ist durch Strangbrüche zwischen den Nucleosomen in Segmente von ca. 185 Basenpaaren fragmentiert (ALISON und SARRAF, 1995).
4. Der Prozeß steht unter genetischer Kontrolle und kann durch zellinterne Signale oder exogene Substanzen wie Hormone, Zytokine und eine Vielzahl von chemischen, physikalischen und viralen Agentien induziert werden (KERR et al., 1994; WYLLIE, 1994; RAZVI und WELSH, 1995).
5. Die Dauer der Apoptose beträgt in der Leber ca. zwei bis drei Stunden (BURSCH, 1990)

2.5.2 Nachweis der Apoptose

Die Apoptoserate, der prozentuale Anteil an Apoptosen an der Gesamtzellzahl, kann im histologischen Schnitt ermittelt werden durch

1. Identifizierung der apoptotischen Körperchen am HE-Schnitt (KERR et al., 1972),
2. Auswertung der Eigenfluoreszenz der apoptotischen Körperchen nach Färbung mit Eosin (STINCHECOMBE et al., 1995),
3. Nachweis der Strangbrüche der DNA durch den Einbau markierter Nukleotide am 3`OH-Ende der Fragmente, die anschließend immunhistologisch sichtbar gemacht werden können (TUNEL („terminal deoxynucleodidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling“) –Methode) (WIJSEMAN et al., 1993),
4. immunhistologischen Nachweis von TGF- β 1 oder dessen Vorläufermolekül TGF- β -LAP, die in durch Apoptose zugrunde gehenden Hepatozyten vorhanden sind (WAKEFIELD et al., 1990; BURSCH et al., 1992).

Die Identifizierung der Apoptose im histologischen Schnitt bietet den Vorteil, daß die Beurteilung der Lokalisation der Apoptose im Gewebe möglich ist. Weitere Vorgehensweisen, bei denen dieses nicht möglich ist, sind der Nachweis der DNA-Fragmente mit ihrer spezifischen Länge in der Gel-Elektrophorese (ALISON und SARRAF, 1995) und die Unterscheidung und

Quantifizierung von apoptotischen, nekrotischen und normalen Zellen in einer Zellsuspension mittels Durchflußzytometrie (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

2.5.3 Apoptose-Index in der Leber: Kontrollwerte

Tab. 7: Apoptose-Index (%) in der Leber (Kontrollwerte)

| Rattenstamm Geschlecht | Alter | Apoptose-Index (%) | Nachweis- Methode | Referenz |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| F344 (m) | 10-32 Wo | 0,2-0,7 | Zählung der AK im HE-Schnitt | MARSMAN et al., 1992 |
| Sprague- Dawley (m) | 12 Wo | ~0,1 | Zählung der AK im HE-Schnitt | MAYOL et al., 1992 |
| Sprague- Dawley (m/w) | ca. 27-49 Wo | 0,013 | Zählung der AK im HE-Schnitt | ZERBAN et al., 1994 |
| Alderley Park Ratten (m) | ca. 6 Wo | 0,031 | Zählung der AK im HE-Schnitt | ROBERTS et al., 1995 |
| Wistar (m) | 9 Wo 13 Wo 26 Wo | 0,044 0,063 0,081 | HE-Diagnostik | BLAZEY, 2001 |
| Wistar (w) | 13-32 Wo | 0,2-0,33 | Eigenfluoreszenz | STINCHCOMBE et al., 1995 |

AK = Apoptotische Körperchen; HE: Hämatoxylin und Eosin; m = männlich; w = weiblich; Wo = Woche

2.6 Prüfsubstanzen

2.6.1 Phenobarbital

Phenobarbital ist ein Barbitursäurederivat mit antikonvulsiver Wirkung (BENET und SHEINER, 1985), das in der Human- und Veterinärmedizin bei der Behandlung der Epilepsie Verwendung findet. In Initiations-Promotions-Studien wird diese Substanz häufig als Promotor eingesetzt.

2.6.1.1 Allgemeine Wirkung von Phenobarbital auf die Leber

Die Verabreichung von Phenobarbital führt zu einer Erhöhung des relativen Lebergewichtes von bis zu 30 % (SCHULTE-HERMANN, et al., 1990; JONES et al., 1993; GARCIA-ALLEN et al., 1997). Ursächlich dafür sind sowohl eine Hypertrophie als auch eine Hyperplasie der Hepatozyten (CARTHEW et al., 1998), die sich überwiegend in zentrolobulären Region des Leberläppchens finden (SCHULTE-HERMANN et al., 1986). Die Hypertrophie beruht auf einer Zunahme des Gehaltes an RNA, glattem Endoplasmatischen Retikulum und verschiedenen fremdstoffmetabolisierenden Enzymen (Cytochrom P450, GGT) (PERAINO et al., 1975). Die Hyperplasie ist Folge einer gesteigerten Zellproliferation. Die Hypertrophie bleibt über die Dauer der Exposition bestehen, während die Erhöhung der Zellproliferation nach SCHULTE-HERMANN et al. (1986) und JONES et al. (1993) nur vorübergehend sein soll.

2.6.1.2 Hepatokarzinogene Wirkung von Phenobarbital

In verschiedenen Tests konnte Phenobarbital keine Genotoxizität nachgewiesen werden (ANDERSON und STYLES, 1978; BRADLEY, 1985). Phenobarbital hat sich in der Nager-Leber sowohl bei chronischer, alleiniger Administration (ROSSI et al., 1977; WARD, 1983) als auch in Initiations-Promotions-Studien als hepatokarzinogen erwiesen (PERAINO et al., 1973, 1977). Für die karzinogene Wirkung am Menschen liegen keine Beweise vor (IARC, 1987).

2.6.1.2.1 Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation

ROSSI et al. (1977) fanden nach 152-wöchiger Verabreichung von Phenobarbital (0,05 % im Trinkwasser) an Wistar-Ratten bei 59 % der männlichen und bei 32 % der weiblichen Tiere hepatozelluläre Adenome. WARD (1983) berichtete nach einer bis zu 233 Tagen dauernden Administration von Phenobarbital (0,05 % im Trinkwasser) an alte, männliche F344/NCr-

Ratten (875-918 Tage alt) von einer Prävalenz an hepatozellulären Adenomen von 47 % im Vergleich zu 33 % in der Kontrollgruppe.

2.6.1.3 Promovierende Wirkung von Phenobarbital

2.6.1.3.1 Hepatokarzinogene Wirkung in Initiations-Promotions-Protokollen

Phenobarbital erhöht in Initiations-Promotions-Studien die Lebertumor-Prävalenz und die Anzahl der Tumoren pro Leber, wobei die Ergebnisse vom Studiendesign abhängig sind.

Tab. 8: Beispiele für Tumor-Prävalenzen in Initiations-Promotions-Studien

| Rattenstamm Geschlecht Alter bzw. Ge- wicht | Initiator Dosis Dauer | PB Dosis Dauer | Tumor-Prävalenz (%) | | Referenz |
|--|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------|-----------------------------------|
| | | | PB | Nur Initiator | |
| Sprague-Dawley männlich 22 Tage | AAF 0,02 % im Futter 18 Tage | 0,05% im Futter 36 Wochen | 66 | 21 | PERAINO et al., 1973 |
| Sprague-Dawley männlich 22 Tage | AAF 0,02 % im Futter 18 Tage | 0,05% im Futter 407 Tage | 62 | 7 | PERAINO et al., 1977 |
| Sprague-Dawley männlich 200 g | NNM 200 mg/l TW 3 Wochen | 0,05 % im Futter 40 Wochen | 12,5 | 0 | ITO et al., 1984 |
| | | 52 Wochen | 38,5 | 15,4 | |
| F 344 150 g | FAA 0,02 % im Futter 13 Wochen | 0,05% im Futter 24 Wochen | 83 | 50 | WATANABE und WILLIAMS, 1978 |

AAF = 2-Acetylaminofluoren; PB = Phenobarbital; FAA = N-2-Fluorenylacetamid;
NNM = N-Nitrosomorpholin; TW = Trinkwasser

2.6.1.3.2 FAH

In der Großzahl der Initiations-Promotions-Studien stieg nach Verabreichung von Phenobarbital die Anzahl an FAH pro Leber stärker an als nach alleiniger Initiation, wobei auch hier die Ergebnisse vom Studiendesign beeinflusst wurden (PITOT et al., 1987; SCHULTE-HERMANN et al., 1990; HASEGAWA et al., 1991; CHEN et al., 1992; KOLOJA et al., 1996 b). Die Anzahl der FAH erhöhte sich innerhalb der ersten drei bis vier Behandlungsmonate und blieb dann konstant (GOLDWORTHY et al., 1984; GOLDWORTHY und PITOT, 1985). MOORE et al. (1983 b) hingegen beobachteten nach 16-wöchiger Applikation keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der FAH zwischen Kontrolltieren, die nur Phenobarbital erhalten haben, und den Tieren, die zusätzlich initiiert wurden. In Untersuchungen von ITO et

al. (1984) führte die alleinige Exposition junger männlicher Sprague-Dawley Ratten erst nach 52 Wochen zu einem zahlenmäßigen Anstieg der FAH.

In den meisten Studien wurde auch eine stärkere Zunahme der Größe und des prozentuale Anteils der FAH am Lebervolumen nach Phenobarbital-Verabreichung als bei den Kontrollgruppen geschildert (GOLDSWORTHY et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1990; CHEN et al., 1992). DRAGAN et al. (1996) dagegen fanden nach 8-monatiger Phenobarbital-Applikation in keiner Dosierung eine Erhöhung des prozentualen Anteils der FAH am Lebervolumen im Vergleich zur nur initiierten Kontrollgruppe. Die alleinige Verabreichung von Phenobarbital verursachte erst nach 52 Wochen einen geringfügigen Anstieg der Fläche und Volumenanteil der FAH (ITO et al., 1984).

Die notwendige Dosierung von Phenobarbital zur Auslösung promovierender Effekte liegt über 10 ppm im Futter (GOLDSWORTHY et al., 1984; KOLOJA et al. 1996 b), nach MAEKAWA et al. (1992) zwischen 15-23 ppm im Futter. Hingegen führen Konzentrationen über 500 ppm im Futter zu keiner weiteren Steigerung der FAH-Anzahl (GOLDSWORTHY et al., 1984).

2.6.1.3.2.1 FAH-Typen

SCHULTE-HERMANN et al. (1990) beschrieben nach Initiation mit N-Nitrosomorpholin eine sich mit der Dauer der Phenobarbital-Verabreichung verändernde FAH-Typ-Zusammensetzung. Nach zwei Wochen überwogen eosinophile und klarzellig-eosinophil-gemischtzellige Foci, während in der nur initiierten Gruppe die klarzelligen Foci dominierten. Ab der zehnten Behandlungswoche waren eosinophil-basophil-gemischtzellige Foci der vorwiegend gefundene Typ, nach 49 Wochen traten zusätzlich auch basophile Foci auf. KOLAJA et al. (1996 b) berichteten vom Auftreten basophiler, eosinophiler und klarzelliger Foci nach 7-tägiger Phenobarbital-Applikation nach Initiation mit DEN. Statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteils am Lebergewebe zwischen der Phenobarbital-Gruppe und den nur initiierten Tieren ließen sich nur für die eosinophilen Foci nachweisen.

2.6.1.3.3 Zellproliferation und Apoptose

SCHULTE-HERMANN et al. (1982, 1986, 1990) führten verschiedene Zellproliferationsstudien durch, in denen weibliche Wistar-Ratten nach Initiation mit N-Nitrosomorpholin bis zu 14 Monate mit Phenobarbital (50 mg/kg Körpergewicht) behandelt wurden.

Im unveränderten Lebergewebe zeigte die Zellproliferation einen initialen Anstieg mit maximalen Werten (3- bis 4-fach über Kontrollwert) am dritten Verabreichungstag. Nach einem Abfall auf Kontroll-Level innerhalb der ersten Behandlungswoche blieb die Zellproliferationsrate auf diesem Niveau. Der Abfall der Zellproliferation erreicht nach JONES et al. (1993) nach 7 Tagen sogar Werte unter Kontrollniveau. Die von KOLOJA et al. (1996 a) mittels 7-Tage-Pumpe ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) ermittelte 4,7-fache Steigerung des LI nach 7-tägiger Verabreichung von Phenobarbital (500 mg/kg Futter) spiegelt diese initiale Steigerung wieder. Nach 2 Wochen lag der LI 1,4-fach über, zu späteren Zeitpunkten (3, 4 und 13 Wochen) auf Kontrollniveau. Differierende Angaben bestehen in der Literatur zum Proliferationsverhalten der Hepatozyten nach Langzeitapplikation von Phenobarbital. BARBASON et al. (1983) bestimmten nach 12-monatiger Exposition männlicher Wistar Ratten (700 ppm im Trinkwasser) sowohl in initiierten als auch in nicht initiierten Gruppen einen gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe erhöhten LI (1,5- bzw. 1,9-fach). DRAGAN et al. (1996) hingegen ermittelten nach einer 8-monatigen Verabreichung von Phenobarbital (500 ppm im Futter) an weibliche Harlan-Sprague-Dawley Ratten nach Initiation keine im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erhöhte, bei nur promovierten Tieren sogar eine verringerte Zellproliferationsrate.

SCHULTE-HERMANN et al. (1986) und KOLAJA et al. (1996 a) fanden die initiale Proliferationssteigerung in zentrolobulären Bereichen des Leberläppchens, CHEN et al. (1995) ermittelten im Gegensatz dazu periportale Bereiche als Hauptproliferationszone.

FAH in mit NNM initiierten Wistar Ratten wiesen während einer 13-monatigen Verabreichung von Phenobarbital immer eine höhere Zellproliferationsrate auf (Puls-Labeling) als unveränderte Hepatozyten (SCHULTE-HERMANN et al., 1982). Ähnlich wie in unveränderten Hepatozyten verursachte Phenobarbital in den FAH nur eine initiale, vorübergehende Steigerung der Zellproliferation mit dem Maximum innerhalb der ersten Behandlungswoche. Diese spiegelt sich in den mittels 2-Wochen-Pumpe ermittelten Werten nach zweiwöchiger Phenobarbital-Applikation wider (s. Tab. 9).

Tab. 9: Labelling-Index (2-Wochen-Pumpe $[^3\text{H}]$ -Thymidin) nach zweiwöchiger Phenobarbital-Verabreichung nach Initiation mit NNM (aus SCHULTE-HERMANN et al., 1982)

| | LI (%) in unveränderten Hepatozyten | LI (%) in FAH |
|---------------|-------------------------------------|---------------|
| Kontrolle | 3,0 ± 2,0 | 29,0 ± 5,3 |
| Phenobarbital | 12,3 ± 6,3 | 47,0 ± 5,1 |

LI = Labelling Index; NNM = N-Nitrosomorpholin

Über die Dauer der Zellproliferationssteigerung bestehen unterschiedliche Angaben. SCHULTE-HERMANN et al. (1982, 1990) konnten zu späteren Zeitpunkten (ca. 2-4 Wochen) keine Unterschiede zwischen der promovierten Gruppe und der nur initiierten Gruppe erkennen. KOLOJA et al. (1996 b) dagegen ermittelten nach 7-, 30- und 60-tägiger Verabreichung von Phenobarbital (500 ppm im Futter) nach Initiation mit DEN zu allen Zeitpunkten in FAH einen im Vergleich zur nur-initiierten Gruppe 1,4- bis 1,5-fach erhöhten Labelling-Index. Auch BARBASON et al. (1983) wiesen in einem Initiations-Promotions-Protokoll nach 12-monatiger Applikation einen 2,9-fach höheren LI in promovierten als in unpromovierten FAH nach.

Übereinstimmend wird in der Literatur von der Senkung der Apoptoserate sowohl im unveränderten Lebergewebe als auch in FAH durch die Verabreichung von Phenobarbital berichtet: Dabei lag der Apoptose Index (AI) in FAH immer über dem des unveränderten Lebergewebes. In einer Studie von BURSCH et al. (1984) ergaben sich im unveränderten Lebergewebe nach Initiation mit N-Nitrosomorpholin Apoptose-Indizes von 0,12 %, nach zusätzlicher Phenobarbital-Behandlung (28 Wochen, 50 mg/kg Körpergewicht) von 0,07 %. In FAH wurde bei nur initiierten Tieren ein AI von 1,2 %, nach zusätzlicher Promotion von 0,7 % gemessen. Somit wird das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod, aus dem das langsame Nettowachstum nicht promovierter FAH resultiert, durch Phenobarbital gestört. Phenobarbital inhibiert die Apoptose und steigert auch dadurch die Nettowachstumsrate (SCHULTE-HERMANN et al., 1989, 1990, 1993).

Diese Befunde werden durch Untersuchungen von KOLAJA et al. (1996 b) unterstützt. Sie beobachteten nach der Verabreichung von Phenobarbital (7, 30 und 60 Tage, 500 ppm) nach Initiation mit DEN in den FAH eine verringerte Apoptoserate gegenüber den FAH in nicht promovierten Ratten.

2.6.1.3.4 Mechanismen der Tumorpromotion

Verschiedene Untersuchungsergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die Promotionswirkung Phenobarbitals nach chronischer Applikation auf der unterschiedlichen Auswirkung auf initiierte und normale Hepatozyten beruht. Die akute Verabreichung von Phenobarbital an Ratten führt zu einer Steigerung der Zellproliferation in der Leber, die chronische Applikation dagegen soll die Fähigkeit nicht initiiert Hepatozyten verringern, auf mitogene Stimuli wie EGF („epidermal growth factor“) oder HGF („hepatocyte growth factor“) zu reagieren (ECKL et al., 1988; GARCIA-ALLEN et al., 1997). Zusätzlich wird das Wachstum der mit Phenobarbital behandelten Hepatozyten im Vergleich zu unbehandelten Hepatozyten durch den zell-

teilungshemmend wirkenden Wachstumsfaktor TGF- β 1 („transforming growth factor“) zwei- bis dreifach stärker gehemmt. Ursächlich dafür sind eine verstärkte Ansprechbarkeit der Hepatozyten auf TGF- β 1 sowie höhere Konzentrationen von TGF- β 1 in den Hepatozyten (JIRTLE et al., 1991, 1994). In bestimmten Subpopulationen von FAH weisen die Hepatozyten weder erhöhte Level von TGF- β 1 noch des TGF- β 1-aktivierenden Rezeptors M6P/IGF-II auf. FAH erhalten dadurch einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber nicht initiierten Hepatozyten (JIRTLE et al., 1994; REISENBICHLER et al., 1994).

Die zellteilungshemmende Wirkung Phenobarbitals wurde durch eine Senkung der durch eine Cholin-Mangel-Diät hervorgerufenen Steigerung der Zellteilungsrate bestätigt (ABANOBI et al., 1982). In der Großzahl der in vivo durchgeführten Studien (s. 2.6.1.3.3.) ist die zellteilungshemmende Wirkung von Phenobarbital auf nicht veränderte Hepatozyten bei Langzeitapplikation jedoch nicht nachzuvollziehen.

REN und RUCH (1996) berichteten von einer zeitlich begrenzten Hemmung der interzellulären Kommunikation von Hepatozyten in Zellkultur als Folge der Phenobarbital-Exposition.

2.6.1.4 Wirkung von Phenobarbital auf die Leber alter Ratten

HASEGAWA et al. (1994) ermittelten nach einer 52-wöchigen Verabreichung von Phenobarbital (0,05 %) an nicht vorbehandelte, 60 Wochen alte männliche F344-Ratten keine signifikante Erhöhung der FAH-Anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso konnte in einer Studie von KRAUPP-GRASL et al. (1991) die promovierende Wirkung Phenobarbitals nach 13-monatiger Verabreichung (50 mg/kg Körpergewicht) an 57 Wochen alte Wistar Ratten nicht nachvollzogen werden. Die Anzahl/cm² und die Fläche der eosinophilen/klarzelligen FAH, die hier zusammengefaßt wurden, und die Anzahl der tigroiden FAH war, allerdings nicht statistisch signifikant, gegenüber der Kontrollgruppe sogar vermindert. Signifikant gesenkt war die Fläche der tigroiden FAH. Andere Autoren dagegen stellten nach der Langzeitexposition alter weiblicher F344/NCr Ratten eine Erhöhung des prozentualen Anteils FAH-tragender Tiere und Anzahl eosinophiler, nicht aber basophiler FAH pro Tier fest (WARD und OHSHIMA, 1985: 26 Monate alt, 27 Wochen Verabreichung; WARD und HENNE-MANN, 1990: 114 Wochen alt, Verabreichung bis zu 26 Wochen). 90,4 % der eosinophilen FAH und 85,9 % der GGT-positiven FAH waren in Zone 1 des Leberazinus lokalisiert (WARD und OHSHIMA, 1985). In einigen Studien ist mit unterschiedlichen Ergebnissen die Wirkung Phenobarbitals auf Tiere unterschiedlichen Alters direkt verglichen worden. Nach WARD (1983) ergab der Vergleich zwischen jungen (42 Tage alt) und alten (875 Tage alt) F344/NCr Ratten ein höhere Sensibilität alter Ratten für die Verabreichung von Phenobarbital

(500 ppm im Trinkwasser). Die jungen Ratten entwickelten während der 150 Tage dauernden Verabreichung keine FAH, während sich bei den alten Ratten signifikante Unterschiede in Anzahl GGT-positiver und eosinophiler FAH gegenüber unbehandelten Tieren zeigten (6,8- bzw. 19-fache Steigerung). In einer Studie von WARD und HENNEMANN (1990) entwickelten sich FAH und Adenome während der Phenobarbital-Verabreichung in alten Tieren deutlich schneller. XU et al. (1990) dagegen stellten anhand eines Protokolls mit partieller Hepatektomie, Initiation und 6-monatiger Phenobarbital-Gabe bei 12 Monate alten F344 Ratten eine deutlich geringere Promotionswirkung fest als bei 6 Monate alten Tieren. Ebenso reagieren nach HASEGAWA et al. (1991) junge Ratten empfindlicher auf die promovierenden Eigenschaften Phenobarbitals. Die Autoren fanden in einer 8-wöchigen Initiations-Promotions-Studie bei 46 Wochen alten männlichen F344 Ratten zwar eine Steigerung der FAH-Anzahl, die aber im Vergleich zu den Kontrolltieren geringere Ausmaße zeigte als bei 6 Wochen alten Tieren.

Messungen der Zellproliferation wurden in der Leber alter Ratten nur in geringem Umfang durchgeführt. SCHULTE-HERMANN et al. (1983 a) konnten nach einer einmaligen oralen Verabreichung von Phenobarbital (50 mg/kg Körpergewicht) keine Steigerung der Zellproliferation in spontan entstandenen FAH (alle FAH-Typen) 2 Jahre alter männlicher Wistar Ratten beobachten. Bei Zellproliferationsuntersuchungen an alten F344/NCr Ratten stellten WARD und OHSHIMA (1985) fest, daß der LI in basophilen FAH nach 4- bis 27-wöchiger Phenobarbital-Verabreichung nicht beeinflußt wurde. Der LI eosinophiler FAH, die bei den Kontrolltieren kaum vorhanden waren, lag deutlich über dem der basophilen FAH.

2.6.2 Chloroform

Chloroform (Trichlormethan, CHCl_3), ein organisches Lösungsmittel, das früher als Inhalationsnarkotikum eingesetzt wurde, entsteht in bedeutsamen Mengen bei der Chlorierung von Wasser (BULL, 1993).

2.6.2.1 Allgemeine Wirkung von Chloroform auf die Leber

In Folge einer kontinuierlichen Chloroform-Verabreichung an Ratten (4 Tage bzw. 3 Wochen) konnten LARSON et al. (1995 a) nach Applikation per Sonde eine 1,1- bis 1,2-fache Erhöhung, bei Applikation über das Trinkwasser keine Veränderung des relativen Lebergewichts ermitteln. Nach REDDY et al. (1992) führte allerdings eine 12-wöchige Trinkwasser-Applikation zu einer signifikanten 1,1-fachen Erhöhung des relativen Lebergewichts. Die in

beiden Studien bestimmten Anstiege des relativen Lebergewichts beruhten auf einer Verringerung des Körpergewichts.

Histologisch resultierte die Verabreichung von Chloroform an Ratten in zentrolobulären Leberzellnekrosen, deren Ausmaß von Geschlecht, Applikationsart, Dosis und Dauer der Verabreichung abhängig war. LARSON et al. (1993; 1995 a) fanden dosisabhängig zytotoxische Erscheinungen, die bei einer einmaligen Verabreichung an männliche F344 Ratten per Sonde ab 180 mg/kg Körpergewicht, nach 4-tägiger Applikation ab 90 mg/kg Körpergewicht auftraten. Das Ausmaß der Leberzellnekrosen verringerte sich im Laufe der Verabreichung. Nach dreiwöchiger Behandlung mit 90 mg/kg waren keine Veränderungen mehr ersichtlich. Bei weiblichen Ratten waren die zytotoxischen Effekte weniger ausgeprägt als bei männlichen Tieren (LARSON et al., 1995 a; 1995 b). Die Auswirkungen einer Applikation von Chloroform über das Trinkwasser waren mit nur vereinzelt nekrotischen Hepatozyten bei 900 bzw. 1800 ppm wesentlich geringer als bei der Verabreichung mittels Sonde (LARSON et al., 1995 a). Der Grund dafür liegt nach PEREIRA (1994) in einer Überlastung der Entgiftungsfunktionen der Leber bei der plötzlichen Anflutung großer Mengen an Chloroform nach Verabreichung per Sonde.

2.6.2.2 Hepatokarzinogene Wirkung von Chloroform

Chloroform wurde in verschiedenen Studien keine oder eine nur geringe Genotoxizität zugesprochen (BRIDGES et al., 1981; PEREIRA et al., 1982; REITZ et al., 1982; GEMMA et al., 1996).

2.6.2.2.1 Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation

1976 wurde vom National Cancer Institut (NCI) eine Studie durchgeführt, in der Osborne-Mendel-Ratten über 78 Wochen mit Chloroform mittels Sonde behandelt wurden (männliche Tiere 90 bzw. 180 mg/kg, weibliche Tiere 100 bzw. 200 mg/kg Körpergewicht). Bei männlichen Tieren wurde bei der hohen Dosierung eine Prävalenz an hepatozellulären Karzinomen von 2 %, bei weiblichen Tieren von 0 % ermittelt. REUBER (1979) fand bei einer Neubeurteilung der histologischen Schnitte bei 4 % der männlichen Ratten bei der hohen Dosierung hepatozelluläre Karzinome, bei weiblichen Ratten lag die Prävalenz bei beiden Dosierungen bei 5 %. Zusätzlich entdeckte er hyperplastische Knötchen und Gallengangskarzinome. Eine 104-wöchige Verabreichung von Chloroform im Trinkwasser (1800 ppm) führte nach JORGENSEN et al. (1985) bei männlichen Osborn-Mendel Ratten nicht zur Entstehung von Lebertumoren. TUMASONIS et al. (1985) berichteten von einem signifikanten Anstieg der Prä-

valenz an neoplastischen Knötchen bei weiblichen Wistar-Ratten nach der Applikation von Chloroform über das Trinkwasser (durchschnittlich 180 mg/kg Körpergewicht) über die gesamte Lebensdauer der Tiere.

2.6.2.3 Promovierende Wirkung von Chloroform

Über die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen in Initiations-Promotions-Protokollen bestehen in der Literatur keine Angaben.

2.6.2.3.1 FAH und FAH-Typen

Uneinigkeit herrscht in der Literatur über die Entstehung von FAH in Folge einer Verabreichung von Chloroform. DEML und OESTERLE (1987) stellten nach 11-wöchiger Chloroform-Behandlung (2x/Woche) 21 Tage alter weiblicher Sprague-Dawley Ratten keine Erhöhung der FAH-Anzahl fest. Die vorherige Initiation mit Diethylnitrosamin (DEN) führte zu einer dosisabhängigen Steigerung (ab 100 mg/kg Körpergewicht) in Anzahl und Größe AT-Pase-negativer und GGT-positiver FAH (DEML und OESTERLE, 1985, 1987). Dem widersprechend konnten PEREIRA et al. (1982) in einem vergleichbaren Protokoll bei männlichen, 9 Wochen alten Sprague-Dawley Ratten keine Unterschiede in der Anzahl GGT-positiver FAH zwischen DEN und Chloroform-behandelten Tieren und den entweder nur mit DEN oder nur mit Chloroform-behandelten Ratten feststellen. REDDY et al. (1992) beschrieben nach Trinkwasser-Applikation bei männlichen F344 Ratten sogar eine inhibierende Wirkung des Chloroforms auf mit DEN initiierte und durch Phenobarbital promovierte FAH. Die Ursache soll in einer Zerstörung der initiierten Hepatozyten vor Beginn der durch Phenobarbital induzierten klonalen Expansion liegen. In späteren Stadien dagegen sollen die FAH eine Resistenz gegenüber den zytotoxischen Wirkungen Chloroforms aufweisen.

Über die während der Chloroform-Verabreichung entstehenden FAH-Typen liegen keine Informationen vor.

2.6.2.3.2 Zellproliferation und Apoptose

LARSON et al. (1993, 1995 a, 1995 b) ermittelten das Proliferationsverhalten im extrafokalen Lebergewebe männlicher und weiblicher F344 Ratten nach einmaliger sowie 4-tägiger und 3-wöchiger Applikation von Chloroform per Sonde (5 x/Woche) und über das Trinkwasser. Die einmalige Gabe von 477 mg/kg Körpergewicht mittels Sonde an männliche Ratten resultierte in einer 16-fachen Steigerung des Labelling-Index (LI) gegenüber den Kontrollen. Nach 4-tägiger Verabreichung war der LI panlobulär dosisabhängig ab 90 bzw. 100 mg/kg Körper-

gewicht (männlich bzw. weiblich), nach 3 Wochen erst ab Dosierungen von 180 bzw. 200 mg/kg Körpergewicht statistisch signifikant erhöht. Wurde Chloroform über das Trinkwasser (bis 1800 ppm) an männliche F344 Ratten verabreicht, waren bei keiner Dosierung Unterschiede im LI zwischen behandelten Ratten und Kontrolltieren zu erkennen. Ebenso ergaben sich nach einmaliger Applikation (477 mg/kg Körpergewicht) von Chloroform mittels Sonde an männliche Osborne-Mendel Ratten keine Änderungen im LI (TEMPLIN et al., 1996).

An Wistar Ratten wurden keine Proliferationsmessungen nach Verabreichung von Chloroform durchgeführt. Weiterhin liegen keine Erkenntnisse über das Proliferations- und Apoptoseverhalten von FAH vor.

2.6.2.3.3 Mechanismus der Tumorpromotion

Die Gabe von Chloroform führt nur in Dosierungen und Applikationsformen, die zytotoxische Erscheinungen und nachfolgend regenerativ gesteigerte Zellproliferation hervorrufen, zur Entstehung von Lebertumoren. Diese enge Beziehung führte unter der Annahme, daß die im Langzeitversuch verwendeten Osborne-Mendel-Ratten und die von LARSON et al. (1993, 1995 a, 1995 b) genutzten F344 Ratten biologisch ähnlich reagieren, zu der Hypothese, daß die krebserregende Wirkung des Chloroforms nicht auf einem genotoxischen, sondern auf einem zytotoxischen Wirkmechanismus beruht (REITZ et al., 1982; LARSON et al., 1993 a; BUTTERWORTH et al., 1995). Die Karzinogenese ist Folge der kompensatorisch gesteigerten Zellproliferation und der damit erhöhten Wahrscheinlichkeit von DNA-Schäden (COHEN und ELLWEIN, 1991). Untersuchungen von TEMPLIN et al. (1996) weisen auf eine vergleichbare Empfindlichkeit von Osborne-Mendel-Ratten und F344 Ratten, jedenfalls bezüglich der nephrotoxischen Wirkung von Chloroform, hin.

2.6.2.4 Wirkung von Chloroform auf die Leber alter Ratten

Studien, in denen die promovierende Wirkung von Chloroform auf die Leber alter Wistar Ratten Gegenstand der Untersuchung war, wurden bisher noch nicht durchgeführt. Untersuchungen von STAATS et al. (1990) aber zeigten, daß Chloroform in alten männlichen Osborne-Mendel-Ratten (18 bis 20 Monate) in vergleichbaren Raten wie in jungen Ratten (7 bis 10 Wochen alt) metabolisiert wird.

2.6.3 Wyeth-14,643

Wyeth-14,643 ([4-chloro-6(2,3-xylidino)2-pyrimidinylthio]acetic acid) ist eine Substanz aus der Gruppe der Peroxisomenproliferatoren, einer Gruppe von strukturell unterschiedlichen industriellen und pharmazeutischen Chemikalien wie Weichmachern, Herbiziden und den Blutlipidgehalt-senkenden Medikamenten. Allen gemein ist die Eigenschaft, die Anzahl und Größe der Peroxisomen in Zellen der exponierten Tiere zu steigern. Peroxisomen sind von einer Membran umgebene, zytoplasmatische Zellorganellen, die u. a. eine große Anzahl an Enzymen enthalten, die am Fettstoffwechsel beteiligt sind (z. B. β -Oxidation von Fettsäuren, Cholesterin-Metabolismus) (LOCK et al., 1989).

2.6.3.1 Allgemeine Wirkung von Wyeth-14,643 auf die Leber

Durch die Verabreichung von Wyeth-14,643 kommt es zu einer Vergrößerung der Leber, die über die Dauer der Exposition bestehen bleibt. Das Lebergewicht ist im Vergleich zu den Kontrollen bis zu vierfach erhöht (WADA et al., 1992; LAKE et al., 1993; MARSMAN et al., 1988; MARSMAN und POPP, 1994). Die Hepatomegalie ist einerseits durch eine Hypertrophie der Hepatozyten bedingt, die eine Folge der Peroxisomenproliferation darstellt, und andererseits durch eine Hyperplasie, die aus einer Steigerung der Zellproliferation resultiert. Die Hypertrophie der Hepatozyten wurde von WADA et al. (1992) in zentrolobulären Bereichen des Leberläppchens beobachtet. EACHO et al. (1991) ermittelten die stärkste Peroxisomenproliferation in periportalen Hepatozyten.

Die Applikation von Wyeth-14,643 (ab 50 ppm im Futter) führte zu einer überwiegend zentrolobulären Lipofuszin-Akkumulation (WADA et al., 1992). Nach CONWAY et al. (1989) stellt der Grad der Akkumulation von Lipofuszin einen Marker für die quantitative Vorhersage des karzinogenen Potentials von Peroxisomenproliferatoren dar.

2.6.3.2 Hepatokarzinogene Wirkung von Wyeth-14,643

Peroxisomenproliferatoren oder ihre Metabolite binden nicht an die DNA, haben sich in Mutagenitätstests als nicht-genotoxisch erwiesen (GLAUERT et al., 1984; GOEL et al., 1985) und besitzen nach CATTLEY et al. (1989) keine Initiationskapazität. Die Karzinogenität von Peroxisomenproliferatoren ist Folge ihrer promovierenden Eigenschaften (CATTLEY und POPP, 1989). Der Mensch ist, im Gegensatz zu Ratten und Mäusen, nicht für die karzinogene Wirkung von Peroxisomenproliferatoren empfänglich (BENTLEY et al., 1993).

2.6.3.2.1 Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation

Studien, in denen männliche F344 Ratten über längere Zeiträume kontinuierlich mit Wyeth-14,643 behandelt worden sind (1000 ppm im Futter), zeigen deutlich dessen hepatokarzinogene Wirkung. Nach 54 Wochen wiesen 90 % (CATTLEY und POPP, 1989), nach 16 Monaten 100 % (REDDY et al., 1979) der Tiere Karzinome auf (Kontrollen 0 %). MARSMAN und POPP (1994) fanden erstmals nach 37 Wochen bei einigen Tieren Adenome, deren Prävalenz und Anzahl pro Tier im Laufe der Exposition anstieg. Nach 52 Wochen lag eine Prävalenz an Adenomen von 95 % und an Karzinomen von 30 % vor.

2.6.3.3 Promovierende Wirkung von Wyeth-14,632

2.6.3.3.1 Hepatokarzinogene Wirkung in Initiations-Promotions-Protokollen

Eine 54-wöchige Verabreichung von Wyeth-14,643 nach Initiation mit Diethylnitrosamin steigerte die Prävalenz an Karzinomen auf 100 % im Vergleich zu 50 % bei den nur-initiierten und 90 % bei den nur-Wyeth-14,643 behandelten Tieren (CATTLEY und POPP, 1989).

2.6.3.3.2 FAH

Peroxisomenproliferatoren sollen FAH promovieren, die nicht durch die sonst erfolgreich eingesetzten Marker GGT oder GST-P identifizierbar sind (GLAUERT et al., 1986 a; RAO et al., 1986; HENDRICH et al., 1987). Die FAH weisen häufig einen ATPase-Defizit auf, was zum Nachweis genutzt werden kann (RAO et al., 1984). Die Datenlage zur Entstehung von FAH nach der Verabreichung von Wyeth-14,643 ist uneinheitlich. In der Untersuchung von MARSMAN und POPP (1994) entwickelten sich nach kontinuierlicher Applikation (1000 ppm im Futter über 22, 37 und 52 Wochen) FAH, deren Anzahl und Größe im Laufe der Behandlung anstiegen. In der Initiations-Promotions-Studie von CATTLEY und POPP (1989; 11 Wochen 1000 ppm) konnte keine Steigerung der Anzahl der FAH, sondern nur eine Vergrößerung der FAH beobachtet werden. Der prozentuale Anteil der FAH am Lebergewebe zeigte signifikant höhere Werte als in nur initiierten oder nur promovierten Tieren und stieg im Verlaufe der Verabreichung (CATTLEY und POPP, 1989; CATTLEY et al., 1994). GLAUERT et al. (1986 a) schilderten sowohl eine erhöhte FAH-Anzahl als auch eine Erhöhung des FAH-Volumens nach 6-monatiger Verabreichung von Wyeth-14,643 nach partieller Hepatektomie und Initiation mit Diethylnitrosamin (DEN). In den Lebern der Kontrolltiere, die kein DEN erhalten haben, war nur ein Anstieg in der Anzahl festzustellen. CATTLEY et al. (1994) konnten zeigen, daß die promovierende Wirkung von Wyeth-14,643 vom ange-

wendeten Initiator abhängig ist. Die Verwendung von 2-Aceylaminofluoren als Initiator führte - im Gegensatz zur Verwendung von DEN - nicht zur Erhöhung des prozentualen Anteils des von basophilen FAH eingenommenen Lebergewebes gegenüber den Kontrolltieren. Die Verteilung der FAH im Leberläppchen soll nach MARSMAN et al. (1988) keine Häufung in einer bestimmten Zone zeigen.

2.6.3.3.2.1 FAH-Typen

Übereinstimmend wird in der Literatur nach der Verabreichung von Wyeth-14,643, unabhängig davon, ob initiiert wurde oder nicht, vom Auftreten eines besonderen FAH-Typs aus großen Zellen mit homogen basophilem Zytoplasma berichtet (CATTLEY und POPP, 1989; CATTLEY et al., 1994; MARSMAN und POPP, 1994; MILLER et al., 1995). Histologisch ähneln diese homogen basophilen FAH den durch Peroxisomenproliferatoren induzierten Neoplasien (CATTLEY et al., 1991, 1994). MARSMAN und POPP (1994) beschrieben eine Regression der homogen basophilen FAH nach Beendigung der Behandlung bei gleichzeitig vermehrtem Auftreten von klarzelligen FAH. Daraus schlossen die Autoren, daß die homogen basophilen FAH den progressiven Phänotyp, die klarzelligen FAH den regressiven Phänotyp der durch Wyeth-14,643 verursachten FAH darstellen. ATPase-negative FAH dagegen persistierten nach Behandlungsende, wobei sich der prozentuale Anteil des von FAH eingenommenen Lebergewebes verringerte. MILLER et al. (1995) fanden in einer Initiations-Promotions-Studie mit DEN nach 22-wöchiger Verabreichung von Wyeth-14,643 zusätzlich zu den homogen basophilen FAH auch eosinophile FAH, die in den nur mit Wyeth-14,643 behandelten Tieren nicht vorlagen.

2.6.3.3.3 Zellproliferation und Apoptose

MARSMAN et al. (1988) konnten mittels Puls-Labeling bei männlichen F344 Ratten eine durch Wyeth-14,643 (1000 ppm im Futter) verursachte 4,4-fache Erhöhung des Labelling-Index (auf 8,8 %) am ersten Behandlungstag feststellen. Am vierten Tag der Verabreichung wurden dann wieder Werte auf Kontrollniveau gemessen. Übereinstimmend wird in der Literatur nach der Verwendung subkutaner Minipumpen von Labelling-Indizes berichtet, die sich nach einer initialen starken Erhöhung während der gesamten Exposition über Kontrollwerten befinden. Nach einer 1-wöchigen Applikation wurden in Abhängigkeit von Dosierung (50 bis 1000 ppm im Futter) und Rattenstamm 5,8- bis 13-fache Steigerungen über die Kontrollwerte ermittelt (MARSMAN et al., 1988, 1992; WADA et al., 1992; LAKE et al., 1993). Die zu späteren Zeitpunkten (bis zu 52 Wochen) ermittelten Labelling-Indizes lagen ebenfalls ober-

halb der Kontrollwerte. Die angegebenen Werte befanden sich zwischen dem 3,5- und 12-fachen der Kontrollwerte (MARSMAN et al., 1988; WADA et al., 1992; LAKE et al., 1993; MARSMAN und POPP, 1994). WADA et al. (1992) legten als Schwellendosis 50 ppm im Futter fest. Höhere Dosierungen (bis 1000 ppm) verursachten in dieser Studie keine weiteren Erhöhungen des LI. Nach der Beendigung der Behandlung fiel der LI wieder auf Kontrollwerte ab (MARSMAN und POPP, 1994).

Die Zellproliferationssteigerung findet nach MARSMAN et al. (1988), EACHO et al. (1991) und WADA et al. (1992) in den periportalen Bereichen des Leberläppchens statt.

In homogen basophilen FAH, die nach 37- bzw. 52-wöchiger Verabreichung von 1000 ppm im Futter in männlichen F344 Ratten entstanden sind, lag der LI bei ca. 60 % und damit 5,5-fach über dem LI im extrafokalen Lebergewebe (MARSMAN und POPP, 1994). MILLER et al. (1995) berichteten von einem LI in homogen basophilen FAH von 36 % nach 22-wöchiger Applikation.

Über die Auswirkung von Wyeth-14,643 auf die Apoptoserate liegen nur geringe Informationen vor. Die Untersuchung der Apoptoserate nach der Applikation von Wyeth-14,643 in einer Studie von MARSMAN et al. (1992) erbrachte außer einer 3,3-fachen Erhöhung im extrafokalen Lebergewebe am Endpunkt der Studie nach 22 Wochen keine von den Kontrollwerten abweichenden Ergebnisse. In einem *in vitro* Modell hemmte Nafenopin, ein nicht-genotoxisches Hepatokarzinogen aus der Gruppe der Peroxisomenproliferatoren, sowohl die spontan vorkommenden als auch die durch TGF β 1 induzierten Apoptosen (BAYLY et al., 1994; JAMES und ROBERTS, 1996). Nach ROBERTS et al. (1995) soll Nafenopin auch *in vivo* die Apoptose unterdrücken.

2.6.3.3.4 Mechanismus der Tumorpromotion

Die Untersuchung des promovierenden Mechanismus von Peroxisomenproliferatoren war Gegenstand einer großen Anzahl verschiedenartiger Studien, aus denen unterschiedliche Ergebnisse hervorgegangen sind.

Peroxisomen enthalten Oxidasen, die H₂O₂ produzieren, und Katalasen, die H₂O₂ zu H₂O und O₂ abbauen (CHANCE et al., 1979). Die Behandlung von Ratten mit Peroxisomenproliferatoren führte zu einem großen Anstieg in der Aktivität des H₂O₂-produzierenden Enzymes Acyl-CoA-Oxidase (REDDY und LALWANI, 1983), dem ersten Enzym der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren. Die Aktivität der detoxifizierenden Enzyme dagegen war nur gering gesteigert (peroxisomale Katalase (MOODY und REDDY, 1978)) oder gesenkt (Glutathionperoxidase (CONWAY et al., 1989)). Diese Imbalanz zwischen dem Auf- und Abbau

von H₂O₂ führte zu der Hypothese, daß oxidativer Streß für die karzinogene Wirkung von Peroxisomenproliferatoren verantwortlich sein könne (REDDY et al., 1980; REDDY und LALWANI, 1983). CONWAY et al. (1989) verglichen Wyeth-14,643 mit dem schwächeren Karzinogen DEHP (Di(2ethylhexyl)phthalate), das auch zu den Peroxisomenproliferatoren gehört, und schlossen aus den ähnlichen Effekten beider Substanzen auf die H₂O₂-abbauenden Enzyme und die Konzentration an Glutathion, daß diese Faktoren nicht für die unterschiedlichen karzinogenen Wirkungen verantwortlich sind. Auch MARSMAN et al. (1988) stellten in dem Vergleich von DEHP mit Wyeth-14,643 eine nur geringe Korrelation zwischen dem Grad der Peroxisomenproliferationssteigerung und dem karzinogenen Potential der beiden Substanzen fest. Da Wyeth-14,643 im Gegensatz zu DEHP in der Lage ist, die Zellproliferationsrate dauerhaft zu erhöhen, sahen die Autoren einen Zusammenhang zwischen der Dauer der Induktion der Zellproliferation und der durch Peroxisomenproliferatoren verursachten Karzinogenese. Wyeth-14,643 soll spontan initiierte Hepatozyten promovieren (MARSMAN und POPP, 1994). Über den Mechanismus, der die Steigerung der Zellproliferation hervorruft, liegen verschieden Erkenntnisse vor. Durch die Verabreichung von Wyeth-14,643 wird in Hepatozyten und im Plasma der exponierten Tiere der HGF („hepatocyte growth factor“-) Spiegel gesenkt (MOTOKI et al., 1997). HGF stimuliert die Proliferation normaler Hepatozyten (NAKAMURA et al., 1984), wirkt aber in neoplastischen Zellen zellteilungshemmend (SHIOTA et al., 1992). Der induzierte Mangel an HGF verleiht so neo- und präneoplastischen Zellen einen Wachstumsvorteil (MOTOKI et al., 1997).

ROLFE et al. (1997) nahmen an, daß der TNF α („tumor necrosis factor α “) an der durch Peroxisomenproliferatoren hervorgerufenen Steigerung der Zellproliferation und der Hemmung der Apoptose beteiligt ist. ROSE et al. (1997) vermuteten, daß die Kupffer-Zellen, die residenten Makrophagen der Leber, eine entscheidende Rolle in der durch Wyeth-14,643 vermittelten Zellproliferationssteigerung der Hepatozyten spielen. Diese Vermutung basierte auf dem Befund, daß eine Inaktivierung der Kupffer-Zellen eine komplette Hemmung der Zellproliferation bewirkte. Weiterhin wurde die durch Wyeth-14,643 induzierte Erhöhung des Lebermitogens TNF α durch Inaktivierung der Kupffer-Zellen blockiert. Unterstützt werden die Befunde durch Untersuchungen von RUSYN et al. (1998), die eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B („nuclear factor κ B“), eines zentralen Faktors in der TNF α -Produktion, feststellen konnten.

Die Wirkung von Wyeth-14,643 wird durch einen Rezeptor, den „peroxisome proliferator-activated receptor α “ (PPAR α), vermittelt. In Versuchen an transgenen PPAR α -null-Mäusen konnte die Beteiligung von PPAR α an der Aktivierung der Peroxisomenproliferation, der

Steigerung der Zellproliferation und der Karzinogenese nachgewiesen werden (LEE et al., 1995; PETERS et al., 1997). ROBERTS et al. (1998) konnten die Beteiligung des PPAR α an der Hemmung der Apoptose in kultivierten Rattenhepatozyten belegen.

Wyeth-14,643 verstärkt die Empfänglichkeit der hepatischen DNA für Schädigungen durch genotoxische Substanzen wie N-Nitrosodimethylamin (HAYASHI et al., 1995).

2.6.3.4 Wirkung von Wyeth-14,643 auf die Lebern alter Ratten

CATTLEY et al. (1991) untersuchten die Wirkung einer 22-wöchigen Exposition mit Wyeth-14,643 (500 und 1000 ppm im Futter) auf die Lebern junger (2 Monate) und alter (15 Monate) männlicher F344 Ratten. Der prozentuale Anteil der Tiere mit Tumoren pro Gruppe unterschied sich nicht statistisch signifikant, alte Ratten wiesen aber pro Leber eine 5 bzw. 7 mal höhere Anzahl an Tumoren auf als junge Ratten. In beiden Gruppen fanden sich homogen basophile FAH, die bei alten Ratten einen höheren Volumenanteil ausmachten als bei jungen Ratten. In der Leber alter Ratten trat zusätzlich ein weiterer FAH-Typ auf, der aus kleinen Hepatozyten mit „heterogen“ gefärbtem basophilen Zytoplasma zusammengesetzt war. Dieser FAH-Typ kam auch bei Kontrolltieren vor und wurde im Volumenanteil nicht durch Wyeth-14,643 beeinflusst. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, die karzinogene Wirkung von Wyeth-14-643 auf der Promotion spontan initiiertes Hepatozyten beruht, wobei in der Leber verschiedene Subpopulationen an initiierten Zellen vorkommen, die eine unterschiedliche Empfänglichkeit für promovierende Substanzen besitzen. Die höhere Empfindlichkeit alter Ratten soll auf der Tatsache beruhen, daß in der Leber alter Ratten eine höhere Anzahl spontan initiiertes Hepatozyten vorhanden ist.

2.6.4 Ethinylestradiol

Ethinylestradiol ist ein synthetisches Steroidhormon, das nach oraler Verabreichung 50 mal stärker wirkt als natürliches Östrogen. In der Humanmedizin findet es als Inhaltsstoff von Kontrazeptiva Verwendung.

2.6.4.1 Allgemeine Wirkung von Ethinylestradiol auf die Leber

Übereinstimmend wird in der Literatur als Folge einer Ethinylestradiol-Gabe von einem Anstieg des absoluten Lebergewichts (1,2- bis 1,4-fach) bei gleichzeitiger Depression der Körpergewichtsentwicklung bei jungen Ratten berichtet (FISCHER et al., 1984; OCHS et al., 1986; MACHISHI et al., 1995). Die Ursache für die Erhöhung des Lebergewichts ist eine

Hyperplasie, die auf einer Steigerung der Zellproliferation beruht (FISCHER et al., 1984; OCHS et al., 1986).

MAYOL et al. (1992) stellten bei Sprague-Dawley Ratten, nicht aber bei F344 Ratten, zytotoxische Wirkungen von Ethinylestradiol (10 ppm im Futter) in Form einer Vakuolisierung des Zytoplasmas periportal Hepatozyten fest. Zusätzlich fanden die Autoren nach 6- bzw. 9-monatiger Applikation, allerdings nur bei Sprague-Dawley Ratten, diffuse hyperplastische, GGT-positive Areale aus basophilen Hepatozyten in periportalen Regionen des Leberläppchens.

MAYOL et al. (1991) beschrieben in einer Initiations-Promotions-Studie nach einjähriger Exposition (0,5mg/kg) von Sprague-Dawley Ratten Gallengangshypertrophie und -hyperplasie.

2.6.4.2 Hepatokarzinogene Wirkung von Ethinylestradiol

Ethinylestradiol ist ein Tumorpromotor in der Rattenleber, in Bezug auf die Initiationskapazität Ethinylestradiols herrscht aber Uneinigkeit. Ethinylestradiol zeigt in Standard-Mutagenitätstests keine Mutagenität (LANG und REDMANN, 1979) und besitzt nach MAYOL et al. (1991) keine initiiierende Eigenschaften. GHIA und MERETO (1989) dagegen wiesen Ethinylestradiol nach der Durchführung eines Initiations-Promotions-Protokolls auch eine initiiierende Wirkung zu. Der Nachweis von DNA-Addukten nach der Verabreichung von Ethinylestradiol (SHIMAMURA et al., 1992) unterstützt dieses Ergebnis.

2.6.4.2.1 Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation

Eine 12-monatige, alleinige Verabreichung von Ethinylestradiol führte zur Entstehung von Leberkrebs. Bei weiblichen Wistar Ratten betrug die Karzinom-Prävalenz bei einer Dosierung von 0,075 mg/d 8,1 % (SHIMOMURA et al., 1992) bzw. 8,7 % (OGAWA et al., 1995), bei 0,75 mg/d 38,5 % (OGAWA et al., 1995) und bei 0,15 mg/d 30,8 % (MACHISHI et al., 1995). Nach ungefähr 2-jähriger Applikation (0,5 mg/kg Körpergewicht 3x/Woche) an Albino-Wistar Ratten wiesen 70,9 % der Tiere Tumoren in der Leber auf. Es waren keine Geschlechtsunterschiede ersichtlich (MACHNIK et al., 1983).

2.6.4.3 Promovierende Wirkung von Ethinylestradiol

2.6.4.3.1 Hepatokarzinogene Wirkung in Initiations-Promotions-Protokollen

Sprague-Dawley Ratten entwickelten nach 8-monatiger Verabreichung (10 ppm im Futter) nach Initiation mit Diethylnitrosamin (DEN) zu 100 % Karzinome. Die nur initiierten Tiere wiesen eine Tumor-Prävalenz von 25 % auf (MAYOL et al., 1991).

2.6.4.3.2 FAH

MAYOL et al. (1991) schilderten nach Initiation mit DEN die Entwicklung von GST-P-positiven FAH nach 4-monatiger Verabreichung von Ethinylestradiol (10 ppm im Futter) an Sprague-Dawley Ratten. Der Anteil der FAH-tragenden Tiere und die Anzahl an FAH pro Tier wurden durch Ethinylestradiol nicht signifikant beeinflusst, die durchschnittliche Fläche der FAH lag aber signifikant über der nur initiierten Gruppe (2,6-fach bei männlichen, 2,9-fach bei weiblichen Tieren). In einem ähnlichen Protokoll steigerte sich nach der Applikation vom 2,5 µg/d auch die FAH-Anzahl (YAGER et al., 1986). GHIA und MERETO (1989) fanden in einer Studie, in der weibliche Sprague-Dawley Ratten und F344 Ratten nach Initiation mit 2-Acetylaminofluoren und Tetrachlorkohlenstoff 6 Wochen lang Ethinylestradiol (10 ppm im Futter) erhalten haben, einen signifikanten Anstieg in der Anzahl GGT-positiver FAH. In dieser Studie erwiesen sich F344 Ratten als empfänglicher für die promovierende Wirkung von Ethinylestradiol.

Auch nach einer alleinigen Behandlung mit Ethinylestradiol entwickelten weibliche Wistar Ratten FAH. 100 % der Tiere wiesen, unabhängig von der Dosierung (0,075, 0,15 oder 0,75 mg/d), nach vier Monaten FAH auf (0 % bei den Kontrolltieren). Je höher die Dosierung war, desto früher traten FAH auf. Anzahl und Fläche der FAH steigerten sich im Laufe der Verabreichung (SHIMOMURA et al., 1992; MACHISHI et al., 1995; OGAWA et al., 1995). Auch Sprague-Dawley Ratten wiesen nach viermonatiger Verabreichung von Ethinylestradiol (2,5 µg/d) zu 100 % FAH auf (YAGER et al., 1986).

2.6.4.3.2.1 FAH-Typen

MAYOL et al. (1992) berichteten von großen hyperplastischen FAH, die sich nach sechs- bzw. neunmonatiger Behandlung von Sprague-Dawley Ratten mit Ethinylestradiol (10 ppm) entwickelten. Diese waren aus Zellen mit eosinophilem und klarem Zytoplasma zusammengesetzt und waren nicht durch die Marker GST und GGP nachzuweisen. Die von SHIMOMURA et al. (1992) und MACHISHI et al. (1995) nach 4 Monaten bei Wistar Ratten gefun-

denen FAH waren ebenfalls klarzellig/eosinophil-gemischt, waren aber GGT- und GST-P-positiv. In einem Initiations-Promotions-Protokoll von MAYOL et al. (1991) traten überwiegend klarzellige Herde auf.

2.6.4.3.3 Zellproliferation und Apoptose

Ethinylestradiol induziert initial eine transiente Steigerung der Zellproliferation mit maximalen Werten nach 1- bis 3-tägiger Verabreichung. In verschiedenen Studien wurden in Abhängigkeit von Dosierung und verwendetem Rattenstamm zwischen 4- und 20-fache Erhöhungen gemessen (OCHS et al. 1986; MAYOL et al., 1992; MACHISHI et al., 1995). Daraufhin fällt die Zellproliferationsrate wieder ab, wobei Ausmaß und Schnelligkeit des Abfalls in verschiedenen Studien unterschiedliche Dimensionen zeigten. Der Abfall auf das Kontrollniveau erfolgte nach MAYOL et al. (1992) und MACHISHI et al. (1995) nach 3 Tagen, nach OCHS et al. (1986) nach 7 Tagen und nach YAGER et al. (1986) nach 14 Tagen. MAYOL et al. (1991, 1992) sahen keinen Zusammenhang zwischen der akuten Hyperplasie und dem hepatokarzinogenen Effekt des Ethinylestradiols, da sie erst nach Langzeitexposition (8 Monate) ein Wachstum von FAH feststellen konnten.

Bei der Langzeitapplikation von Ethinylestradiol an Sprague-Dawley Ratten (0,5 mg/kg Körpergewicht) wurden nach 6 und 9 Monaten, nicht aber nach 3 Monaten, erhöhte Zellproliferationsraten gemessen. Bei männlichen Tieren stiegen die Werte kontinuierlich an, bei weiblichen Tieren dagegen stagnierten die Werte auf dem erhöhten Niveau (MAYOL et al., 1992). Die nach 6 Monaten gemessenen Zellproliferationsraten lagen 3- bis 4-fach niedriger als die während der akuten Hyperplasie ermittelten Werte. Auch MACHISHI et al. (1995) berichteten von dauerhaft erhöhten Zellproliferationsraten bei weiblichen Wistar Ratten nach der Verabreichung von 1,5 mg/d, wobei maximale Werte nach zweimonatiger Verabreichung ermittelt wurden.

YAGER et al. (1994) berichteten dagegen von einer Inhibition der Zellproliferation nach 4- und 7-wöchiger Exposition weiblicher Lewis Ratten mit Ethinylestradiol (2,5 und 5 µg/d). Die Autoren führten die Differenzen in den Ergebnissen auf die Verwendung unterschiedlich hoher Dosierungen zurück und vermuteten, daß die von MAYOL et al. (1992) ermittelten hohen Zellproliferationsraten Folge einer zytotoxischen Schädigung der Hepatozyten sein könnten.

MAYOL et al. (1992) fanden die Zellproliferation während der akuten Hyperplasie panlobulär gesteigert. Nach der Langzeitapplikation war die Hauptproliferationszone bei Sprague-Dawley Ratten die Zone 2, bei F344 Ratten die Zone 1. Parallel zu der Erhöhung der Zellpro-

liferation wiesen die Autoren nach dreitägiger Verabreichung eine gesteigerte Apoptoserate nach, die daraufhin wieder auf Kontrollwerte abfiel.

Als Schwellendosis für die Hyperplasie legten OCHS et al. (1986) 1 µg/kg Körpergewicht bei subkutaner Injektion und 5-10 µg/kg Körpergewicht bei oraler Aufnahme fest.

Die klarzellig/eosinophil-gemischten FAH und die basophilen hyperplastischen periportalen Areale, die MAYOL et al. (1992) nach 6- bzw. 9-monatiger Verabreichung bei Sprague-Dawley Ratten aufdeckten, zeichneten sich nach Angabe der Autoren durch eine hohe Anzahl BrdU-gelabelter Hepatozyten aus, ohne daß genaue Werte aufgeführt wurden.

2.6.4.3.4 Mechanismus der Tumorpromotion

SHI und YAGER (1989, 1990) vermuteten, daß die durch Ethinylestradiol vermittelte Steigerung der Zellproliferation im Zusammenhang mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren steht. Die Verabreichung von Ethinylestradiol erhöhte die Spiegel von Serumfaktoren, die vermutlich der EGF („epidermal growth factor“)/TGF α („transforming growth factor α “)-Familie angehören und sich stimulierend auf die DNA-Synthese auswirkten. Ethinylestradiol hob die Ansprechbarkeit von Hepatozyten auf EGF und steigerte die Anzahl der EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche der Hepatozyten.

Weiterhin ist an der mitogenen Wirkung des Ethinylestradiols ein spezifischer Östrogenrezeptor beteiligt (FISCHER et al., 1984). VICKERS et al. (1989) ermittelten nach Initiation mit Diethylnitrosamin und 40-wöchiger Promotion mit Ethinylestradiol eine dauerhafte 2- bis 3-fache Erhöhung der Anzahl nukleärer und zytosolischer Östrogenrezeptoren.

OGAWA et al. (1995) maßen nach der Verabreichung von Ethinylestradiol erhöhte Spiegel von 8-Hydroxydeoxyguanosin, einem Marker für durch freie Radikale induzierte DNA-Schäden, und vermuteten eine sekundär mutagene Wirkung des Ethinylestradiols.

Die karzinogene Wirkung des Ethinylestradiols kann durch die antiöstrogen wirkende Substanz Tamoxifen vollkommen inhibiert werden, wogegen die DNA-Addukt-Bildung nicht beeinflußt wird (SHIMOMURA et al., 1992).

Die promovierende Wirkung Ethinylestradiols auf die Leber alter Ratten war bisher noch nicht Gegenstand von Untersuchungen.

2.6.5 PCB 126

Die Gruppe der Polychlorierten Biphenyle (PCB), zu denen auch PCB 126 (3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl) gehört, umfaßt 209 chemische Verbindungen, die sich in Anzahl und

Position der Chloratome an den Phenylringen unterscheiden. Die Toxizität von PCB zeigt eine Strukturabhängigkeit. Generell sind coplanare PCB, die eine Chlorierung in meta- und para-Stellung des Phenylrings besitzen, toxischer als non-coplanare mit einer Chlorierung in ortho-Stellung (POLAND und GLOVER, 1977). Das coplanare PCB 126 ist eines der am stärksten wirksamen PCB (KRISHNAN und SAFE, 1993).

PCB wurden früher meist als Gemische (z. B. Aroclor, Chlophen) u. a. in Pestiziden, als Kühlflüssigkeiten in hydraulischen Systemen, als Weichmacher in Farben und Plastik sowie als Dielektrikum in Kondensatoren und Transformatoren eingesetzt. Die Produktion von PCB ist seit den siebziger Jahren verboten, aber aufgrund des Vorkommens in veralteten Industrieanlagen und der langen Halbwertszeit persistieren PCB auch heute noch in der Umwelt, so daß es zur Exposition von Mensch und Tier kommen kann (SAFE, 1990).

2.6.5.1 Allgemeine Wirkung von PCB 126 auf die Leber

Eine 13-wöchige Verabreichung von PCB 126 an Sprague-Dawley Ratten führte dosis- und geschlechtsabhängig zu einer 1,2- bis 1,6-fachen Erhöhung des relativen Lebergewichts (CHU et al., 1994). In einem Protokoll mit partieller Hepatektomie und Initiation mit N-Nitrosodiethylamin fand sich nach Verabreichung von PCB 126 über 20 bzw. 52 Wochen (10 mg/kg Körpergewicht/Woche) eine 1,8- bzw. 2,3-fache Steigerung des relativen Lebergewichts (HAAG-GRÖNLUND et al., 1997).

Nach der Applikation von PCB 126 wurden hepatotoxische Erscheinungen beobachtet, die sich in einer Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums, mitochondrialen Abnormitäten, einer erhöhten Anzahl an Peroxisomen und intrazytoplasmatischen Fett-Tröpfchen sowie einer Lipofuszin-Akkumulation äußerten (MACLELLAN et al., 1994). CHU et al. (1994) fanden in den Lebern männlicher Tiere milde zytoplasmatische Vakuolisierungen in Zone 3 und 2, die Hepatozyten weiblicher Ratten wiesen Pyknosen und Hypertrophie in Zone 1 und 2 auf. HEMMING et al. (1995) berichteten nach der Gabe von PCB 126 über 20 bis 52 Wochen nach Initiation von fokalen hämorrhagischen Nekrosen, regenerativer Hyperplasie, mehrkernigen Riesenzellen und Gallengangsproliferation. Zusätzlich ermittelten die Autoren eine Aktivierung Cytochrom P450-abhängiger Monooxygenasen. Als Folge der hepatozellulären Schädigung kam es zu einem Anstieg von Leberenzymen im Blutplasma (HAAG-GRÖNLUND et al., 1997).

2.6.5.2 Hepatokarzinogene Wirkung

Eine große Anzahl an Studien hat für PCB weder mutagene noch genotoxische Eigenschaften aufgezeigt (SCHOENY et al., 1979; SCHOENY, 1982; PROBST et al., 1981; WHYSNER et al., 1998). Die karzinogene Wirkung von PCB wird daher überwiegend als Folge der promovierenden Eigenschaften angesehen. WONG et al. (1979) und SARGENT et al. (1989) dagegen sprechen PCB eine genotoxische Wirkung zu, da sie durch PCB verursachte Strangbrüche der DNA und DNA-Addukte nachweisen konnten.

2.6.5.2.1 Hepatokarzinogene Wirkung nach Langzeitapplikation

Mit PCB 126 als Einzelsubstanz wurden bisher keine Langzeitversuche durchgeführt.

Verschiedene Gemische aus PCB, die bis zu 24 Monate an Ratten verabreicht wurden, haben sich als karzinogen erwiesen. Der Anteil an Tieren mit hepatozellulären Neoplasien (überwiegend Adenome) differierte zwischen den verschiedenen Gemischen, stieg mit der Dosierung und war geschlechtsabhängig. Weibliche Tiere wiesen höhere Prävalenzen auf als männliche Tiere (KIMBROUGH et al., 1975; NORBACK und WELTMANN, 1985; MAYES et al., 1998).

2.6.5.3 Promovierende Wirkung von PCB 126

2.6.5.3.1 Hepatokarzinogene Wirkung in Initiations-Promotions-Protokollen

Nach 52-wöchiger Behandlung mit PCB 126 (10 mg/kg Körpergewicht/Woche) nach partieller Hepatektomie und Initiation traten in den Untersuchungen von HAAG-GRÖNLUND et al. (1997) erstmals Karzinome auf. Die Verabreichung des PCB-Gemisches Aroclor 1254 nach Initiation erhöhte die Prävalenz hepatozellulärer Karzinome 4-fach gegenüber der nur initiierten Gruppe (PRESTON et al., 1981).

2.6.5.3.2 FAH

Die Behandlung weiblicher Sprague-Dawley Ratten mit PCB 126 (10 µg/kg Körpergewicht 1x/Woche) über 20 Wochen führte weder zu einer Erhöhung der Anzahl GST-P-positiver FAH noch des Anteils der FAH am Lebergewebe (HAAG-GRÖNLUND et al., 1997). Bei zusätzlicher vorheriger Initiation mit Diethylnitrosamin (DEN) wurde eine Steigerung des Volumenanteils (2,8- bis 8-fach) sowie ein Anstieg in der Anzahl der FAH/cm³ und der Größe der FAH beobachtet (HEMMING et al., 1995; BAGER et al., 1997; HAAG-GRÖNLUND,

1997). Der Volumenanteil GGT-positiver FAH betrug in DEN-initiierten und PCB 126-promovierten (100 µg/kg Körpergewicht/Woche) Lebern 23 % (HEMMING et al., 1993). Verschiedene andere PCB und ihre Gemische erhöhten nach Initiation, z. T. auch nach alleiniger Verabreichung, in Abhängigkeit von ihrer chemischen Struktur Anzahl, Größe und Volumenanteil von FAH (DEML und OESTERLE, 1982, 1987; BUCHMANN et al., 1991). Die Promotion ATPase-negativer FAH durch Clophen A50 zeigte in weiblichen Tieren stärkere Ausmaße als in männlichen Tieren (DEML und OESTERLE, 1982), womit eine gute Korrelation zu der höheren Tumor-Prävalenz bei weiblichen Tieren nach Langzeitverabreichung bestand.

2.6.5.3.2.1 FAH-Typen

Eine Klassifikation von FAH wurde nur in Studien vorgenommen, in denen PCB-Gemische getestet wurden. PRESTON et al. (1981) und WARD (1985) berichteten von der Promotion eosinophiler FAH durch PCB. MAYES et al. (1998) fanden zu gleichen Teilen eosinophile, klarzellige und gemischtzellige FAH.

2.6.5.3.3 Zellproliferation und Apoptose

In der Literatur sind keine Studien zu finden, in denen Messungen der Zellproliferation und der Apoptose nach Verabreichung von PCB 126 durchgeführt wurden.

In einer Initiations-Promotions-Studie von DEML und OESTERLE (1982) wurde nach 24-stündiger Verabreichung des PCB-Gemisches Clophen A50 ein Mitose-Index gemessen, der bei weiblichen Tieren nicht, bei männlichen Tieren achtfach erhöht war. Messungen nach 48-stündiger und 7-tägiger Behandlung ergaben dagegen Werte auf Kontrollniveau. Die geschlechtsabhängigen Unterschiede im Zellproliferationsverhalten korrelierten nicht mit den promovierenden Effekten, die bei weiblichen Tieren ein stärkeres Ausmaß aufwiesen.

CHEN et al. (1995) sahen nach der Applikation zweier Tetrachlorobiphenyle die Hauptproliferationszone in Zone 1.

STINCHCOMBE et al. (1995) berichteten nach Initiation und Verabreichung von TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), einer den coplanaren PCB in Struktur und Wirkung verwandten Substanz, von einer Senkung der Apoptoserate im extrafokalen Lebergewebe, die statistisch aber keine Signifikanz zeigte. In GST-P-positiven FAH inhibierte TCDD deutlich die Apoptose. Nach 3 Tagen war die Apoptoserate auf 40 %, nach 115 Tagen auf 10 % der in den FAH der Kontrollen gemessenen Werte reduziert.

2.6.5.3.4 Mechanismus der Tumorpromotion

Die biologische und toxische Wirkung coplanarer PCB wird über den Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR) vermittelt. Die Bindungsstärke einer Substanz an den Rezeptor scheint positiv mit der Potenz der Substanz, toxische Effekte hervorzurufen, korreliert zu sein (BANDIERA et al., 1982).

HAAG-GRÖNLUND et al. (1997) sahen einen Zusammenhang zwischen der hepatotoxischen Wirkung und den karzinogenen Eigenschaften von PCB 126. Durch die Induktion der regenerativ gesteigerten Zellproliferation wird das klonale Wachstum initiiert Hepatozyten gefördert. BUCHMANN et al. (1991) hingegen unterstützten diese Ansicht nicht. Sie begründeten dieses damit, daß 3,3',4,4'-Tetrabromobiphenyl in niedrigen, aber promovierend wirkenden Dosierungen keine Hepatotoxizität zeigte.

Die Gabe von PCB induziert Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (BUCHMANN et al., 1991; HEMMING et al., 1995; HAAG-GRÖNLUND et al., 1997). BUCHMANN et al. (1991) und HEMMING et al. (1995) erkannten eine Korrelation zwischen der Induktion Cytochrom P450-abhängiger Monooxygenasen, der Hepatomegalie und der promovierenden Wirkung der verschiedenen PCB. Diese Beobachtung beruhte auf der Bewertung der Durchschnittswerte der Gruppen. Bei der Betrachtung der Einzeltiere konnten HEMMING et al. (1995) diese Korrelation nicht wiederfinden.

Die Verabreichung von PCB 126 führt zu einer Verringerung der interzellulären Kommunikation und somit zu einer Beeinträchtigung der Wachstumskontrolle. Innerhalb von FAH zeigt die Hemmung der interzellulären Kommunikation größere Ausmaße als im extrafokalen Lebergewebe. Fokale Zellen erhalten somit einen Wachstumsvorteil (BAGER et al., 1994, 1997).

Über die Wirkung von PCB 126 auf die Leber alter Ratten ist nichts bekannt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Für den Versuch wurden 180 männliche Wistar-Ratten (Chbb: THOM (SPF) von Boehringer Ingelheim Pharma KG, Biberach an der Riss) im Alter von 81-89 Wochen bei Versuchsbeginn verwendet. Die Tiere wurden einzeln in Drahtkäfigen des Typs DK III (BECKER & Co, Castrop-Rauxel) bei einer Raumtemperatur von 20-24°C und einer Luftfeuchte zwischen 30 % und 70 % gehalten. Es herrschte ein 12 Stunden Licht/12 Stunden Dunkelheit Rhythmus. Futter (Kliba-Haltungsdiät Ratte-Hamster-Maus, Firma Klingentalmühle AG, Kaiseraugst/Schweiz) und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.2 Versuchsdurchführung

Die 180 Ratten wurden mit Hilfe eines Randomisierungsverfahrens (Labordatenverarbeitung, Abt. Toxikologie, BASF Aktiengesellschaft) in 18 Gruppen zu 10 Tieren aufgeteilt. In dem Versuch gab es drei verschiedene Applikationsperioden (1, 4 und 13 Wochen), für die je eine Kontrollgruppe und fünf Substanzgruppen benötigt wurden. Die fünf Substanzen wurden wie folgt dosiert und appliziert:

Tab. 10: Substanzapplikation

| Substanz | Dosierung | Applikationsart | Vehikel | Applikationsfrequenz |
|--------------|-------------------------|------------------|-----------------|----------------------|
| PB | 500 ppm | oral | Futter | täglich |
| CHL | 150 bzw. 100 mg/kg KGW* | per Schlundsonde | Olivenöl DAB 10 | 5x pro Woche |
| Wyeth-14,643 | 1000 ppm | oral | Futter | täglich |
| EE | 10 ppm | oral | Futter | täglich |
| PCB 126 | 10 µg/kg KGW | s.c. | Olivenöl DAB 10 | 1x pro Woche |

DAB = Deutsches Arzneibuch; CHL = Chloroform; EE = Ethinylestradiol; KGW = Körpergewicht; PB = Phenobarbital; PCB = Polychloriertes Biphenyl

*die Dosierung wurde am 9. Tag der Studie wegen des Todes von 3 Tieren herabgesetzt

Sieben Tage vor der Tötung wurde unter Narkose mit Methoxyfluran (Metofane®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) die Implantation einer osmotischen Minipumpe (Modell 2 ML, Alza Corporation, Palo Alto, CA 943030) subkutan im Rückenbereich der Tiere vorgenommen. Die Pumpen enthielten 2 ml einer Lösung von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (Serva Feinbiochemikalien, Heidelberg) in physiologischer Kochsalzlösung (Konzentration 20 mg/ml). Pro Stunde wurden aus diesen Pumpen 10 µl der Lösung freigesetzt.

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Betäubung mit CO₂ durch Dekapitation. Um Einflüsse durch zirkadiane Schwankungen zu vermeiden, wurden sowohl der Pumpeneinbau als auch die Tötung zwischen 8.00 und 10.00 Uhr durchgeführt.

3.3 Histopathologische Präparation

3.3.1 Trimmen und Fixierung der Proben

Nach Tötung und Ausbluten der Tiere wurden die Lebern entnommen und gewogen. Je eine Scheibe von ca. 3 mm Dicke aus den Lobi dexter lateralis und dexter medialis wurde mit einem Stück Duodenum (Positivkontrolle für die BrdU-Färbung) in eine Kassette verbracht und für 24 Stunden in einer 4 %igen Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden die Proben in 70 %iger Ethanollösung gelagert.

3.3.2. Einbettung der Proben

Die Leberproben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3x 70 %, 2x 96 %, 2x 100 %) und reinem Xylol bei Raumtemperatur entwässert und entfettet und anschließend im Einbettautomaten Shandon 2L, Processor MK II, in Paraplast bei 60°C eingebettet.

3.3.3. Schneiden der Paraffinblöcke

Mit einem auf 3 µm Schnittdicke eingestellten Rotationsmikrotom (Microm HM 335) wurden von den gekühlten Paraffinblöcken (-4°) Gewebsschnitte in Serie hergestellt, die auf ATPS (1 %, 3-Aminopropyltriethoxysilan (Sigma))-beschichtete Objektträger (StarFrost*) aufgezogen wurden. Anschließend erfolgte eine Trocknung im Wärmeschrank bei 45°C für 24 Stunden.

Von jedem Block wurden 6 Schnitte gefertigt, von denen je einer für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung und für den immunhistologischen Nachweis des BrdU und des GST-P verwendet wurden. Zwei Schnitte dienten als Negativkontrollen der immunhistologischen Färbungen, ein weiterer als Reserve.

3.3.4 Färbungen

3.3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

- | | | |
|----------------------------------|-------|---------------------------------|
| 1. Entparaffinieren der Schnitte | Xylol | 1x 5 Minuten, 2x 0,5 Minuten |
|----------------------------------|-------|---------------------------------|

| | | |
|--|---------------------------|--------------------------------|
| 2. Rehydrieren | Ethanol (100 %) | 1x 1 Minute, 1x 0,5 Minuten |
| | Ethanol (96 %) | 0,5 Minuten |
| | Ethanol (70 %) | 0,5 Minuten |
| 3. Kernfärbung | Hämatoxylin nach Ehrlich | 5 Minuten |
| 4. Abspülen mit Leitungswasser | | |
| 5. Differenzieren | HCl-Alkohol (0,5 %) | 5 Sekunden |
| 6. Wässern | fließendes Leitungswasser | 5-10 Minuten |
| 7. Zytoplasmafärbung | Eosin (0,5 %) | 1 Minute |
| 8. Differenzieren | Essigsäure (0,1 %) | 5 Sekunden |
| 9. Dehydrieren | Ethanol (96 %) | 2x 1 Minute |
| | Ethanol (100 %) | 3x 1 Minute |
| | Xylol | 3x 5 Sekunden |
| 10. Eindecken im Eindeckauto- maten Promounter RCM 90 | Pertex und Deckgläschen | |

3.3.4.2 Immunhistologischer Nachweis des in die DNA eingebauten BrdUs

| | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------------|
| 1. Entparaffinieren | Xylol | 2x 5 Minuten |
| 2. Rehydrieren | Ethanol (100 %) | 2x 5 Minuten |
| | Ethanol (96 %) | 3 Minuten |
| | Ethanol (70 %) | 3 Minuten |
| 3. Wässern | Aqua dest. | 5 Minuten |
| 4. Antigendemaskierung | 0,1 % Protease (aus Streptomyces griseus; Sigma) in PBS (0,1M, pH 7,8, BioGenex) | 1 Minute bei Raumtemperatur |
| 5. Waschen | Leitungswasser, Aqua dest. | je 3 Sekunden |
| 6. Hemmung der endogenen Peroxidase | H ₂ O ₂ (6 %) | 5 Minuten |
| 7. Waschen | Leitungswasser, Aqua dest. | je 3 Sekunden |
| 8. Hydrolyse | HCl (4N) | 30 Minuten |
| 9. Waschen | Aqua dest. | 3x 3 Sekunden |
| 10. Umrahmen des Schnittes | Fettstift (Pap-pen, BioGenex) | |
| 11. Waschen | PBS (0,1M, pH 7,8, BioGenex) | 3 Sekunden |

| | | |
|---|--|-------------------------------|
| 12. Inkubation des primären Antikörpers | Maus anti-BrdU, monoklonaler Antikörper (BioGenex), Verdünnung 1:150, 300 µl/Schnitt | 24 Stunden bei 4°C |
| 13. Waschen | PBS (0,1M, pH 7,8, BioGenex) | 2x 3 Sekunden |
| 14. Inkubation des sekundären Antikörpers | biotinyliertes Kaninchen-anti-Maus IgG, monoklonaler Antikörper (BioGenex), Verdünnung 1:20, 300 µl/Schnitt | 20 Minuten bei Raumtemperatur |
| 15. Waschen | PBS (0,1M, pH 7,8, BioGenex) | 2x 3 Sekunden |
| 16. Enzymkomplex | Peroxidase-konjugiertes Streptavidin in PBS mit Carrier-Protein (BioGenex), Verdünnung 1:20, 300 µl/Schnitt | 20 Minuten bei Raumtemperatur |
| 17. Waschen | PBS (0,1M, pH 7,8, BioGenex) | 2x 3 Sekunden |
| 18. Chromogen | DAB (Liquid DAB Substrat Pack, Ready-to-use, BioGenex), 3 Tropfen | 5 Minuten |
| 19. Waschen | Aqua dest. | 2x 3 Sekunden |
| 20. Gegenfärbung | Hämatoxylin nach Mayer | 5 Minuten |
| 21. Bläuen | fließendes Leitungswasser | 5 Minuten |
| 22. Eindecken | Pertex und Deckgläschen | |

Die Schritte 14.-17. wurden im Färbeautomaten Opti Max plus-Automated Cell Staining System (BioGenex) durchgeführt.

3.3.4.3 Immunhistologischer Nachweis des GST-P

| | | |
|---------------------------|-------------------------------|--------------|
| 1. Entparaffinieren | Xylol | 2x 5 Minuten |
| 2. Rehydrieren | Ethanol (100 %) | 2x 5 Minuten |
| | Ethanol (96 %) | 3 Minuten |
| | Ethanol (70 %) | 3 Minuten |
| 3. Wässern | Aqua dest. | 5 Minuten |
| 4. Umrahmen des Schnittes | Fettstift (Pap-pen, BioGenex) | |

| | | |
|---|--|-------------------------------|
| 5. Inkubation des primären Antikörpers | Kaninchen anti-GST-P, polyklonaler Antikörper (BioGenex), 300 µl/Schnitt, Verdünnung 1:300 | 24 Stunden bei 4°C |
| 6. Waschen | PBS (0,1M, pH 7,8, BioGenex) | 2x 3 Sekunden |
| 7. Inkubation des sekundären Antikörpers | biotinyliertes Ziege-anti-Kaninchen IgG, polyklonaler Antikörper (BioGenex), Verdünnung 1:20, 300 µl/Schnitt | 20 Minuten bei Raumtemperatur |
| 8. Waschen | PBS (0,1M, pH 7,8, BioGenex) | 2x 3 Sekunden |
| 9. Enzymkomplex | Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin in PBS mit Carrier-Protein (BioGenex), Verdünnung 1:20, 300 µl/Schnitt | 20 Minuten bei Raumtemperatur |
| 10. Waschen | PBS (0,1M, pH 7,8, BioGenex) | 2x 3 Sekunden |
| 11. Chromogen | 1 Tablette Fast Red gelöst in 5 ml Naphtolphosphat in Tris-Puffer (BioGenex), 3 Tropfen | 3 Minuten |
| 12. Waschen | Aqua dest. | 2x 3 Sekunden |
| 13. Gegenfärbung | Hämatoxylin nach Mayer | 5 Minuten |
| 14. Bläuen | fließendes Leitungswasser | 5 Minuten |
| 15. Eindecken | erwärmte (45°C) Kaisers Glycerin-gelatine (Merck) und Deckgläschen | |
| 16. Versiegeln der Deckgläschen nach 24 Stunden | Pertex | |

Die Schritte 7.-10. wurden im Färbeautomaten Opti Max plus-Automated Cell Staining System (BioGenex) durchgeführt.

3.3.4.4 Negativkontrollen

Negativkontrollen der immunhistologischen Nachweise von BrdU und GST-P wurden von jedem Schnitt durch Inkubation mit PBS ohne den primären Antikörper gefertigt.

3.4. Auswertung der Schnitte

3.4.1 Hilfsmittel zur Auswertung

Die quantitative Auswertung der Schnitte wurde mit einem interaktiven Bildanalyse-System (Leica Q500MC) durchgeführt. Dieses System besteht aus einem Lichtmikroskop (Leica, DM RBE), einer aufgesetzten Videokamera (Sony, DXC-930P) und einem Rechner. Damit ist es möglich, die histologischen Schnitte auf einen Monitor zu projizieren und dort interaktiv zu bearbeiten. Es wurde bei der Messung der Zellproliferation in den FAH mit 100-facher Vergrößerung, bei der zonalen Proliferationsmessung im unveränderten Lebergewebe mit 200-facher Vergrößerung gearbeitet.

3.4.2 „Foci of altered hepatocytes“ (FAH)

3.4.2.1 Histologische Klassifizierung der FAH

Die im HE-Schnitt erkennbaren FAH wurden in Anlehnung an die internationale Nomenklatur (MOHR, 1997) in klarzellige, eosinophile, basophile und gemischtzellige FAH eingeteilt. Als Kriterien wurden tinktorielle Abweichungen des Zytoplasmas, Veränderungen der Zellmorphologie und der Form herangezogen.

Herde, die sowohl eosinophile als auch klarzellige Anteile besaßen, wurden dem FAH-Typ zugeordnet, der den größeren Anteil im Focus ausmachte. Weiterhin traten Herde auf, die nur anhand einer GST-P-Expression in der GST-P-Färbung identifiziert werden konnten, im HE-Schnitt aber aufgrund fehlender morphologischer und tinktorieller Abweichungen nicht vom Umgebungsgewebe abgegrenzt werden konnten. Diese Herde wurden NAH (nicht abgrenzbare Herde) genannt.

3.4.2.2 Meßparameter

Um das Wachstumsverhalten der verschiedenen FAH-Typen beurteilen zu können, wurden folgende Parameter herangezogen:

1. Anzahl an FAH pro cm^2 Leberfläche
2. Größe (durchschnittliche Zellzahl/FAH-Querschnitt)
3. Labelling-Index
4. Apoptose-Index

3.4.2.3 Zellproliferation in FAH

In die Messung der Zellproliferation in FAH wurden nur Herde mit einer Größe von über 10 Hepatozyten einbezogen. Bei der Auswertung erfolgte eine Trennung zwischen GST-P-positiven und GST-P-negativen FAH. Ein FAH wurde auch dann als GST-P-positiv eingeordnet, wenn nur ein Teilbereich eine GST-P-Expression zeigte.

Vorgehensweise bei der Messung der Zellproliferation in GST-P-positiven FAH:

1. Durchmustern der GST-P-Färbung
2. Nach Auffinden eines GST-P-exprimierenden FAH Aufsuchen der deckungsgleiche Lokalisation in dem in Serie gefertigten HE-Schnitt
3. Klassifikation des FAH
4. Aufsuchen der deckungsgleichen Stelle im BrdU-Schnitt
5. Projektion des FAH mit Hilfe des Bildanalyzesystems auf den Bildschirm
6. Detektion und Zählung der positiv markierten und der unmarkierten Leberzellkerne
7. Berechnung des Labelling-Index (LI) pro Einzeltier unter Berücksichtigung des FAH-Typs:

$$\text{LI (\%)} = \frac{\Sigma \text{ aller positiv markierten Kerne in FAH}}{\Sigma \text{ aller unmarkierten Kerne} + \Sigma \text{ aller positiv markierten Kerne in FAH}} \times 100$$

Konnte der FAH in dem BrdU-Schnitt nicht einwandfrei identifiziert werden, wurde das Bild des FAH im HE-Schnitt sowie der deckungsgleiche Bereich im BrdU-Schnitt auf den Bildschirm projiziert und gespeichert. Mit dem Bildanalyzesystem war es möglich, den FAH im HE-Schnitt zu umranden und diese Umrandung auf den entsprechenden Bereich im BrdU-Schnitt zu übertragen. Auf gleiche Weise wurde bei den NAH auf der Grundlage der GST-P-positiven Fläche vorgegangen.

Messung der Zellproliferation in GST-P-negativen FAH:

Die im HE-Schnitt erkannten GST-P-negativen FAH wurden klassifiziert, der deckungsgleiche Bereich im BrdU-Schnitt aufgesucht und der LI auf oben beschriebene Weise bestimmt.

3.4.2.4 Apoptose in FAH

Der Apoptose-Index (AI) innerhalb der FAH wurde pro Einzeltier unter Berücksichtigung des FAH-Typs nach Ermittlung der Anzahl der apoptotischen Körperchen in der HE-Färbung wie folgt errechnet:

$$\text{AI (\%)} = \frac{\Sigma \text{ aller apoptotischen Körperchen in FAH}}{\Sigma \text{ aller unmarkierten Kerne} + \Sigma \text{ aller positiv markierten Kerne in FAH}} \times 100$$

3.4.2.5 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

Zusätzlich wurde die Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens ermittelt. Dazu wurde entsprechend der LZM (Lobule-zonal-measurement)-Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) der Bereich zwischen Zentralvene und Portalfeld eines Leberläppchens schematisch in drei gleich große, ca. 100 Hepatozyten umfassende Abschnitte unterteilt (Zone 1 = periportal; Zone 2 = intermediär, Zone 3 = zentrolobulär) und die FAH einer Zone zugeordnet. Konnte ein FAH nicht auf der Verbindungslinie Zentralvene-Portalfeld lokalisiert werden, war die unmittelbare Nähe zu einem Blutgefäß Bewertungsgrundlage. FAH in Nähe der Zentralvene wurden Zone 3, FAH in Nähe des Portalfeldes Zone 1 zugeordnet. Alle anderen FAH wurden Zone 2 zugewiesen. FAH, die in ihrer Größe eine einzige Zone überschritten, wurden ihren Ausmaßes entsprechend mit Zone 1/2, 2/3 bzw. 1/2/3 beschrieben.

3.4.3 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

Zur Ermittlung des Proliferationsverhaltens im unveränderten Lebergewebe wurden im mittleren und lateralen rechten Leberlappen je fünf Leberläppchen ausgewertet, die nach folgenden Kriterien, ansonsten zufällig über den Schnitt verteilt ausgewählt wurden:

1. Der Abstand zwischen Portalfeld und Zentralvene sollte zwischen 350 und 450 μm betragen.
2. Das Leberläppchen sollte sich nicht am Leberrand oder im Bereich großer Gefäße befinden.

Das Leberläppchen wurde wie oben nach der LZM-Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) in drei gleich große Zonen aufgegliedert. Jede Zone entsprach einem Meßfeld mit ca. 100 Hepatozyten, so daß pro Leber dreißig Meßfelder mit insgesamt ca. 3000 Zellen ausgezählt wurden.

In jedem Meßfeld wurden mit Hilfe des Bildanalyse-Systems die positiv markierten und die unmarkierten Leberzellkerne detektiert und gezählt. Der Labelling-Index des Einzeltieres wurde für jede Zone getrennt und für das gesamte Leberläppchen berechnet:

$$\text{LI (\%)} = \frac{\Sigma \text{ aller positiv markierten Kerne}}{\Sigma \text{ aller unmarkierten Kerne} + \Sigma \text{ aller positiv markierten Kerne}} \times 100$$

3.5 Statistische Auswertung

3.5.1 FAH und Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

Die Datenhaltung und die statistische Auswertung der Daten erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen unter Verwendung des Statistikprogramm-Paketes BMDP/Dynamik; Release 7.0 (DIXON, 1993). Die graphischen Abbildungen wurden mit einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT, Version 2.0, sowie mit dem Programm Microsoft Excel 97 erzeugt.

Die nachfolgend beschriebenen statistischen Verfahren setzen näherungsweise eine Normalverteilung der Einzelwerte voraus. Da sämtliche FAH-Daten sowie die Labelling-Indizes der extrafokalen Proliferationsmessung eine rechtsschiefe Verteilung zeigten, wurden die Einzelwertwerte logarithmiert und damit einer Normalverteilung angenähert. Nullwerte wurden aus rechnerischen Gründen durch die Hälfte des kleinsten beobachteten Wertes ersetzt. Aus der so entstandenen transformierten Verteilung wurden die arithmetischen Mittelwerte ($\log(x)$) und die Standardabweichungen ($s_{\log(x)}$) berechnet. Durch Entlogarithmieren wurden die erhaltenen Werte anschließend in die für die Datenbeschreibung genutzten geometrischen Mittelwerte (\bar{x}_g) und Streufaktoren (SF) überführt. Mit dieser Darstellung werden im statistischen Mittel ca. 2/3 der Population erfaßt.

Bei der statistischen Auswertung der verschiedenen FAH-Parameter wurde zunächst zur Feststellung globaler Unterschiede zwischen allen Gruppen eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Die Ermittlung signifikanter Unterschiede begründete einen paarweisen Vergleich der Substanzgruppen mit den Kontrollen mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse. Nach Feststellung signifikanter Unterschiede erfolgte zur weiteren Eingrenzung mittels einfaktorieller Varianzanalyse eine Untersuchung auf globale Unterschiede zwischen den

Substanzgruppen zu einem Untersuchungszeitpunkt. Wenn dabei signifikante Unterschiede aufgedeckt wurden, schloß sich ein Vergleich der Substanzgruppen mit den Kontrollgruppen für jeden Untersuchungszeitpunkt getrennt mittels Dunnett-Test an. Da dieser Test voraussetzt, daß in der Kontrollgruppe mindestens genauso viele Beobachtungen vorliegen wie in der damit zu vergleichenden Gruppe, wurden in den Gruppen mit einer höheren Anzahl an Einzeltierwerten entsprechend viele - über Zufallszahlen ausgewählte - Einzeltierwerte gestrichen. Zum Vergleich der drei Untersuchungszeitpunkten innerhalb einer Substanzgruppe wurde ein paarweiser Vergleich nach Tukey durchgeführt.

Die Signifikanzprüfung der Ergebnisse der Messung der Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe erfolgte für den Vergleich zwischen Substanzgruppen und Kontrollgruppen ebenfalls schrittweise wie oben beschrieben.

Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf 5 % ($p \leq 0,05$) festgelegt.

3.5.2 Körpergewichte, absolute und relatives Lebergewichte

Der Vergleich der Körpergewichte sowie der absoluten und relativen Lebergewichte zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen erfolgte mittels zweiseitigem Wilcoxon-Test auf Rechnern der BASF AG Ludwigshafen. Für die Datenbeschreibung wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung genutzt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % ($p \leq 0,05$) festgelegt.

4 ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der promovierenden Wirkung fünf verschiedener Lebertumor-Promotoren (Phenobarbital, Chloroform, Wyeth-14,643, Ethinylestradiol und PCB 126) auf die Lebern alter Ratten. Zu diesem Zweck wurde das Wachstumsverhalten präneoplastischer Herde (FAH = "foci of altered hepatocytes") nach 1-, 4- und 13-wöchiger Substanz-Applikation an 10 Tiere pro Gruppe ermittelt. Als Meßparameter dienten die Anzahl an FAH pro cm² Leberfläche, die Größe der FAH (Zellzahl pro FAH-Querschnitt), der Labelling-Index und der Apoptose-Index. Zusätzlich wurde die Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens bestimmt. Die Einzeltierwerte finden sich im Anhang in den Tabellen 32 bis 55, die zonale Verteilung der FAH ist in den Tabellen 56 bis 67 aufgeführt.

Die FAH wurden in der HE-Färbung und durch GST-P-Nachweis identifiziert und eingeteilt in klarzellige FAH („clear cell foci“ = CCF), basophile FAH („basophilic cell foci“ = BCF), eosinophile FAH („eosinophilic cell foci“ = ECF), gemischtzellige FAH („mixed cell foci“ = MCF) und NAH (GST-P-positive Herde, die im HE-Schnitt nicht zu erkennen sind). Bei fast allen Gruppen wurden FAH beobachtet, die durch das Auftreten von Peliosis hepatis und/oder Spongiosis hepatis, ein homogen schwach basophiles Zytoplasma und ihre Größe (mehrere Leberläppchen mit einbeziehend) gekennzeichnet waren. Diese FAH wurden als BCF-NOS („not otherwise specified“) klassifiziert und den BCF zugeordnet. Alle Parameter wurden für die Gesamtheit der FAH sowie für GST-P-positive und GST-P-negative FAH getrennt bestimmt. Im folgenden werden die sich auf die Gesamtheit aller FAH beziehenden Ergebnisse aufgeführt. Nur wenn sich deutliche Unterschiede zwischen GST-P-positiven und -negativen FAH ergaben, wird auf diese gesondert eingegangen.

Weiterhin wurde der Einfluß der fünf Promotoren auf das Proliferationsverhalten extrafokaler Hepatozyten unter der Berücksichtigung der zonalen Unterschiede innerhalb des Leberläppchens untersucht. Das Proliferationsverhalten des extrafokalen Lebergewebes wurde für das gesamte Leberläppchen sowie für jede Leberzone getrennt ermittelt. Die Einzeltierwerte dazu finden sich im Anhang in den Tabellen 70 bis 72.

4.1 Kontrolle

Aus der 1- Wochen-Gruppe verstarb ein Tier, ein weiteres aus der 13-Wochen-Gruppe wurde moribund getötet. Beide Tiere wurden aus der Befundung ausgeschlossen.

4.1.1 Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht

Tab. 11: Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht bei den Kontrolltieren

| Untersuchungszeitpunkt | Körpergewicht (g) (MW±SD) | abs. Lebergewicht (g) (MW±SD) | rel. Lebergewicht (%) (MW±SD) |
|------------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 Woche | 713,3±107,3 | 24,3±3,9 | 3,42±0,31 |
| 4 Wochen | 680,8±78,2 | 24,4±3,1 | 3,58±0,22 |
| 13 Wochen | 685,4±56,9 | 23,0±3,1 | 3,30±0,38 |

abs. = absolut; MW = Mittelwert; rel. = relativ; SD = Standardabweichung

4.1.2 Makroskopische Befunde

Bei der makroskopischen Betrachtung der Leberoberfläche wurden bei 24 der 28 untersuchten Kontrolltiere (1 Woche: 7 von 9; 4 Wochen 10 von 10; 13 Wochen: 7 von 9) 1-5 mm im Durchmesser große, z. T. über die Leberoberfläche erhabene Herde von gelber, roter oder brauner Farbe beobachtet. Bei je einer Ratte waren nach 4 und 13 Wochen bis zu 3 mm im Durchmesser große Zysten zu erkennen. Im Lobus sinister lateralis eines Tieres der 1-Wochen-Gruppe fand sich nach ein 5x1 mm² großer Nekroseherd.

4.1.3 Histologische Befunde

Bei den Kontrollratten wurden bei der Untersuchung nach 1, 4 und 13 Wochen gleichartige Veränderungen gefunden, die sich auch im Vergleich der drei Zeitpunkte in Prävalenz und Ausprägung ähnelten. Die Hepatozyten fast aller Lebern zeigten eine gering- bis mittelgradige Glykogenspeicherung. Bei 10 % bis 22 % der Ratten lag eine mittelgradige großtropfige Leberzellverfettung in Zone 1 vor. Bei 22 % bis 40 % der Tiere trat eine Gallengangsproliferation überwiegend schwachen Ausmaßes auf. Gallengangszysten wurden bei 1 (von 9) Tieren nach 1 Woche und bei 2 (von 9) Tieren nach 13 Wochen beobachtet. Herdförmige mononukleäre Infiltrate kamen in überwiegend schwachem Ausmaß bei 40 % bis 50 % der Ratten vor.

4.1.4 FAH

4.1.4.1 Prozentuale Verteilung der FAH-Typen

84,5 % bis 89 % der bei den Kontrolltieren zu den drei Untersuchungszeitpunkten gefundenen FAH waren klarzellig. Der prozentuale Anteil der BCF und der NAH lag zwischen ca. 4 % und 8 % (s. Tab. 69). Eine GST-P-Expression zeigten 18 % bis 23 % der CCF, 11 % bis 19 % der BCF. BCF-NOS waren in der 4-Wochen-Gruppe (3 von insgesamt 36 BCF) und in der 13-Wochen-Gruppe (7 von 21 BCF) vorhanden.

4.1.4.2 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

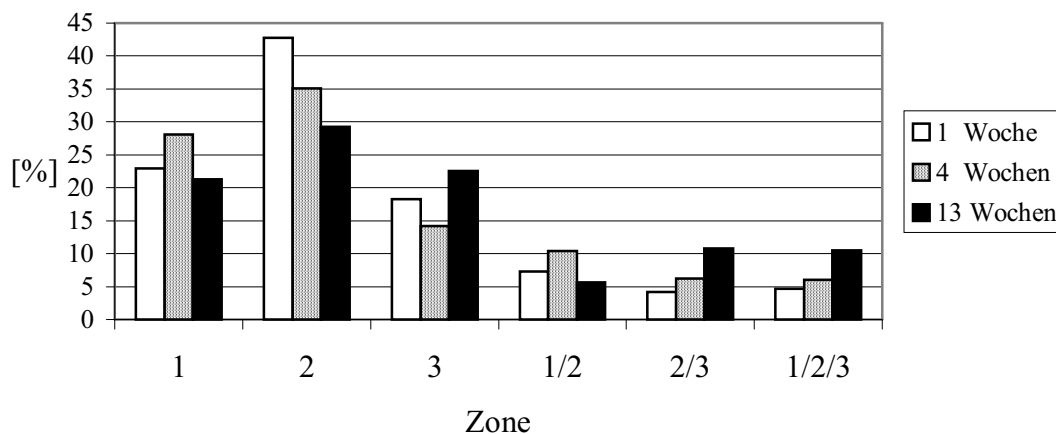


Abb. 1: prozentualer Anteil der FAH in den verschiedenen Zonen bei Kontrolltieren

Der größte Anteil aller FAH fand sich zu allen drei Terminen in Zone 2 (29 % bis 43 %). 18 % bis 23 % der FAH lagen nach 1 Woche und 13 Wochen in Zone 1 und 3, nach 4 Wochen waren in Zone 3 (14 %) deutlich weniger FAH lokalisiert als in Zone 1 (28 %). Bei der Betrachtung der verschiedenen FAH-Typen (s. Tab. 56) ergab sich für CCF grundsätzlich die gleiche Verteilung. NAH konnten mit 0 % bis 3 % nur sehr selten in Zone 1 beobachtet werden. Für BCF konnte keine Hauptlokalisationszone bestimmt werden. Ein auffällig hoher prozentualer Anteil an BCF (32 % und 45 %) wurde nach 4 und 13 Wochen aufgrund der Lokalisation oder Größe (mindestens den Abstand Zentralvene-Portalfeld umfassend) den Zonen 1/2/3 zugeordnet.

Bei der gesonderten Untersuchung GST-P-positiver und –negativer FAH fiel bei CCF (s. Tab. 57) eine grundsätzlich unterschiedliche Verteilung auf. 36 % bis 42 % der GST-P-positiven

CCF wurden in Zone 3, 4 % bis 11 % in Zone 1 gefunden. Dagegen lagen 10 % bis 18 % der GST-P-negativen CCF in Zone 3, 29 % bis 36 % in Zone 1.

4.1.4.3 Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche

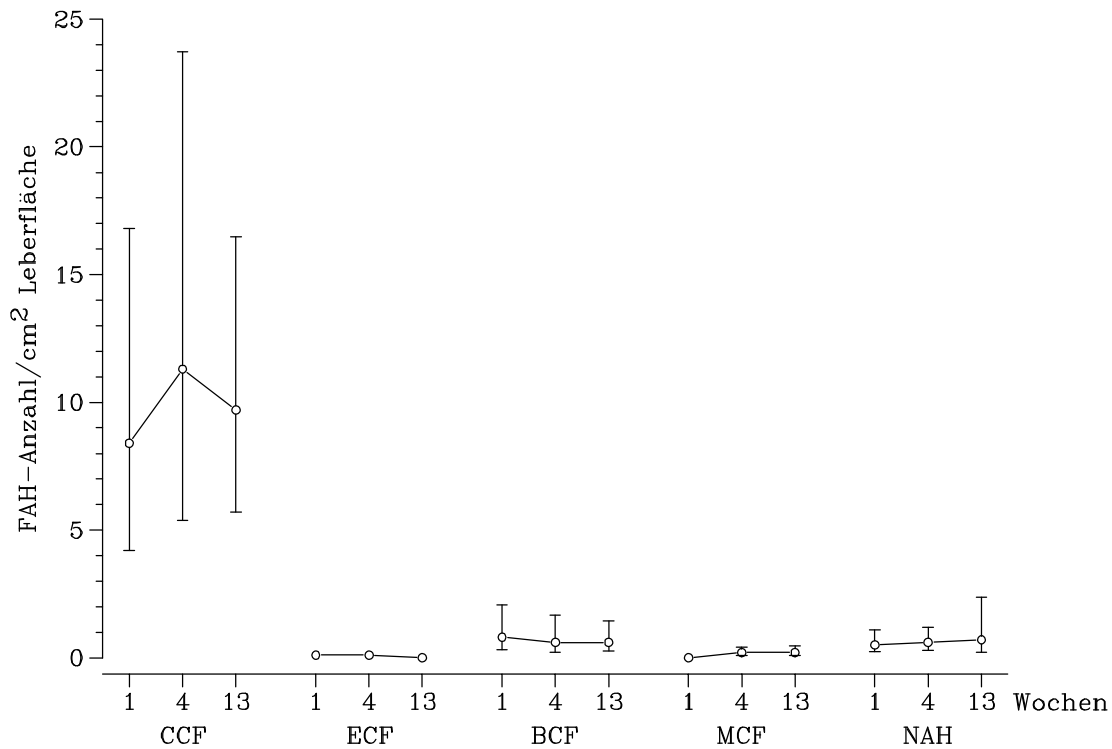


Abb. 2: Anzahl der verschiedenen FAH-Typen/cm² Leberfläche (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) bei den Kontrollgruppen

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

Die Gesamtzahl aller bei den Kontrolltieren gefundenen FAH lag bei den drei Untersuchungszeitpunkten zwischen 10,7 und 13,4 pro cm² Leberfläche (s. Tab. 68). Für CCF wurde eine durchschnittliche Anzahl pro cm² von 8,4-11,3, für BCF und NAH von ca. 0,5-0,8 ermittelt. GST-P-positive CCF und BCF kamen in deutlich niedrigerer Anzahl vor als GST-P-negative FAH (CCF: 1,9-2,3/6-8,6; BCF: 0,1/0,5-0,7; s. Tab. 32). ECF und MCF traten nur vereinzelt auf (je 1 ECF nach 1 und 4 Wochen, 0 ECF nach 13 Wochen; 0 MCF nach 1 Woche, 8 MCF nach 4 Wochen, 5 MCF nach 13 Wochen).

4.1.4.4 Zellzahl pro FAH-Querschnitt

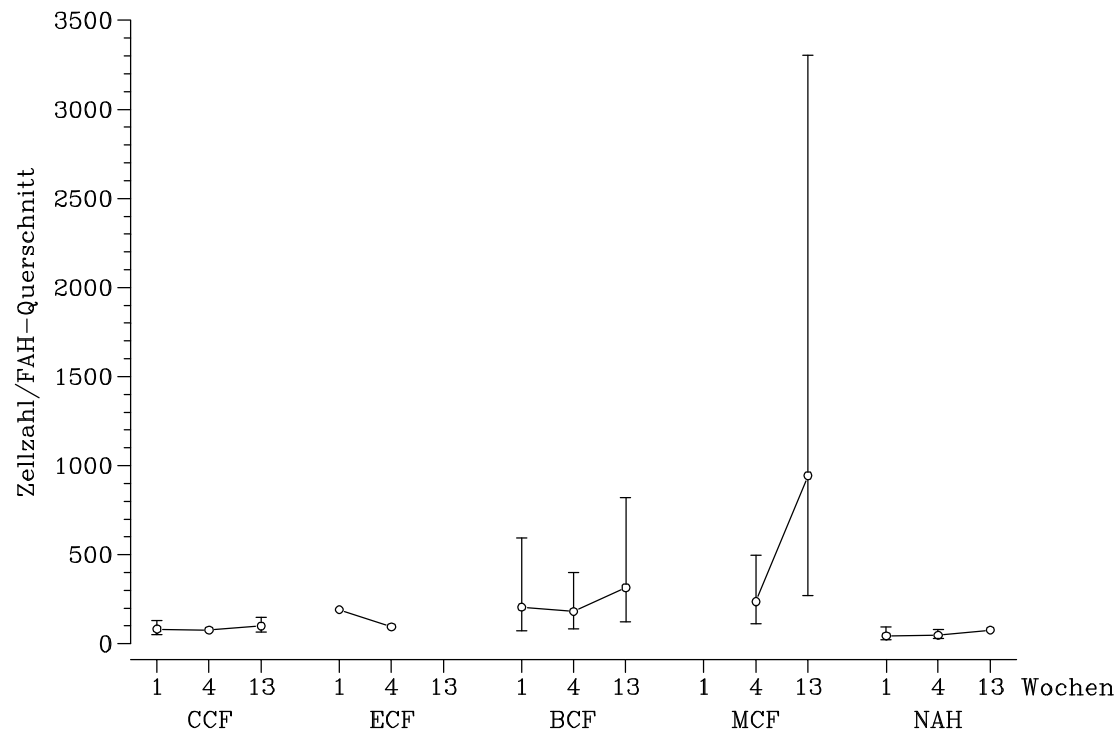


Abb. 3: Zellzahl der verschiedenen FAH-Typen pro FAH-Querschnitt (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) bei den Kontrollgruppen

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

Die durchschnittliche Zellzahl pro CCF-Querschnitt lag zwischen 77 und 99 Hepatozyten. BCF wiesen zu jedem Untersuchungszeitpunkt höhere Zellzahlen (181-315), NAH niedrigere Zellzahlen (45-79) auf. Die Differenzen der Werte innerhalb eines FAH-Typs zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten waren nicht von statistischer Signifikanz. Die beiden nach 1 und 4 Woche aufgetretenen ECF hatten 191 Zellen und 95 Zellen im FAH-Querschnitt. Die durchschnittliche Zellzahl/FAH-Querschnitt für MCF betrug nach 4 Wochen 237, nach 13 Wochen 944 Zellen. Die Einzeltierwerte zeigten infolge des vereinzelt Auftretens sehr großer MCF starke Schwankungen zwischen 92 und 3378 Zellen/MCF-Querschnitt. Im nachfolgenden Vergleich mit den Substanzgruppen wurden die MCF graphisch nicht mehr dargestellt, da sonst die y-Achse zu weit gespreizt worden wäre.

Größenklassen

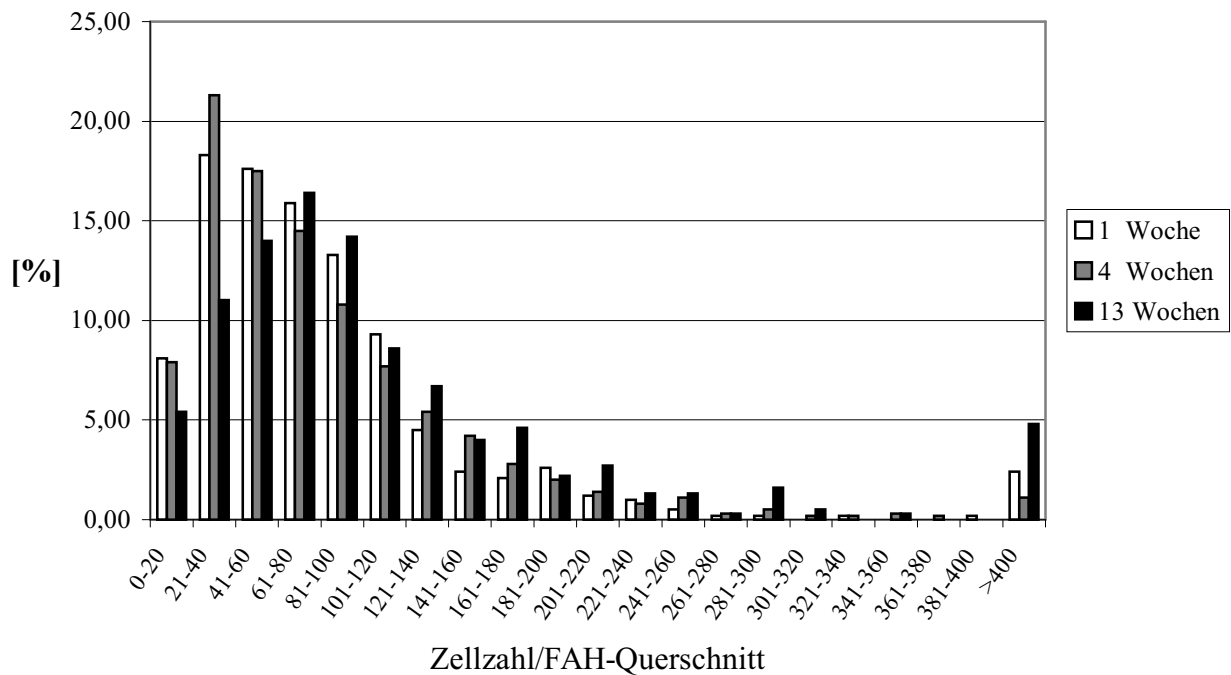


Abb. 4: prozentualer Anteil der FAH verschiedener Größenklassen an der Gesamtzahl der FAH bei den drei Kontrollgruppen

Um den Anteil der FAH einer bestimmten Größe an der Gesamt-FAH-Anzahl zu bestimmen, wurden Größenklassen von je 20 Zellen/FAH-Querschnitt gebildet. Der größte Anteil (65 %, 64 % und 56 %) der bei den Kontrollgruppen nach 1, 4 und 13 Wochen gefundenen FAH zeigte eine Zellzahl/FAH-Querschnitt zwischen 21 und 100. Bei der Einteilung in jeweils 20 Zellen betragende Größenklassen hatte der höchste Anteil der FAH nach 1 und 4 Wochen zwischen 21 und 40 Zellen und nach 13 Wochen zwischen 61 und 80 Zellen pro FAH-Querschnitt.

4.1.4.5 Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

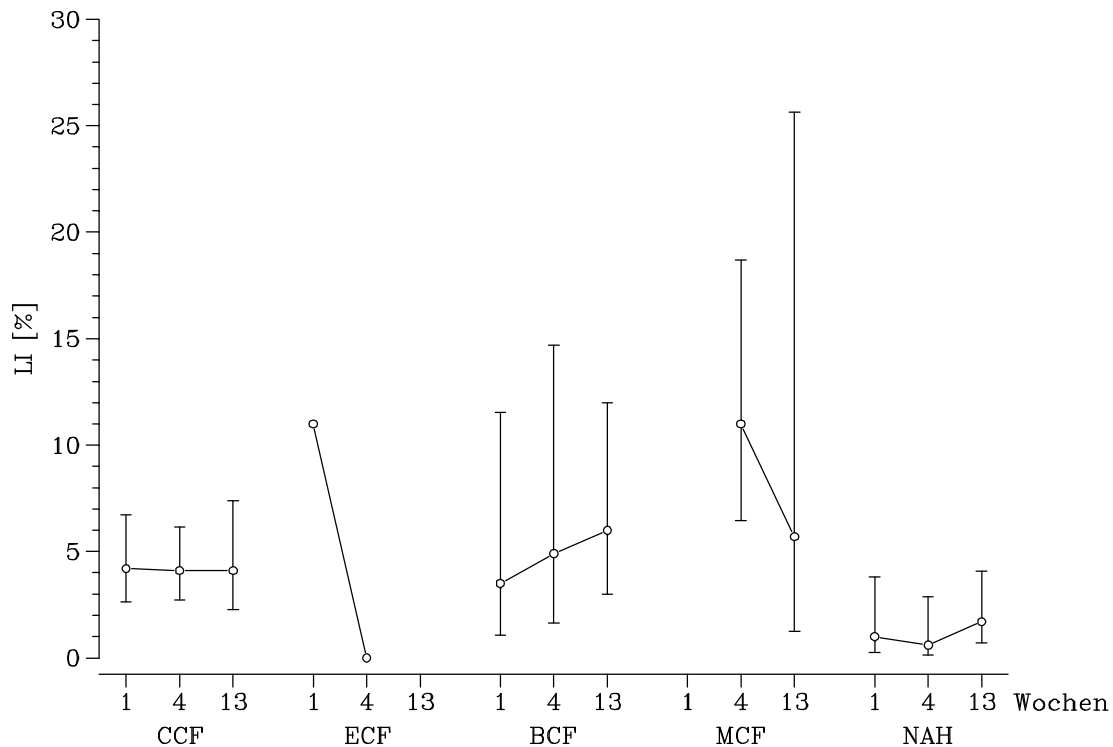


Abb. 5: Labelling-Indizes (%) (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren) der verschiedenen FAH-Typen bei den Kontrollgruppen

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

Der Labelling-Index (LI) betrug in CCF 4,1 % bis 4,2 %. BCF wichen davon nicht wesentlich ab (3,5 % bis 6 %), der LI der NAH lag niedriger (0,6 % bis 1,9 %). Unterschiede im LI zwischen GST-P-positiven und -negativen FAH (s. Tab. 34) bestanden in dem geringfügig niedrigeren LI der GST-P-positiven CCF (GST-P-negativ: 4,2 % bis 4,5 %; GST-P-positiv: 2,3 % bis 3,2 %). Der jeweils nach 1 und 4 Wochen aufgetretene ECF hatte einen LI von 11 % und 0 %. Die jeweils nach 1 und 4 Wochen aufgetretene ECF hatte einen LI von 11 % und 0 %. Die nach 4 und 13 Wochen aufgetretenen MCF wiesen einen durchschnittlichen LI von 11 % und 5,7 % auf.

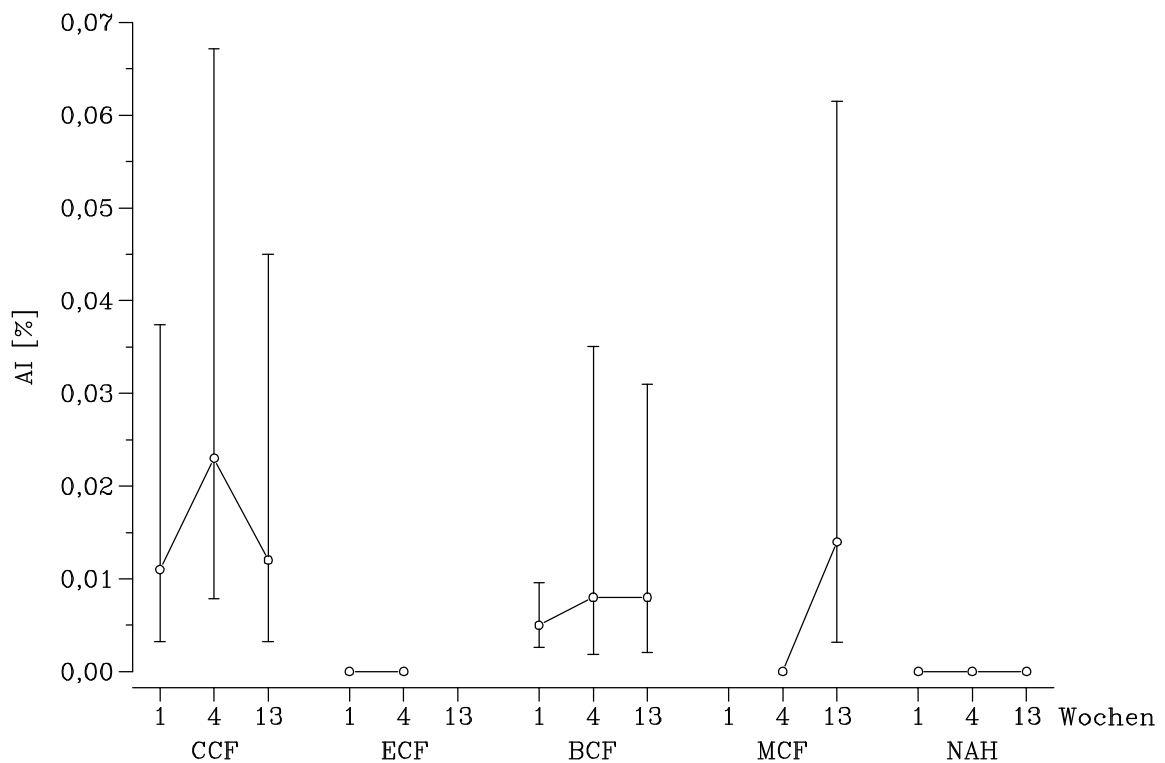


Abb. 6: Apoptose-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der verschiedenen FAH-Typen bei den Kontrollgruppen

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

Der durchschnittliche Apoptose-Index (AI) (s. Tab. 35) aller klarzelligen FAH lag zu den drei Untersuchungszeitpunkten zwischen 0,011 % und 0,023 %. BCF wiesen zu allen Zeitpunkten mit 0,005 % bis 0,008 % einen niedrigeren AI auf. Der AI in MCF lag nach 13 Wochen bei 0,014 %. Für die anderen FAH-Typen wurde ein AI von 0 % ermittelt.

4.1.5 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

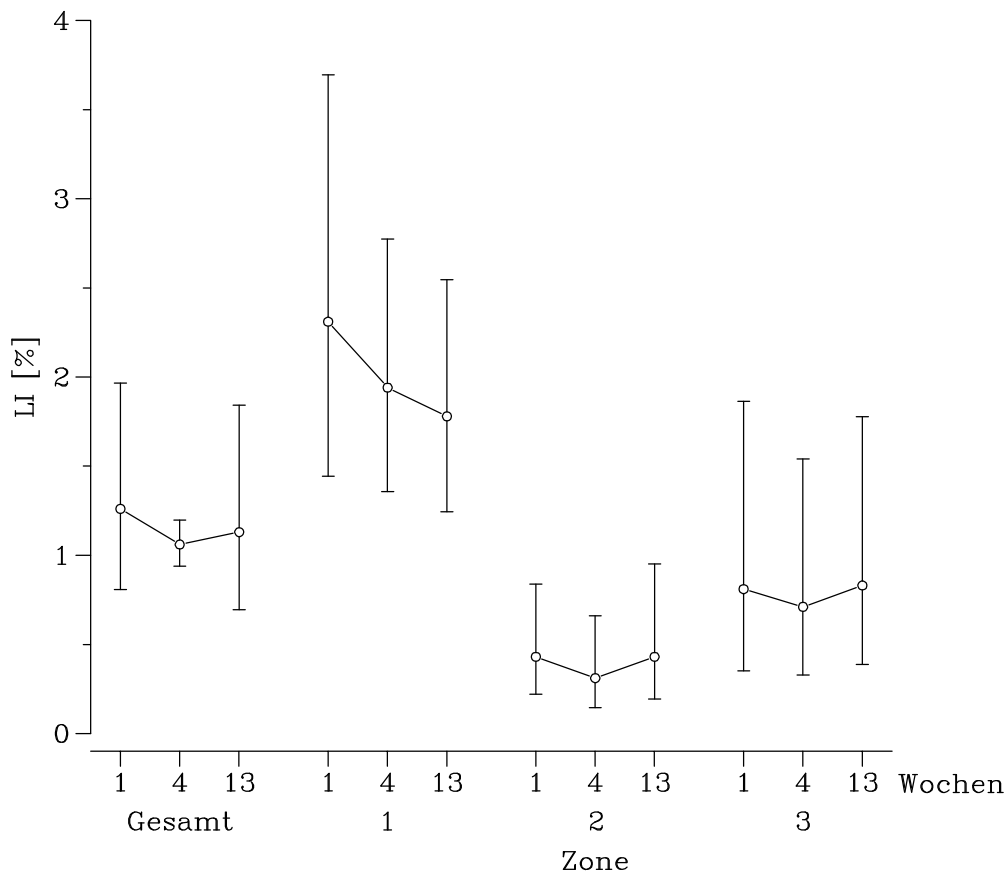


Abb. 7: Labelling-Indizes (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) des extrafokalen Lebergewebes für die 3 Zonen sowie Gesamt-LI bei den Kontrolltieren

Der Gesamt-Labelling-Index im extrafokalen Lebergewebe (LI_{GES}) zeigte zu den drei Untersuchungszeitpunkten relativ konstante Werte zwischen 1,06 % und 1,26 %. Bei der Betrachtung des zonalen Proliferationsverhaltens wies Zone 1 den höchsten LI auf (1,78 % bis 2,31 %), gefolgt von Zone 3 (0,71 % bis 0,83 %). Der niedrigste LI wurde in Zone 2 (0,31 % bis 0,43 %) ermittelt.

4.2 Phenobarbital

4.2.1 Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht

Tab. 12: Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht nach Verabreichung von Phenobarbital

| Applikations- dauer | Körpergewicht (g) (MW±SD) | | abs. Lebergewicht (g) (MW±SD) | | rel. Lebergewicht (%) (MW±SD) | |
|------------------------|------------------------------|-------------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
| | PB | Kontrolle | PB | Kontrolle | PB | Kontrolle |
| 1 Woche | 702,5±68,6 | 713,3±107,3 | 28,2±3,4 | 24,3±3,9 | 4,02±0,32** | 3,42±0,31 |
| 4 Wochen | 714,1±84,9 | 680,8±78,2 | 26,3±5,0 | 24,4±3,1 | 3,69±0,56 | 3,58±0,22 |
| 13 Wochen | 678,2±96,7 | 685,4±56,9 | 26,7±4,5 | 23,0±3,1 | 3,95±0,55** | 3,30±0,38 |

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, zweiseitig)

abs. = absolut; MW = Mittelwert; PB = Phenobarbital; rel. = relativ; SD = Standardabweichung

Die relativen Lebergewichte lagen nach 1 und 13 Wochen der Phenobarbital-Behandlung statistisch signifikant 1,2-fach über den Kontrollwerten.

4.2.2 Makroskopische Befunde

Bei allen drei Untersuchungszeitpunkten wurden makroskopisch auf der Leberoberfläche 1-4 mm im Durchmesser große, z. T. über die Leberoberfläche erhabene, herdförmige Veränderungen von gelber, roter oder brauner Farbe festgestellt. Die Prävalenz lag nach 1 Woche bei 50 %, nach 4 und 13 Wochen bei 80 %. Je eine 3 mm im Durchmesser große Zyste trat bei zwei von 10 Tieren nach 4 Wochen und bei einem von 10 Tieren nach 13 Wochen auf.

4.2.3 Histologische Befunde

Histologisch ließen die Hepatozyten bei allen drei Untersuchungszeitpunkten in Zone 3 eine Hypertrophie mit fein- bis grobgranuliertem eosinophilen Zytoplasma erkennen. Ein Tier zeigte nach der einwöchigen Phenobarbital-Behandlung einen einzelnen, in der Größe das Leberläppchen nicht überschreitenden Nekroseherd, nach 13 Wochen traten bei einem weiteren Tier im Lobus dexter medialis mehrere läppchenübergreifende Nekroseherde mit Blutungen auf. Die weiteren Befunde wichen nicht von den Kontrollen ab und zeigten auch zu den drei Untersuchungszeitpunkten keine wesentlichen Unterschiede.

4.2.4 FAH

4.2.4.1 Prozentuale Verteilung der FAH-Typen

CCF machten zu allen drei Untersuchungszeitpunkten prozentual den höchsten Anteil aller FAH aus. Mit 77,5 % der Gesamt-FAH-Anzahl nach 1 Woche war der Wert gegenüber den Kontrollen vermindert und verringerte sich auf ca. 60 % nach 4 und 13 Wochen (s. Tab. 69). 17 %, 28 % und 19 % der CCF exprimierten nach 1, 4 und 13 Wochen GST-P. Der prozentuale Anteil an ECF erhöhte sich von 9 % nach 1 Woche auf 19 % nach 4 Wochen und weiter auf 26 % nach 13 Wochen. Der Anteil der ECF, die GST-P exprimierten, nahm während der Applikation zu (50 % nach 1 Woche, ca. 80 % nach 4 und 13 Wochen).

Im Laufe der Verabreichung stieg die Anzahl an FAH, die aus eosinophilen und klarzelligen Hepatozyten zusammengesetzt waren, an. Nach 4 bzw. 13 Wochen beinhalteten 11 % bzw. 17 % der FAH, die aufgrund des Überwiegens klarzelliger Hepatozyten als CCF eingeordnet wurden, eosinophile Hepatozyten. 13 % bzw. 32 % der ECF enthielten klarzellige Hepatozyten.

4.2.4.2 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

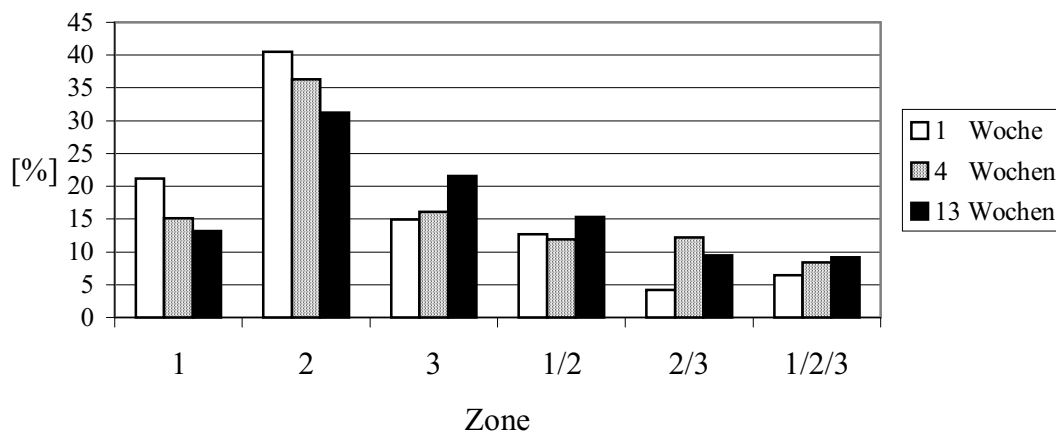


Abb. 8: Prozentualer Anteil der FAH in den verschiedenen Zonen nach Phenobarbital-Applikation

Der höchste prozentuale Anteil an der Gesamt-FAH-Anzahl lag zu allen 3 Terminen in Zone 2. Im Verlauf der Phenobarbital-Verabreichung nahm der prozentuale Anteil in Zone 2 (41 %, 36 %, 31 %) und Zone 1 (21 %, 15 %, 13 %) leicht ab, während in Zone 3 ein Anstieg erfolgte (15 %, 16 %, 22 %). Diese Erhöhung in Zone 3 konnte auch bei den CCF wiedergefunden werden (10 %, 13 %, 17 %). ECF wurden nach 1 Woche zu ungefähr gleichen Teilen

(16 % bis 22 %) in den 3 Leberzonen beobachtet (s. Tab. 58). Zusätzlich wurde ein Anteil von 28 % der ECF aufgrund der Größe (mindestens den Abstand Zentralvene-Portalfeld umfassend) allen drei Zonen zugeordnet. Nach 4 Wochen war der Hauptanteil der ECF in Zone 2 (31 %), nach 13 Wochen in Zone 3 (38 %) lokalisiert.

Bei der gesonderten Betrachtung der GST-P-positiven und -negativen FAH konnten nach 1 Woche 18 % der GST-P-positiven CCF in Zone 3 beobachtet werden (s. Tab. 59). Deren prozentualer Anteil stieg während der weiteren Verabreichung von Phenobarbital auf 29 % und 37 % an, dagegen verringerte sich der Anteil in Zone 2 (52 %, 18 %, 26 %). In Zone 1 wurden Werte von 2 % bis 5 % ermittelt. Ähnlich den Kontrollen lag der Anteil der GST-P-negativen CCF in Zone 1 zu allen drei Untersuchungszeitpunkten (28 %, 21 %, 19 %) deutlich über dem in Zone 3 (8 %, 7 %, 12 %).

4.2.4.3 Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche

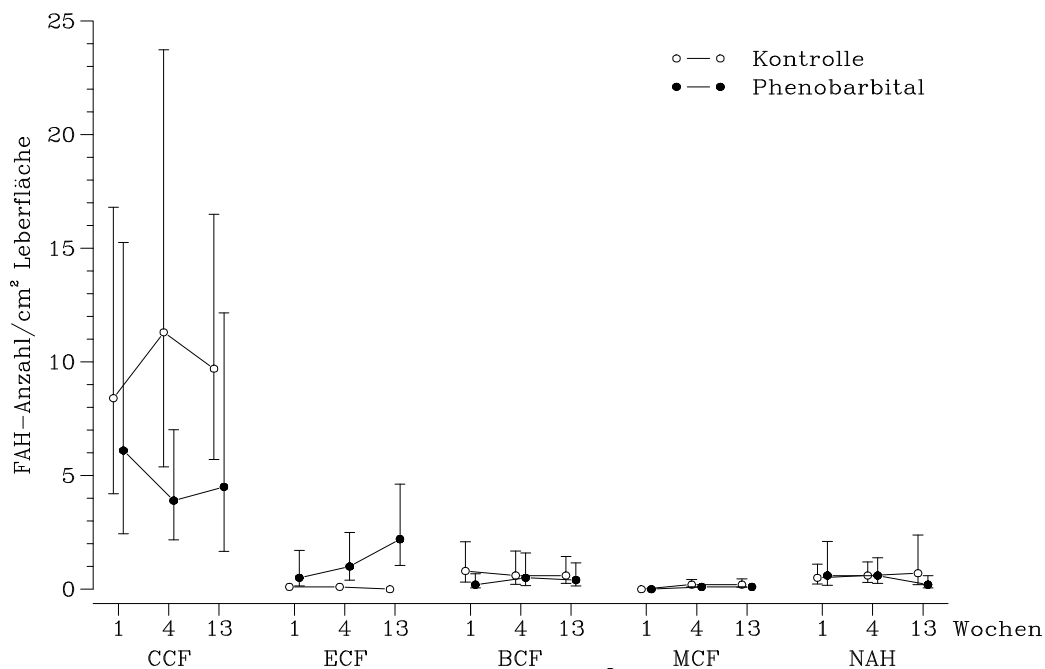


Abb. 9: Anzahl der verschiedenen FAH-Typen pro cm² Leberfläche (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von Phenobarbital

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| CCF | | b | |
| ECF | b | b | b |
| BCF | | | |
| MCF | | | |
| NAH | | | |

Tab. 13: Signifikanzen zur Abb. 9

b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,01$

Die Gesamt-FAH-Anzahl pro cm^2 Leberfläche lag nach 1, 4 und 13 Wochen bei 80 %, 53 % und 70 % der Kontrollen (s. Tab. 68). Ebenso war die Anzahl der CCF pro cm^2 zu allen drei Untersuchungszeitpunkten geringer als bei den Kontrollen (73%, 35 %, 46 %). Die Verminderungen zeigten sich aber nur nach 4 Wochen von statistischer Signifikanz. Bei der getrennten Betrachtung der GST-P-positiven und -negativen CCF ergab sich bei GST-P-negativen CCF mit Werten auf niedrigerem Niveau der gleiche Verlauf (s. Tab. 36). Die Anzahl der GST-P-positiven CCF blieb mit 0,8 bis $1,1/\text{cm}^2$ relativ konstant. Die Anzahl der ECF nahm während der Applikation von Phenobarbital zu ($0,46/\text{cm}^2$ nach 1 Woche, $1,03/\text{cm}^2$ nach 4 Wochen, $2,15/\text{cm}^2$ nach 13 Wochen) und lag zu allen Zeitpunkten über den Kontrollwerten. Diese Entwicklung wurde im wesentlichen durch GST-P-positive ECF bestimmt (s. Tab. 36).

4.2.4.4 Zellzahl pro FAH-Querschnitt

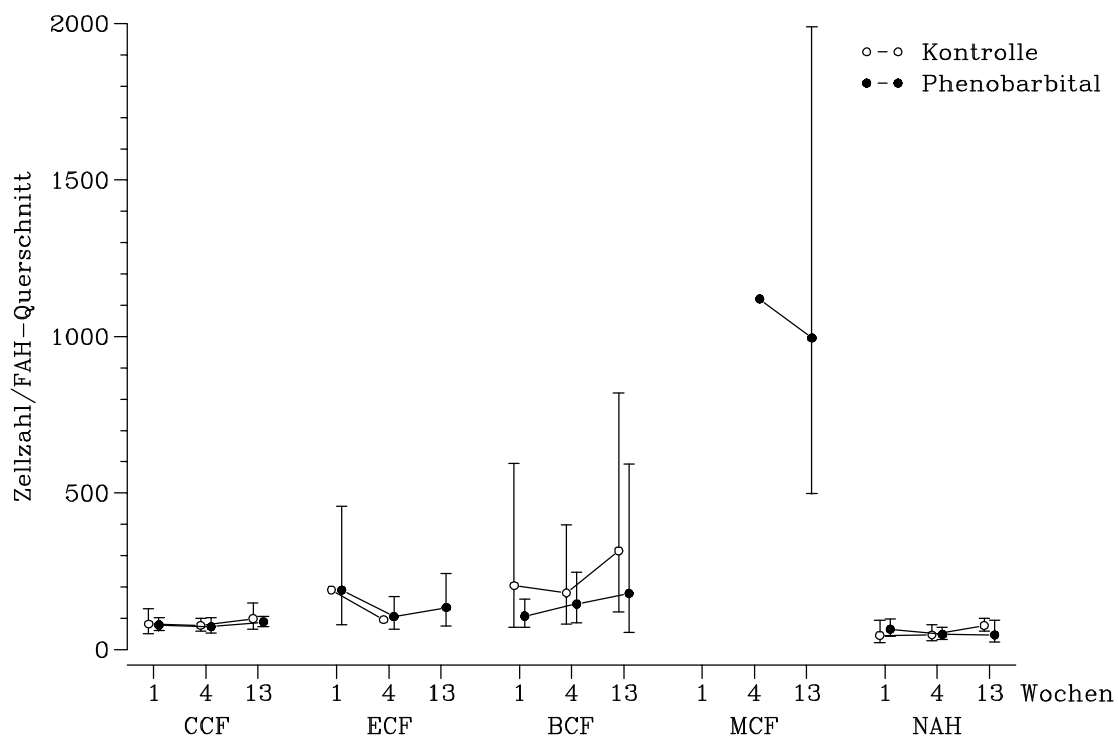


Abb. 10: Zellzahl der verschiedenen FAH-Typen pro FAH-Querschnitt (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von Phenobarbital

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

Für ECF wurde bei den drei Untersuchungszeitpunkten eine Größe zwischen 106 und 191 Zellen/FAH-Querschnitt ermittelt. Bei keinem anderen FAH-Typ wich die durchschnittliche

Zellzahl signifikant von den Kontrollen ab. Die Werte zeigten auch im Laufe der Applikation keine statistisch signifikanten Veränderungen.

4.2.4.5 Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

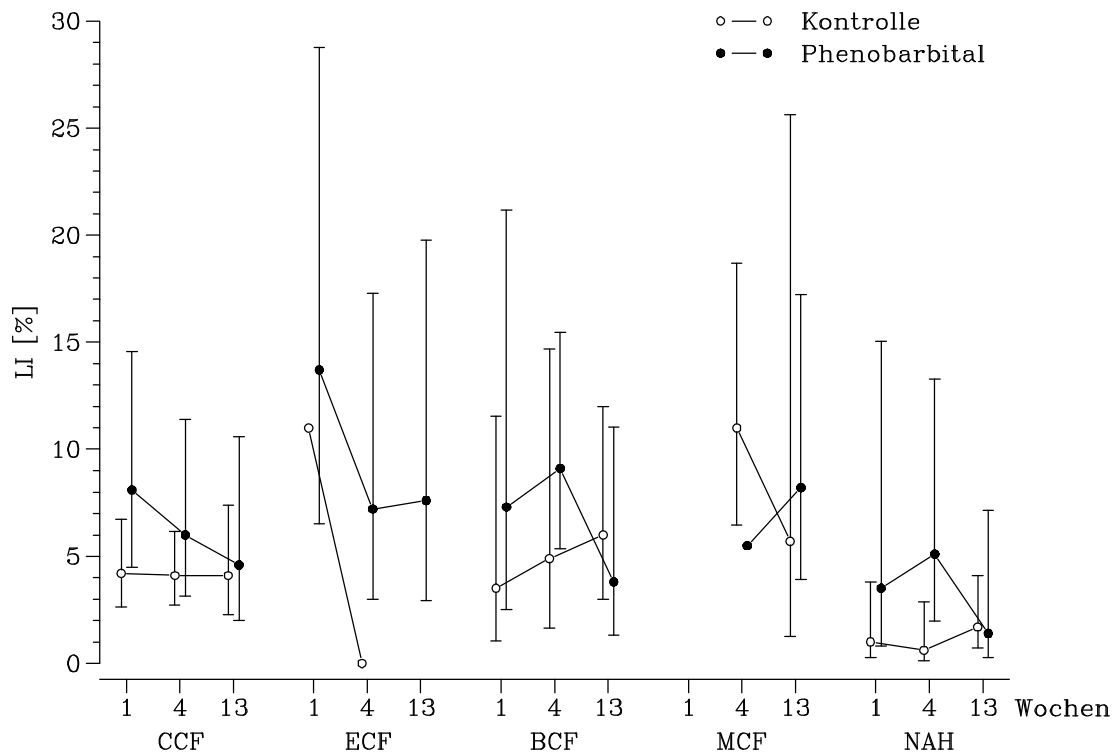


Abb. 11: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der verschiedenen FAH-Typen nach Verabreichung von Phenobarbital

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| CCF | a | | |
| ECF | | | |
| BCF | | | |
| MCF | | | |
| NAH | | b | |

Tab. 14: Signifikanzen zu Abb. 11

a, b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$

Der Labelling-Index in CCF lag nach einwöchiger Phenobarbital-Applikation mit einem Wert von 8,05 % 1,9-fach über den Kontrollwerten. Daraufhin erfolgte ein Abfall auf Kontrollniveau. Der Anstieg nach 1 Woche schien bedingt durch die 3,2-fache Erhöhung des LI in GST-P-positiven CCF (s. Tab. 38). Der LI in GST-P-negativen CCF war zwar 1,7-fach, aber nicht statistisch signifikant über den Kontrollwert erhöht. ECF wiesen mit 13,7 % nach 1 Woche den höchsten LI aller FAH-Typen auf. Nach 4 und 13 Wochen sanken die Werte auf 7,2 %

und 7,6 % ab. Die Reduktion des LI nach einem Peak nach 1 Woche konnte auch bei der gesonderten Betrachtung der GST-P-positiven und -negativen ECF nachvollzogen werden (s. Tab. 38). In NAH wurde nach 1 Woche mit einem LI von 3,5 % ein 3,5-facher Anstieg, nach 4 Wochen mit einem LI von 5,1 % ein 9-facher, statistisch signifikanter Anstieg über die Kontrollwerte beobachtet.

Der Apoptose-Index zeigte weder im Vergleich zu den Kontrollwerten noch über den zeitlichen Verlauf statistisch signifikante Veränderungen (s. Tab. 39). Der Apoptose-Index der ECF betrug nach 1, 4 und 13 Wochen 0,031 %, 0,017 % und 0,016 %.

4.2.5 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

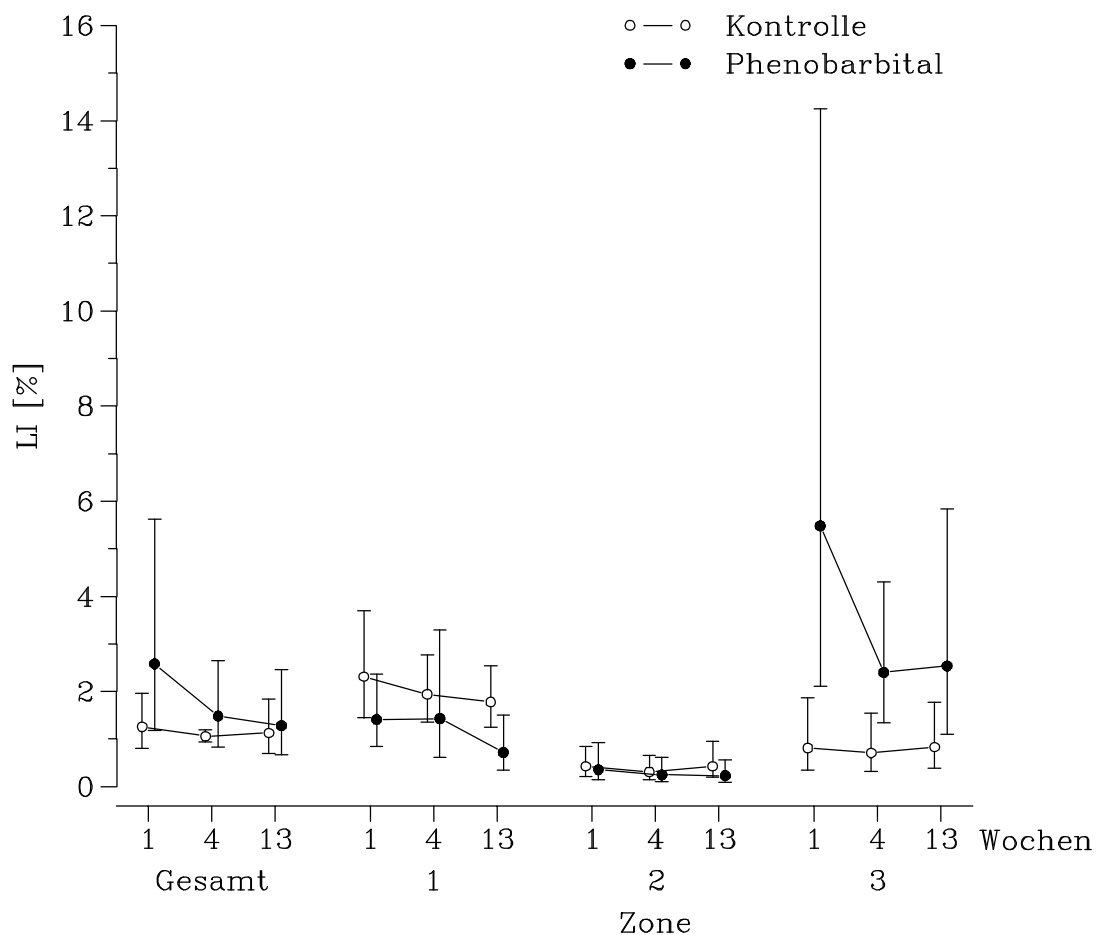


Abb. 12: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) des extrafokalen Lebergewebes für die 3 Zonen sowie Gesamt-LI nach Verabreichung von Phenobarbital

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| Gesamt | a | | |
| Zone 1 | | | b |
| Zone 2 | | | |
| Zone 3 | b | b | b |

Tab. 15: Signifikanzen zu Abb. 12

a, b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$

Die einwöchige Phenobarbital-Verabreichung führte zu einer 2-fachen Steigerung des LI_{GES} auf 2,58 %. Dabei war der LI_{Z3} mit 5,48 % 6,8-fach über die Kontrollwerte erhöht, der LI_{Z1} auf 61 % der Kontrollwerte reduziert. Nach 4 und 13 Wochen wurde wieder ein LI_{GES} auf Kontrollniveau gemessen. Auch zu diesen Untersuchungszeitpunkten erwies sich die Zellproliferation im Vergleich zu den Kontrollwerten in Zone 3 höher (3,4- und 3,1-fach) und in Zone 1 geringer (74 % und 40 %).

4.3 Chloroform

Von den 30 Ratten verstarben während der Chloroform-Behandlung insgesamt 9 Tiere. Davon gehörten 1 Tier zu der 1-Wochen-Gruppe (Tod am 6. Behandlungstag), 5 Tiere zu der 4-Wochen-Gruppe (Tod am 9., 10., 16., 17. und 21. Behandlungstag) und 3 Tiere zu der 13-Wochen-Gruppe (Tod am 54., 59. und 83. Behandlungstag). Alle Tiere wurden seziiert, aber in die makroskopische Bewertung wurden aufgrund der zeitlichen Entfernung zum geplanten Sektionstermin nur die am 6. und 83. Behandlungstag verstorbenen Tiere mit einbezogen.

4.3.1 Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht

Tab. 16: Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht nach Verabreichung von Chloroform

| Applikationsdauer | Körpergewicht (g) (MW±SD) | | abs. Lebergewicht (g) (MW±SD) | | rel. Lebergewicht (%) (MW±SD) | |
|-------------------|------------------------------|-------------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
| | CHL | Kontrolle | CHL | Kontrolle | CHL | Kontrolle |
| 1 Woche | 658,7±64,3 | 713,3±107,3 | 25,7±3,1 | 24,3±3,9 | 3,91±0,3** | 3,42±0,31 |
| 4 Wochen | 622,8±74,1 | 680,8±78,2 | 23,4±4,1 | 24,4±3,1 | 3,74±0,29 | 3,58±0,22 |
| 13 Wochen | 597,2±71** | 685,4±56,9 | 23,2±5,46 | 23,0±3,1 | 3,85±0,49* | 3,30±0,38 |

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, zweiseitig)

abs. = absolut; CHL = Chloroform; MW = Mittelwert; rel. = relativ; SD = Standardabweichung

Das Körpergewicht der Tiere verringerte sich während der Chloroform-Applikation kontinuierlich. Nach 13 Wochen wiesen die Tiere eine statistisch signifikante Verminderung des Körpergewichts um ca. 13 % auf. Bei relativ konstant bleibendem absolutem Lebergewicht war das relative Lebergewicht nach 1 Woche 1,1-fach, nach 13 Wochen 1,2-fach erhöht.

4.3.2 Makroskopische Befunde

Die Prävalenz herdförmiger Veränderungen auf der Leberoberfläche lag bei allen drei Untersuchungszeitpunkten zwischen 40 % und 50 %. Die Herde hatten einen Durchmesser von 2-6 mm und waren von roter, gelber, weißer und brauner Farbe. 50 % der Lebern zeigten nach einer Woche eine hellbraune Verfärbung, die nach 4 Wochen noch bei 20 %, nach 13 Wochen noch bei 10 % der Tiere zu beobachten war.

4.3.3 Histologische Befunde

Nach einer Behandlungswoche zeigten sich zytotoxische Erscheinungen in Form einer Degeneration und eines Unterganges einzelner bis vieler Hepatozyten in Zone 3. Bei einem Tier wurde eine läppchenübergreifende herdförmige Nekrose mit Blutungen beobachtet. Es traten bei 90 % der Tiere mononukleäre Infiltrate auf, die Zentralvenen manschettenartig umgaben, z. T. auch in den angrenzenden Sinusoiden zu finden waren oder Granulome bildeten. Bei 90 % der Tiere lag eine gering- bis mittelgradige klein- bis großtropfige Verfettung der Hepatozyten vor, die meist in Zone 3, teilweise auch in Zone 1 am stärksten ausgeprägt war. Die hepatotoxischen Erscheinungen verringerten sich im Laufe der Behandlung, die Zentralvenen wirkten aber aufgrund des Zellverlustes mit erweiterten Sinusoiden „ausgefranst“. Die Prävalenz der Tiere mit mononukleären Infiltraten und Verfettungen sowie deren Ausmaß reduzierte sich, die Prävalenz der Tiere mit Gallengangsproliferation dagegen erhöhte sich während der Verabreichung von Chloroform. Bei einem Tier wurde nach der 13-wöchigen Applikation ein hepatozelluläres Adenom diagnostiziert.

4.3.4 FAH

4.3.4.1 Prozentuale Verteilung der FAH-Typen

Die prozentuale Verteilung der FAH-Typen nach der Verabreichung von Chloroform wich nicht deutlich von der der Kontrolltiere ab (s. Tab. 69).

4.3.4.2 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

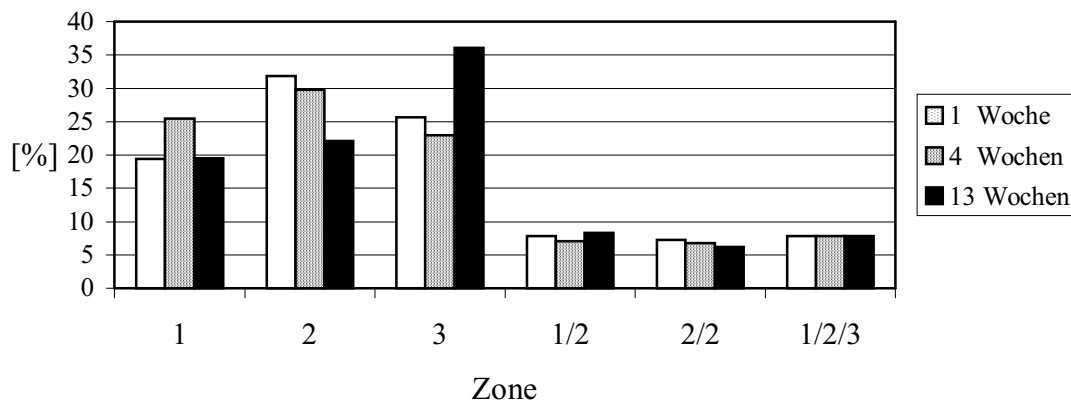


Abb. 13: Prozentualer Anteil der FAH in den verschiedenen Zonen nach Chloroform-Applikation

Der Hauptanteil der FAH war nach 1- und 4-wöchiger Chloroform-Applikation mit 32 % und 30 % in Zone 2 lokalisiert. Nach 13 Wochen war der Anteil in Zone 2 auf 22 % abgefallen. Im Gegenzug dazu stieg der prozentuale Anteil der FAH in Zone 3 von 26 % nach 1 Woche auf 36 % nach 13 Wochen an. Der Anteil der FAH, die aufgrund ihrer Lokalisation oder Größe mehreren Zonen (Zone 1/2, Zone 2/3, Zone 1/2/3) zugeordnet wurden, blieb mit jeweils 7 % bis 8 % relativ konstant.

Für CCF und NAH ließ sich der gleiche Verlauf einer Verschiebung von Zone 2 als Hauptlokalisationszone zu Zone 3 nach 13 Wochen beobachten (s. Tab. 60).

Die Verteilung der GST-P-positiven CCF (s. Tab. 61) entsprach tendenziell mit den höchsten Werten in Zone 3 (41 %, 36 %, 55 % nach 1, 4 und 13 Wochen) und den niedrigsten Werten in Zone 1 (7 %, 4 %, 4 %) den Kontrollen. Sich von den Kontrollen unterscheidend lag nach 13 Wochen mit 32 % ein höherer Anteil GST-P-negativer CCF in Zone 3 als in Zone 1 (25 %) vor.

4.3.4.3 Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche

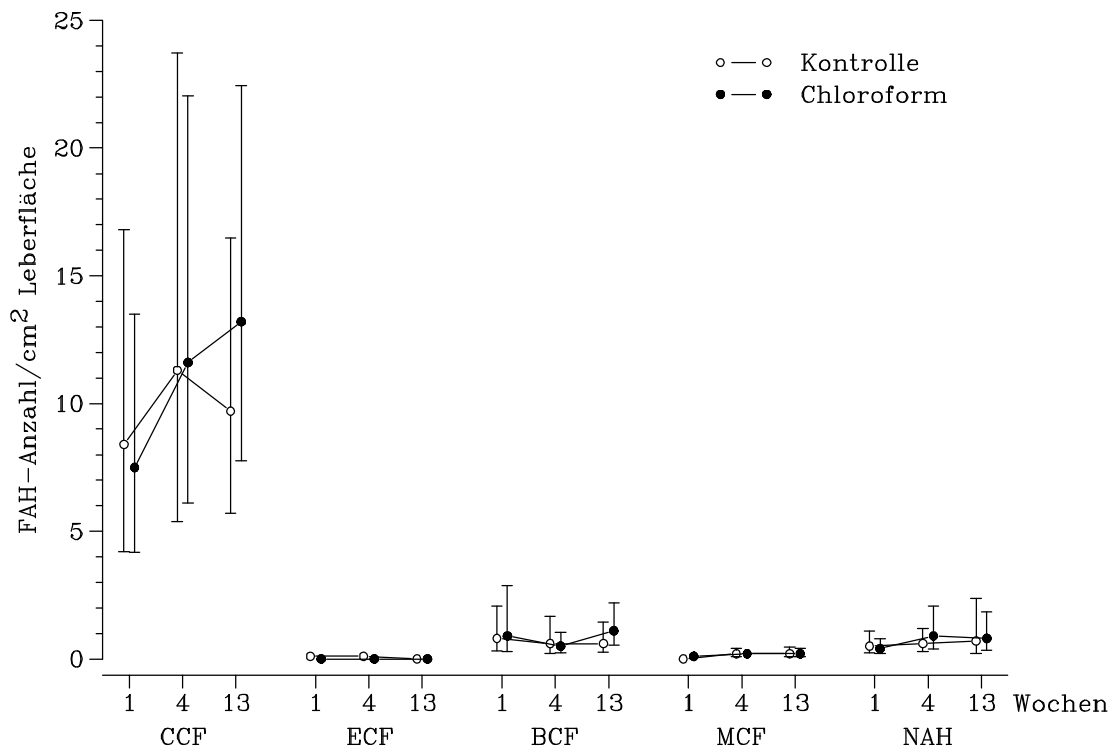


Abb. 14: Anzahl der verschiedenen FAH-Typen pro cm² Leberfläche (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von Chloroform

FAH = “focus of altered hepatocytes“; CCF = “clear cell focus“, ECF = “eosinophilic cell focus“; BCF = “basophilic cell focus“; MCF = “mixed cell focus“, NAH = nicht abgrenzbare Herde

Die Gesamtzahl an FAH pro cm² Leberfläche zeigte während der Chloroform-Applikation einen stetigen (allerdings statistisch nicht signifikanten) Anstieg, so daß nach 13 Wochen 1,4 mal mehr FAH/cm² vorlagen als bei den Kontrolltieren (s. Tab. 68). Bei der gesonderten Betrachtung der verschiedenen FAH-Typen stieg die Gesamtanzahl an CCF pro cm² von 7,5 nach 1 Woche auf 11,6 nach 4 Wochen und auf 13,2 nach 13 Wochen an. Der Anstieg war hauptsächlich durch die Erhöhung der Anzahl GST-P-negativer CCF bedingt (s. Tab. 40). Für keinen FAH-Typ wurden statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen noch über den zeitlichen Verlauf ermittelt.

4.3.4.4 Zellzahl pro FAH-Querschnitt

Die Verabreichung von Chloroform führte weder im Vergleich zur Kontrolle noch im zeitlichen Verlauf zu statistisch signifikanten Veränderungen in der Zellzahl pro FAH-Querschnitt (s. Tab. 41).

4.3.4.5 Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

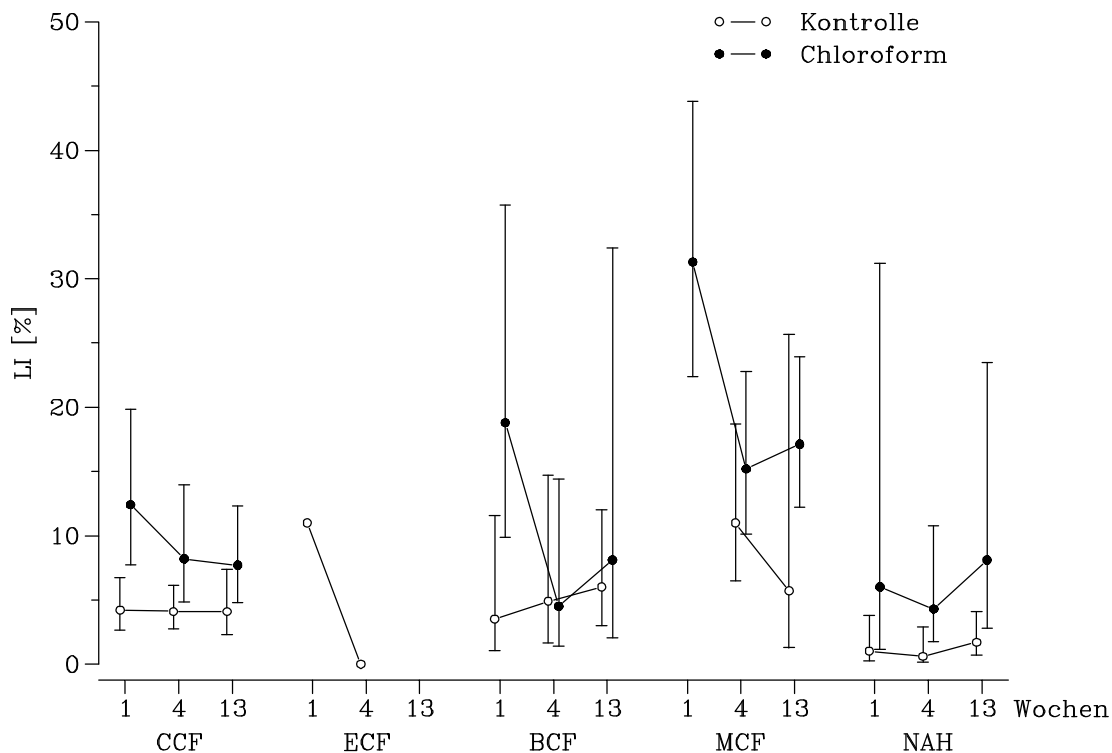


Abb. 15: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der verschiedenen FAH-Typen nach Verabreichung von Chloroform

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| CCF | b | a | |
| ECF | | | |
| BCF | b | | |
| MCF | | | |
| NAH | b | b | b |

Tab. 17: Signifikanzen zu Abb. 15

a, b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$

In CCF war der LI mit 12,4 % nach 1 Woche 3-fach über die Kontrollwerte erhöht. Daraufhin fiel der LI_{CCF} auf 8,2 % und 7,7 % ab, womit auch nach 4 Wochen noch eine statistisch signifikante 2-fache Steigerung vorlag. Dieser Verlauf wurde durch die in höherer Anzahl vorliegenden GST-P-negativen CCF bestimmt (12,8 %, 8,7 %, 7,5 %). Der LI_{BCF} zeigte nach 1 Woche eine 5,4-fache Erhöhung. In NAH konnte nach 1-, 4- und 13-wöchiger Chloroform-Applikation eine signifikante 6-, 7,2- und 4,3-fache Erhöhung des LI gegenüber den Kontrollwerten ermittelt werden.

Die absolute Anzahl an Apoptosen lag mit jeweils einer Apoptose in jeweils zwei CCF in der 1- und 13-Wochen-Gruppe unter der absoluten Anzahl bei den Kontrolltieren (11, 18 und 13

Apoptosen nach 1, 4 und 13 Wochen), rechnerisch konnte die Abweichung aber als nicht signifikant gesichert werden.

4.3.5 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

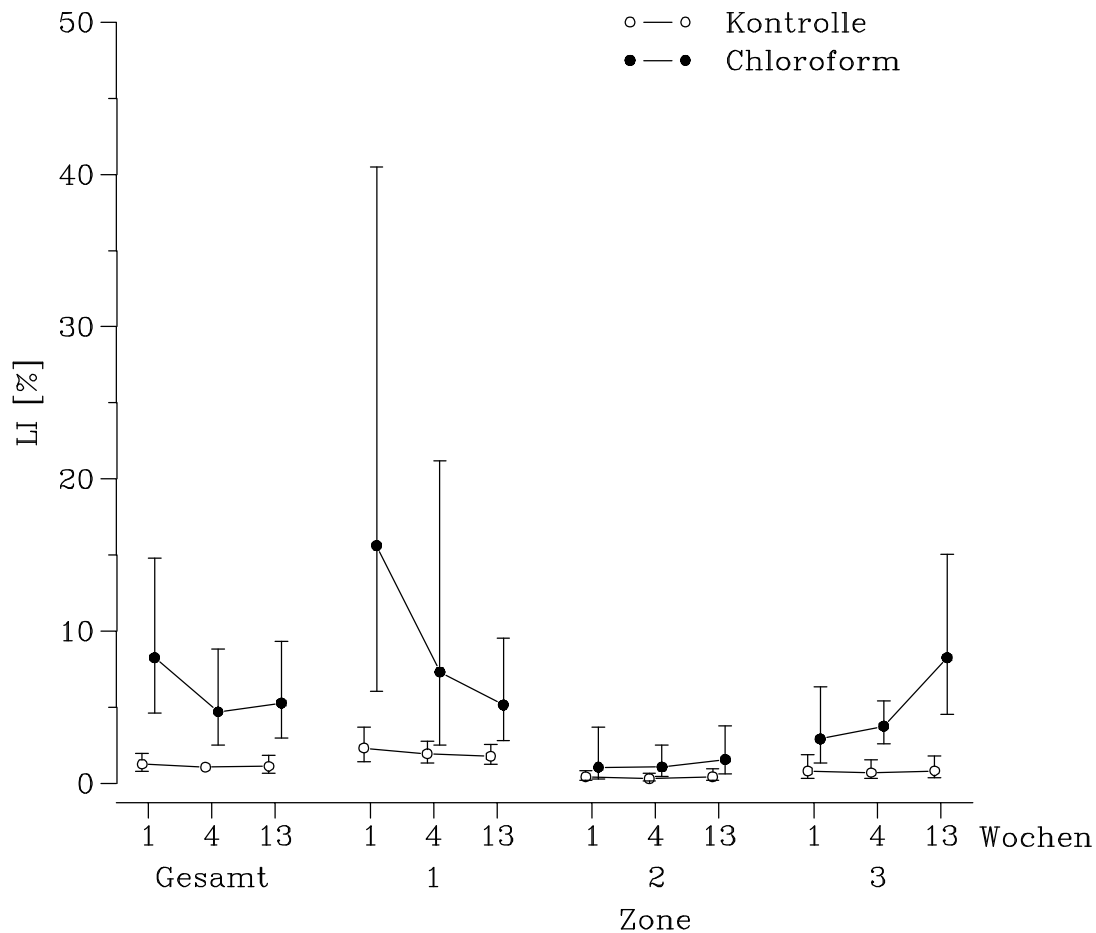


Abb. 16: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) des extrafokalen Lebergewebes für die 3 Zonen getrennt sowie Gesamt-LI nach Verabreichung von Chloroform

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| Gesamt | b | b | b |
| Zone 1 | b | b | b |
| Zone 2 | | a | b |
| Zone 3 | a | b | b |

Tab. 18: Signifikanzen zu Abb. 16

a, b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$

Der LI_{GES} war nach 1-wöchiger Chloroform-Applikation mit 8,3 % 6,6-fach über die Kontrollwerte gesteigert, wobei die Erhöhung in allen drei Zonen mit stärkster Ausprägung in Zone 1 vorlag ($LI_{Z1} = 6,8$ -fach, $LI_{Z2} = 2,4$ -fach, $LI_{Z3} = 3,6$ -fach). Nach 4 und 13 Wochen ver-

ringert sich der LI_{GES} auf 4,7 % bzw. 5,3 %, lag damit aber noch 4,4- bzw. 4,7-fach über den Kontrollwerten. Der LI_{Z1} verringerte sich während der Behandlung, der LI_{Z3} stieg dagegen an. So fanden sich die höchsten Steigerungen nach 4 Wochen (5,3-fach) und 13 Wochen (10-fach) in Zone 3.

4.4 Wyeth-14,643

4.4.1 Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht

Tab. 19: Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht nach Verabreichung von Wyeth-14,643

| Applikationsdauer | Körpergewicht (g) (MW±SD) | | abs. Lebergewicht (g) (MW±SD) | | rel. Lebergewicht (%) (MW±SD) | |
|-------------------|------------------------------|-------------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
| | WY | Kontrolle | WY | Kontrolle | WY | Kontrolle |
| 1 Woche | 690,9±70,6 | 713,3±107,3 | 32,8±4,5** | 24,3±3,9 | 4,75±0,47** | 3,42±0,31 |
| 4 Wochen | 654,7±65,7 | 680,8±78,2 | 32,0±3,9** | 24,4±3,1 | 4,90±0,45** | 3,58±0,22 |
| 13 Wochen | 600,3±49** | 685,4±56,9 | 32,1±3,2** | 23,0±3,1 | 5,41±0,44** | 3,30±0,38 |

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, zweiseitig)

abs. = absolut; MW = Mittelwert; rel. = relativ; SD = Standardabweichung; WY = Wyeth-14,643

Aus der kontinuierlichen Reduktion des Körpergewichtes während der Verabreichung (nach 13 Wochen um ca. 12 %) und der konstanten Erhöhung des absoluten Lebergewichts (1,3- bis 1,4-fach über Kontrollen) resultierte der 1,4-fache Anstieg des relativen Lebergewichts nach 1 und 4 Wochen sowie der 1,6-fache Anstieg nach 13 Wochen.

4.4.2 Makroskopische Befunde

Bei der makroskopischen Betrachtung der Leberoberfläche wurden nach 1 Woche bei 20 %, nach 4 Wochen bei 60 % und nach 13 Wochen bei 80 % der Ratten herdförmige Veränderungen von roter, gelber und brauner Farbe mit einem Durchmesser von 1-5 mm gefunden. Ein Tier zeigte nach 4 Wochen eine 12 mm im Durchmesser große Umfangsvermehrung im Lobus sinister lateralis. Nach 13-wöchiger Verabreichung ließen die Lebern von 40 % der Tiere eine granuliert Leberoberfläche erkennen.

4.4.3 Histologische Befunde

Die Hepatozyten zeigten nach der Verabreichung von Wyeth-14,643 ein diffuse Hypertrophie, waren von polygonaler Form und hatten ein homogen eosinophil fein granuliertes Zytoplasma, das in Zone 3 etwas aufgelockerter wirkte. Die hellen Kerne ließen deutliche Nuc-

leoli und eine mit fortschreitender Applikation zunehmende Anisokariose erkennen. Nach 13 Wochen wiesen die Lebern ein extrem heterogenes Bild mit polymorphen Hepatozyten und einer unregelmäßigen Läppchenstruktur auf.

Nach der einwöchigen Behandlung waren bei 60 % der Ratten teils herdförmige, teils mehrere Leberläppchen einnehmende flächenhafte Nekrosen mit Blutungen und einer Infiltration mit Entzündungszellen (überwiegend mononukleäre Zellen, z. T. auch neutrophile Granulozyten) zu beobachten. Nach 4 und 13 Wochen verringerten sich die Nekrosen in ihrer Anzahl pro Tier ebenso wie in der Prävalenz in der Gruppe und der Größe. In zunehmendem Maße traten herdförmige mononukleäre Infiltrate auf. Weiterhin stieg die Prävalenz von Gallengangsproliferationen, die häufig von mononukleären Entzündungszellen umgeben waren, gegenüber den Kontrollen an.

4.4.4 FAH

4.4.4.1 Prozentuale Verteilung der FAH-Typen

CCF waren zu allen Untersuchungszeitpunkten der am häufigsten gefundene FAH-Typ. Der prozentuale Anteil fiel von 89 % nach 1 Woche auf 82 % nach 4 Wochen und 79 % nach 13 Wochen. Einen Anstieg dagegen zeigte der prozentuale Anteil der BCF (5 % nach 1 Woche, 13% nach 4 Wochen, 10 % nach 13 Wochen)(s. Tab. 69). Nach der Verabreichung von Wyeth-14,643 traten BCF auf, deren Hepatozyten sich durch ein nur schwach basophiles Zytoplasma auszeichneten. Ihr Anteil an BCF betrug nach 1 Woche 60 %, nach 4 Wochen 26 % und nach 13 Wochen 36 %. Der Anteil an BCF-NOS an BCF lag bei 15 %, 10 % und 18% nach 1, 4 und 13 Wochen.

Nur 2 % bis 4 % der BCF exprimierten GST-P. Die schwach basophilen BCF waren alle GST-P-negativ. Der prozentuale Anteil GST-P-exprimierender CCF nahm während der Applikation zu (4 % nach 1 Woche, 23 % nach 4 Wochen, 31 % nach 13 Wochen). Die GST-P-Expression war bei 8 % der GST-P-positiven CCF nach 4 Wochen und bei 44 % der GST-P-positiven CCF nach 13 Wochen nur von schwachem Ausmaß. FAH wurden auch dann als GST-P-positiv eingestuft, wenn nur vereinzelte Hepatozyten GST-P exprimierten. Bei 47 % der GST-P-positiven CCF bestand nach 13-wöchiger Applikation eine nur partielle GST-P-Expression (d. h. der FAH beinhaltete GST-P-positive und GST-P-negative Hepatozyten). Die Ursache für die Einstufung als GST-P-positiv lag in der GST-P-Expression zahlreicher, disseminiert über das Leberläppchen verteilter Hepatozyten.

4.4.4.2 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

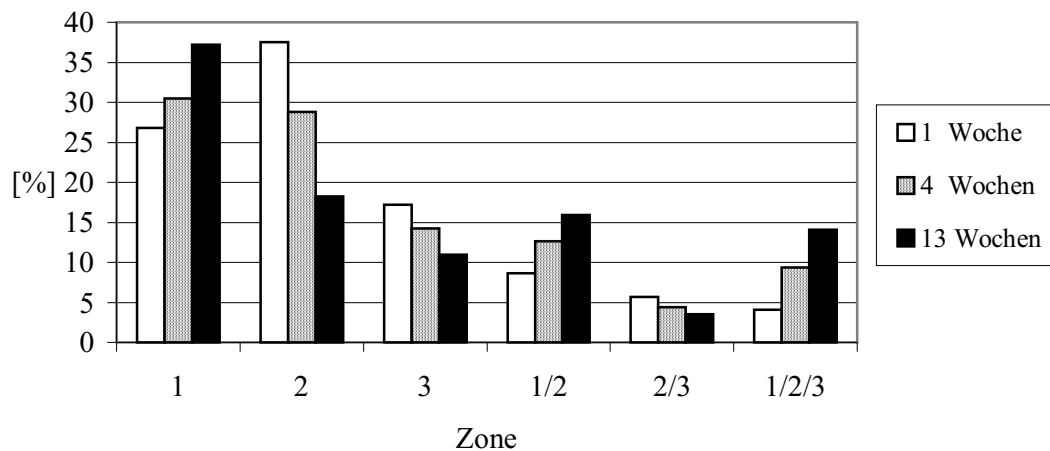


Abb. 17: Prozentualer Anteil der FAH in den verschiedenen Zonen nach Verabreichung von Wyeth-14,643

Nach 1 Woche lag der Hauptanteil der FAH mit 38 % in Zone 2. Während der Verabreichung von Wyeth-14,643 erfolgte eine Verschiebung hin zu Zone 1: Der prozentuale Anteil in Zone 2 reduzierte sich auf 28 %, in Zone 1 kam es dagegen zu einem Anstieg von 27 % nach 1 Woche auf 30 % nach 4 und 37 % nach 13 Wochen. Zusätzlich erhöhte sich der prozentuale Anteil an FAH, die Zone 1/2 (von 6 % auf 16 %) und Zone 1/2/3 (von 4 % auf 11 %) zugeordnet wurden.

Die Verschiebung nach Zone 1 als Hauptlokalisationszone ließ sich bei allen FAH-Typen nachvollziehen (s. Tab. 62).

Bei der vergleichenden Betrachtung GST-P-positiver und -negativer CCF entsprach die Verteilung innerhalb des Leberläppchens nach 1 Woche den Kontrollen (s. Tab. 63). Nach 1 Woche lagen 36 % der GST-P-positiven CCF in Zone 3, der Anteil verringerte sich aber im Laufe der Verabreichung auf 17 % nach 4 Wochen und auf 9 % nach 13 Wochen. Dagegen erhöhte sich der Anteil der GST-P-positiven CCF in Zone 1 von 10 % nach 1 Woche auf 37 % nach 4 Wochen und auf 45 % nach 13 Wochen.

4.4.4.3 Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche

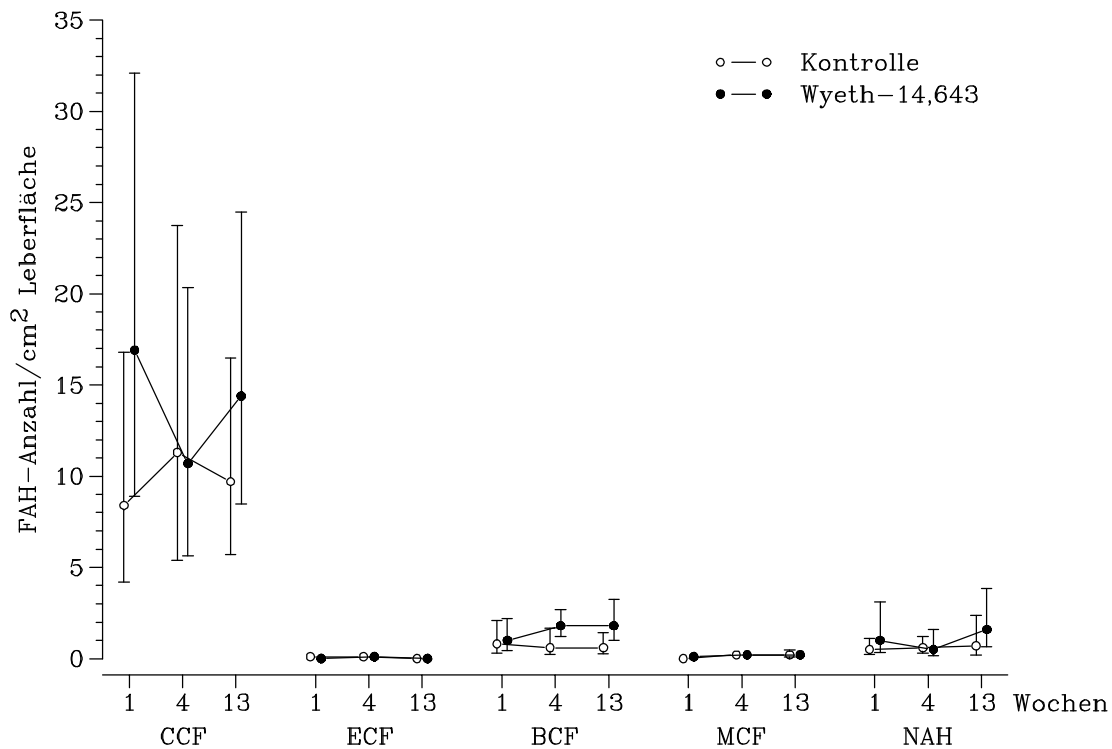


Abb. 18: Anzahl der verschiedenen FAH-Typen pro cm² Leberfläche (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von Wyeth-14,643

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus", ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus", NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| CCF | | | |
| ECF | | | |
| BCF | | a | a |
| MCF | | | |
| NAH | | g | e |

Tab. 20: Signifikanzen zur Abb. 18

a: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,05$

e: signifikante Unterschiede zu 4 Wochen mit $p \leq 0,05$

g: signifikante Unterschiede zu 13 Wochen mit $p \leq 0,05$

Die Gesamtanzahl der FAH pro cm² Leberfläche war nach 1 Woche 1,9-fach über Kontrollwerte erhöht, fiel nach 4 Wochen auf Kontrollniveau und steigerte sich nach 13 Wochen wieder auf das 1,6-fache der Kontrollen (s. Tab. 68). Dieser Verlauf über die Zeit konnte bei CCF nachvollzogen werden (2- und 1,5-fache Steigerung nach 1 und 13 Wochen). Die Veränderungen waren aber weder im Vergleich zu den Kontrollen noch im Vergleich der drei Zeitpunkte von statistischer Signifikanz.

GST-P-positive und -negative CCF wiesen einen grundsätzlich unterschiedlichen Verlauf auf (s. Tab. 44). GST-P-positive CCF lagen nach 1 Woche bei den mit Wyeth-14,643 behandelten Tieren in signifikant niedrigerer Anzahl/cm² ($0,67/\text{cm}^2$) vor als bei den Kontrolltieren

(2,1/cm²) und vermehrten sich – aber nicht statistisch signifikant - im Laufe der Verabreichung auf das 1,4-fache der Kontrollen. Die Anzahl der GST-P-negativen CCF/cm² entwickelte sich im Verlauf über die Zeit ähnlich der CCF-Gesamtanzahl (2,7 und 1,4-fache Steigerung nach 1 und 13 Wochen). Die 3-fache Steigerung der Gesamtanzahl an BCF/cm² nach 4 und 13 Wochen war durch die Erhöhung der Anzahl der GST-P-negativen BCF bedingt (s. Tab. 44).

4.4.4.4 Zellzahl pro FAH-Querschnitt

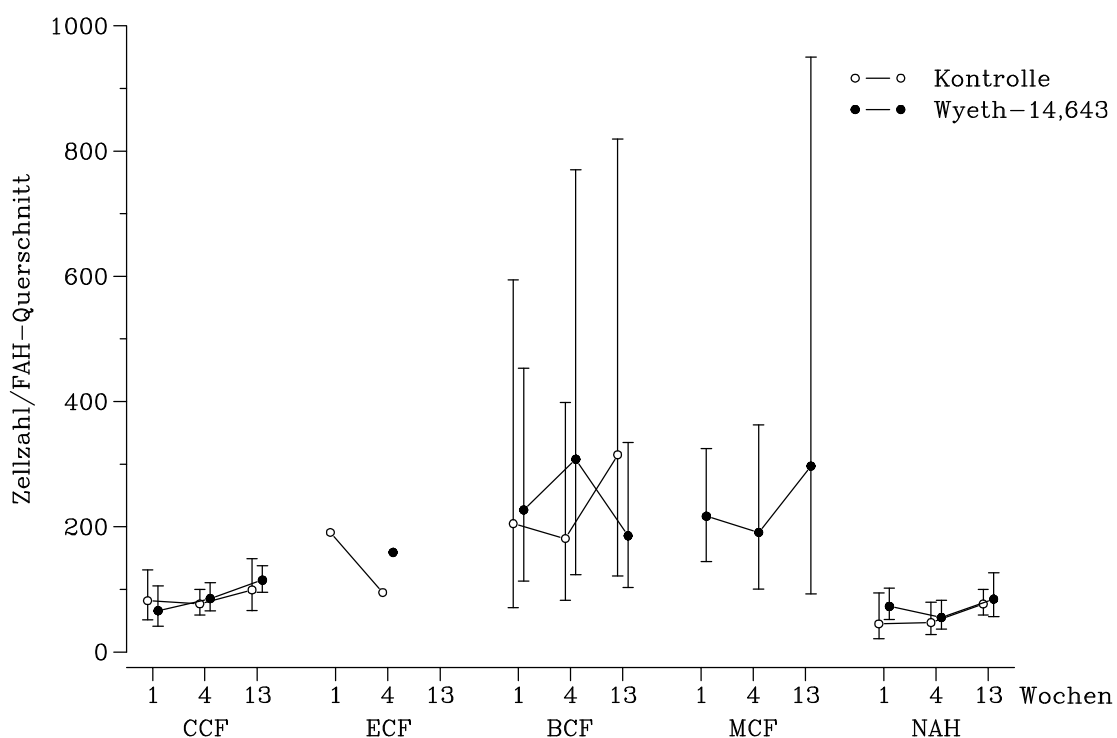


Abb. 19: Zellzahl der verschiedenen FAH-Typen pro FAH-Querschnitt (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von Wyeth-14,643

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

Die Zellzahl pro CCF-Querschnitt erhöhte sich – allerdings nicht statistisch signifikant - während der Wyeth-14,643-Verabreichung kontinuierlich von 66 über 85 auf 115 Zellen/FAH. Auch für die anderen FAH-Typen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Kontrollen ermittelt werden.

4.4.4.5 Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

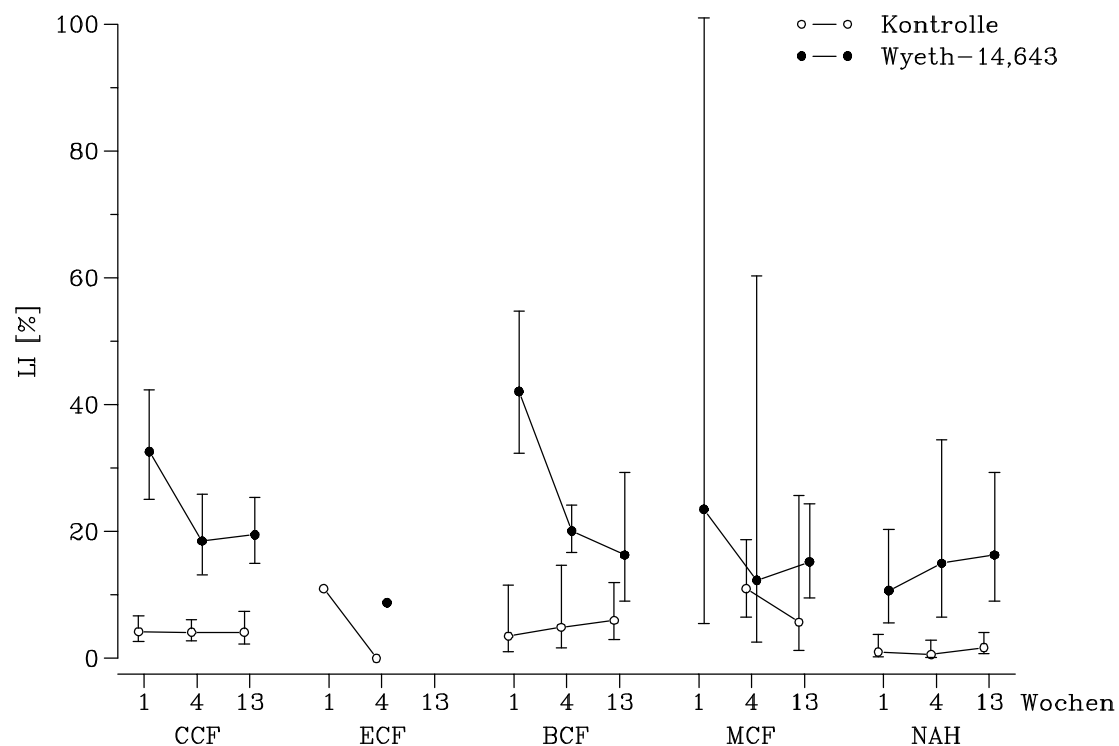


Abb. 20: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der verschiedenen FAH-Typen nach der Verabreichung von Wyeth-14,643

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus", ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus", NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---------|------|------|
| CCF | b, f, h | b, d | b, d |
| ECF | | | |
| BCF | b, f, h | b, d | d |
| MCF | | | |
| NAH | b | b | b |

Tab. 21: Signifikanzen zur Abb. 20

b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,01$

d: signifikante Unterschiede zu 1 Woche mit $p \leq 0,01$

f: signifikante Unterschiede zu 4 Wochen mit $p \leq 0,01$

h: signifikante Unterschiede zu 13 Wochen mit $p \leq 0,01$

In allen FAH-Typen war die Zellproliferationsrate zu allen Zeitpunkten über die Kontrollwerte erhöht. Bei CCF und BCF wurde eine starke Erhöhung des LI nach 1 Woche mit nachfolgendem Abfall ermittelt. Der LI in CCF lag mit 32,6 % 7,8-fach höher als die Kontrollwerte, nach 4 und 13 Wochen war der LI weiterhin mit 18,5 % und 19,5 % um den Faktor 4,5 bzw. 4,8 gesteigert. Bei der selektiven Betrachtung wurde dieser Verlauf bei GST-P-negativen CCF wiedergefunden (s. Tab. 46). In GST-P-positiven CCF dagegen wurden maximale Steigerungen nach 13 Wochen bestimmt (3,5-, 4,8- und 6,9-faches der Kontrollwerte nach 1, 4 und 13 Wochen). In BCF fiel der LI während der Verabreichung von 42,1 % (12-faches der Kontrollen) nach 1 Woche auf 20,1 % (4,1-faches der Kontrollen) und 16,3 % (2,7-faches der Kontrollen). Die Entwicklung wurde durch die GST-P-negativen BCF bestimmt (s. Tab. 46).

Die Verabreichung von Wyeth-14,643 führte in NAH zu einem Anstieg des LI von 10,7 % auf 15 % und 16,3%, was einer 10,7-, 25- und 8,6-fachen Steigerung über Kontrollwerte entspricht.

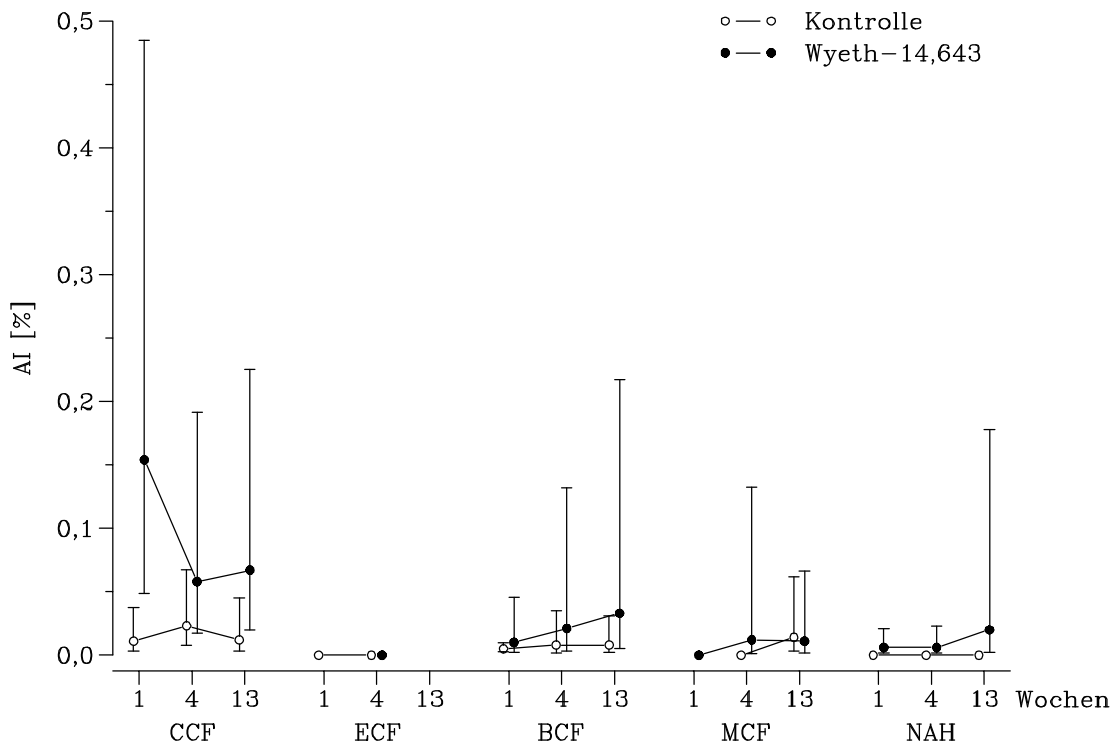


Abb. 21: Apoptose-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der verschiedenen FAH-Typen nach Verabreichung von Wyeth-14,643

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| CCF | b | | a |
| ECF | | | |
| BCF | | | |
| MCF | | | |
| NAH | | | |

Tab. 22: Signifikanzen zur Abb. 21

a, b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$

Statistisch signifikante Veränderungen des Apoptose-Index` wurden in CCF nach 1 Woche mit 0,154 % (14-faches der Kontrollwerte) und nach 13 Wochen mit 0,067 % (5,6-faches der Kontrollwerte) bestimmt. In NAH lag der AI mit 0,006 % nach 1 und 4 Wochen und 0,02 % nach 13 Wochen über den Kontrollwerten (0 %).

4.4.5 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

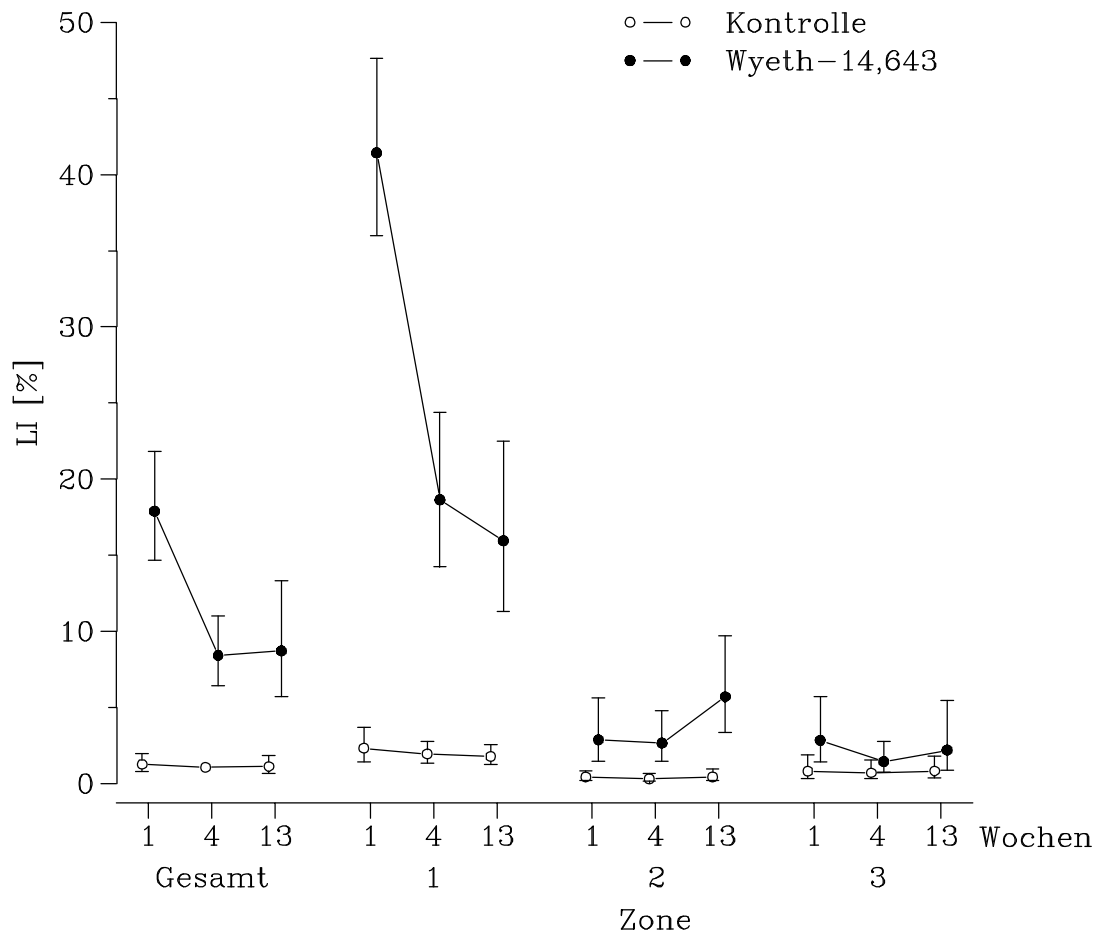


Abb. 22: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) des extrafokalen Lebergewebes in den 3 Zonen sowie Gesamt-LI nach Verabreichung von Wyeth-14,643

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| Gesamt | b | b | b |
| Zone 1 | b | b | b |
| Zone 2 | b | b | b |
| Zone 3 | b | | |

Tab. 23: Signifikanzen zu Abb. 22

b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,01$

Der LI_{GES} zeigte sich zu allen Untersuchungszeitpunkten - mit höchster Steigerung nach 1 Woche und nachfolgendem Abfall - erhöht (14,2-, 7,9- und 7,7-faches der Kontrollwerte nach 1, 4 und 13 Wochen). Die Steigerung war in allen Zonen wiederzufinden, wobei der LI während der gesamten Verabreichung in Zone 1 am höchsten war. Der LI_{Z1} lag nach 1 Woche bei 41,4 % (17,9-faches der Kontrollen) und reduzierte sich auf 18,6 % und 16 % (9,6- und 9-faches der Kontrollen) nach 4 und 13 Wochen. Der LI_{Z2} lag nach 1 und 4 Wochen bei 2,9 % und 2,7 % und stieg daraufhin auf 5,7 % an (6,7-, 8,6- und 3,3-faches der Kontrollen).

4.5 Ethinylestradiol

Eine Ratte verstarb während der 12. Behandlungswoche. Das Tier wurde seziiert und makroskopische Befunde erhoben.

4.5.1 Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht

Tab. 24: Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht nach Verabreichung von Ethinylestradiol

| Applikationsdauer | Körpergewicht (g) (MW±SD) | | Abs. Lebergewicht (g) (MW±SD) | | rel. Lebergewicht (%) (MW±SD) | |
|-------------------|------------------------------|-------------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
| | EE | Kontrolle | EE | Kontrolle | EE | Kontrolle |
| 1 Woche | 652,8±80,6 | 713,3±107,3 | 21,2±3,3 | 24,3±3,9 | 3,27±0,50 | 3,42±0,31 |
| 4 Wochen | 565,0±61,1** | 680,8±78,2 | 22,7±4,2 | 24,4±3,1 | 4,00±0,50* | 3,58±0,22 |
| 13 Wochen | 508,5±36,8** | 685,4±56,9 | 23,8±2,9 | 23,0±3,1 | 4,67±0,36** | 3,30±0,38 |

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, zweiseitig)

abs. = absolut; EE = Ethinylestradiol; MW = Mittelwert; rel. = relativ; SD = Standardabweichung

Die Ratten verloren im Laufe der Behandlung an Körpergewicht. Nach 4 Wochen war das Körpergewicht auf ca. 83 %, nach 13 Wochen auf ca. 74 % der Kontrollen reduziert. Bei statistisch nicht signifikant veränderten absoluten Lebergewichten ergaben sich daraus 1,1- und 1,4-fach erhöhte relative Lebergewichte.

4.5.2 Makroskopische Befunde

Bei 60 % der Tiere der 1-Wochen-Gruppe, bei 90 % der Tiere der 4- und 13-Wochen Gruppe konnten auf der Leberoberfläche z. T. erhobene herdförmige Veränderungen mit einem Durchmesser von 1-5 mm und einer gelben, roten, braunen und grauweißen Farbe beobachtet werden. Die Prävalenz betrug nach 1 Woche 60 %, nach 4 und 13 Wochen 90 %. Je ein Tier zeigte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten eine 1-2 mm im Durchmesser große Zyste auf der Leberoberfläche. Bei einem Tier fand sich nach 4 Wochen im Lobus sinister lateralis eine im Durchmesser 6 mm große Umfangsvermehrung.

4.5.3 Histologische Befunde

Eine im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich verstärkte Gallengangsproliferation lag bei fast allen Ratten vor. Die stärkste Ausprägung fand sich nach vierwöchiger Applikation. Gleichzeitig war die Prävalenz mononukleärer Infiltrate (80 % bis 90 %), die überwiegend in periportalen Bereichen lokalisiert waren, erhöht. Außer den beschriebenen Veränderungen

wich das histologische Bild nach 1 Woche nicht von den Kontrollen ab. Nach 4 Wochen waren auf Zone 1 beschränkte Veränderungen zu beobachten. Die Hepatozyten erschienen abgerundet und die Sinusoide erweitert. Das Zytoplasma der einzelnen Hepatozyten hatte teils klare, teils leicht basophile Anteile. Nach 13 Wochen konnten diese Befunde - die periportale Basophilie in verstärktem Maße - weiterhin beobachtet werden. Die Größe der Hepatozyten und ihrer Kerne variierte. Die periportalen Bereiche wirkten umstrukturiert, da der Verlauf der Leberzellbälkchen von der Zentralvene zur Läppchenperipherie nicht mehr nachzuvollziehen war. Einzelne Hepatozyten schienen sich aus dem Zellverband zu lösen, die Leberzellbälkchen waren z. T. zweireihig, und zwischen den Hepatozyten traten weite, teilweise Erythrozyten enthaltene Räume auf, die aber nicht die Ausrichtung von Sinusoiden zeigten. Weiterhin wurden Einzelzellnekrosen beobachtet.

Ein Tier zeigte nach 13-wöchiger Verabreichung ein hepatozelluläres Adenom.

4.5.4 FAH

4.5.4.1 Prozentuale Verteilung der FAH-Typen

Der prozentuale Anteil an CCF verringerte sich während der Ethinylestradiol-Applikation von 85 % nach 1 Woche auf 77 % und 75 % nach 4 und 13 Wochen. Dagegen stieg der Anteil an BCF (7 %, 10 %, 12 % nach 1, 4 und 13 Wochen) und an MCF (0,8 %, 6 %, 8 % nach 1, 4 und 13 Wochen) an (s. Tab. 69). Der prozentuale Anteil der BCF-NOS an der Gesamtzahl der BCF verringerte sich während der Applikation (1 Woche: 13 von 30 (43 %); 4 Wochen: 11 von 61 (18 %); 13 Wochen: 4 von 95 (4 %)). 24 %, 27 % und 15 % der CCF exprimierten nach 1, 4 und 13 Wochen GST-P. Von den BCF zeigten sich 0 % bis 5 %, von den MCF 0 % bis 7 % GST-P-positiv.

4.5.4.2 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

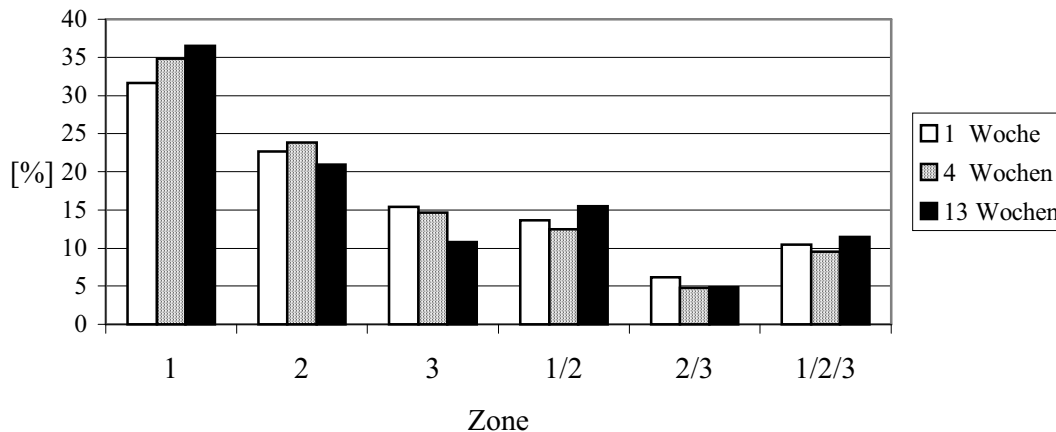


Abb. 23: Prozentualer Anteil der FAH in den verschiedenen Zonen nach Verabreichung von Ethinylestradiol

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes lag der Hauptanteil der FAH in Zone 1 (32 %, 35 % und 37 % nach 1, 4 und 13 Wochen). Auch in den anderen Zonen zeigte der prozentuale Anteil der FAH über die Zeit nur geringe Schwankungen. Bei Betrachtung der einzelnen FAH-Typen (s. Tab. 64) war diese Verteilung bei den CCF wiederzufinden. Der prozentuale Anteil der in der Zone 1 sowie in den Zonen 1/2 gefundenen BCF erhöhte sich während der Verabreichung von Ethinylestradiol (Zone 1: 10 %, 38 % und 34 %; Zonen 1/2: 7 %, 15 % und 24 % nach 1, 4 und 13 Wochen). Im Gegensatz dazu verringerte sich der Anteil der BCF in den Zonen 1/2/3 (57 %, 25 % und 19 %). Von den 5 nach 1 Woche gefundenen MCF wurden 2 Zone 2, 3 den Zonen 1/2/3 zugeordnet. Nach 4 Wochen lagen je 24 % in Zone 1 und 1/2, 27 % in den Zonen 1/2/3. Nach 13 Wochen wurde der größte Teil der MCF in den Zonen 1/2/3 (50 %) und in Zone 1 (30 %) gefunden. Der höchste Anteil der NAH lag in Zone 3 (44 %, 37 %, 39 % nach 1, 4 und 13 Wochen).

Das Verteilungsmuster der GST-P-positiven und -negativen CCF entsprach mit einem höheren Anteil der GST-P-negativen FAH in Zone 1 und einem höheren Anteil der GST-P-positiven FAH in Zone 3 ungefähr den Kontrollen (s. Tab. 65).

4.5.4.3 Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche

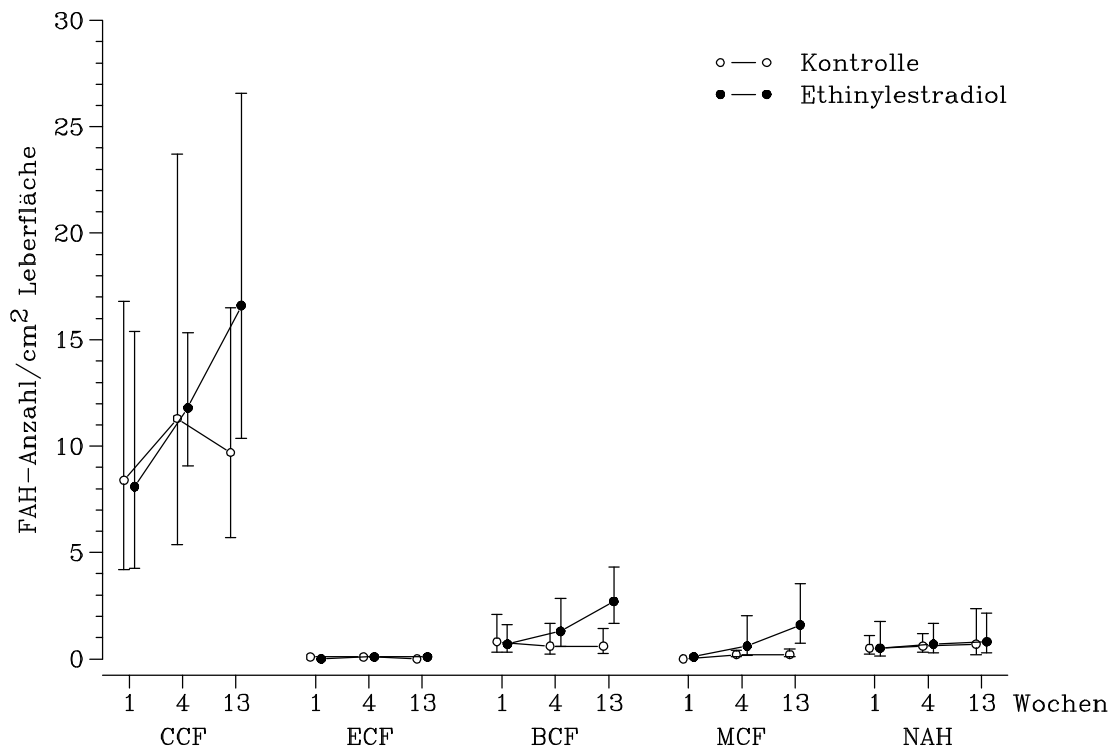


Abb. 24: Anzahl der verschiedenen FAH-Typen pro cm² Leberfläche (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von Ethinylestradiol

FAH = “focus of altered hepatocytes“; CCF = “clear cell focus“, ECF = “eosinophilic cell focus“; BCF = “basophilic cell focus“; MCF = “mixed cell focus“, NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|------|------|------|
| CCF | g | | c |
| ECF | | | |
| BCF | g | | b, c |
| MCF | f, h | b, d | b, d |
| NAH | | | |

Tab. 25: Signifikanzen zur Abb. 24

b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,01$

c, d: signifikante Unterschiede zu 1 Woche mit c = $p \leq 0,05$; d = $p \leq 0,01$

f: signifikante Unterschiede zu 4 Wochen mit $p \leq 0,01$

g, h: signifikante Unterschiede zu 13 Wochen mit g = $p \leq 0,05$; h = $p \leq 0,01$

Die Gesamt-FAH-Anzahl pro cm² Leberfläche stieg während der 1-, 4- und 13-wöchigen Ethinylestradiol-Applikation kontinuierlich an (10,3, 15,7, 22,8). Nach 13 Wochen lag der Wert 1,9-fach über Kontrollniveau. Der Anstieg war bedingt durch die Erhöhung der Anzahl der CCF, BCF, NAH und MCF pro cm² (CCF: 8,1, 11,8, 16,6; BCF: 0,66, 1,3, 2,7; NAH: 0,5, 0,7, 0,8; MCF: 0,1, 0,57, 1,6). Eine statistisch signifikante 4,5-fache Steigerung über die Kontrollwerte war bei den BCF nach 13 Wochen sowie bei MCF nach 4 Wochen (3-fach) und 13 Wochen (7,9-fach) vorhanden.

Die gesonderte Betrachtung der GST-P-positiven und -negativen FAH zeigte, daß die Erhöhung in der FAH-Anzahl/cm² durch die GST-P-negativen FAH verursacht wurde (s. Tab. 48).

4.5.4.4 Zellzahl pro FAH-Querschnitt

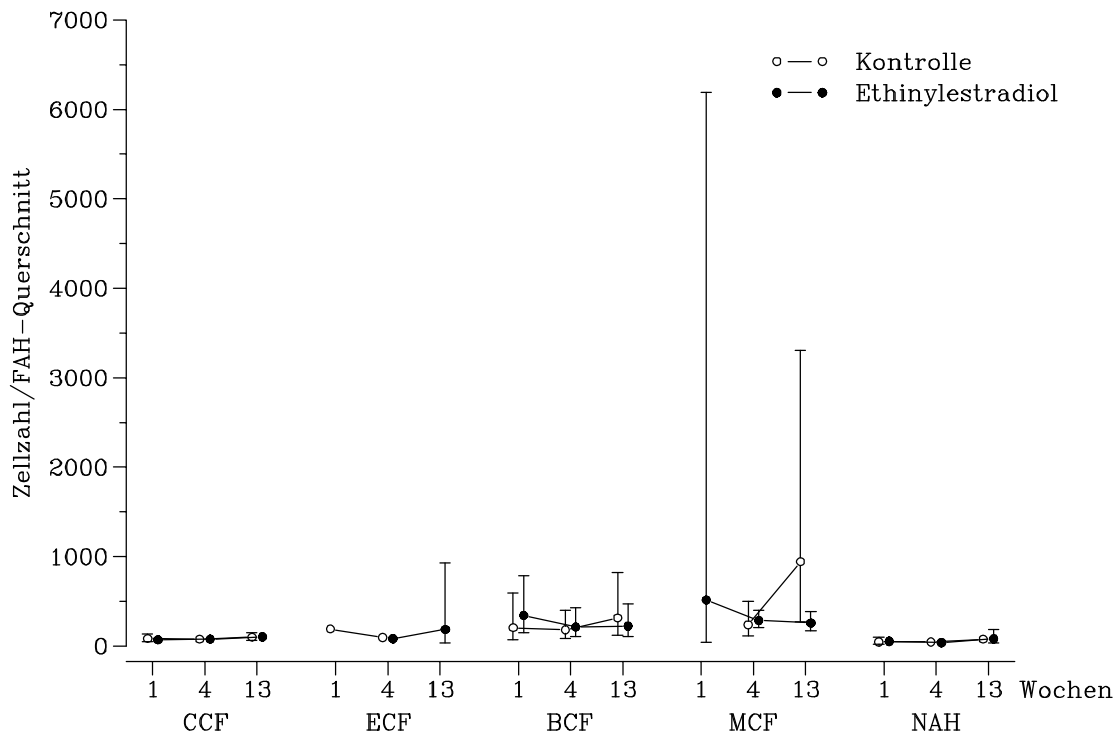


Abb. 25: Zellzahl der verschiedenen FAH-Typen pro FAH-Querschnitt (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von Ethinylestradiol

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

Für keinen FAH-Typen ließen sich statistisch signifikante Abweichungen von den Kontrollen oder Veränderungen im Zeitverlauf ermitteln. Die durchschnittliche Zellzahl/MCF-Querschnitt betrug 516, 286 und 258 nach 1, 4 und 13 Wochen. Der hohe Wert und dessen Streufaktor nach 1 Woche wurde durch einen Einzeltierwert von 9073 Zellen pro MCF-Querschnitt verursacht (s. Tab. 49).

4.5.4.5 Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

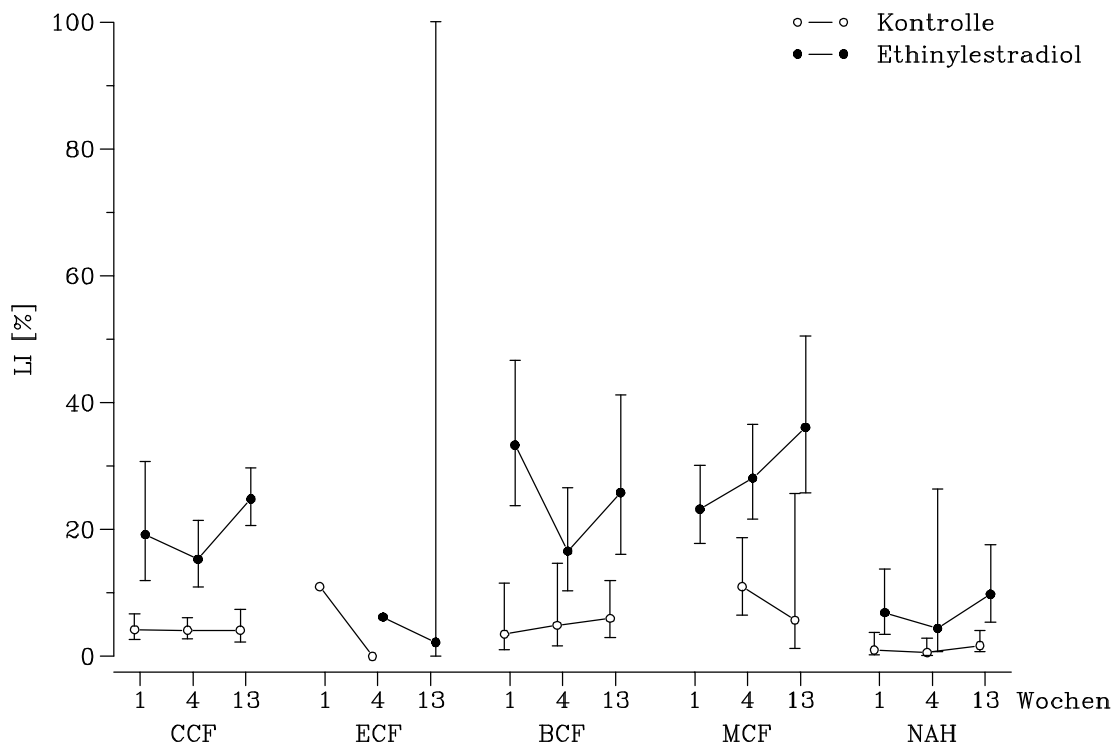


Abb. 26: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der verschiedenen FAH-Typen nach Verabreichung von Ethinylestradiol

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus", ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus", NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|------|------|------|
| CCF | b | b, g | b, e |
| ECF | | | |
| BCF | b, e | b, c | b |
| MCF | | | |
| NAH | a | b | a |

Tab. 26: Signifikanzen zur Abb. 26

a, b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $a = p \leq 0,05$; $b = p \leq 0,01$

c: signifikante Unterschiede zu 1 Woche mit $p \leq 0,05$

e: signifikante Unterschiede zu 4 Wochen mit $p \leq 0,05$ $g = p \leq 0,01$

g: signifikante Unterschiede zu 13 Wochen mit $p \leq 0,05$

In allen auftretenden FAH-Typen war der LI im Vergleich zu den Kontrollen zu allen Untersuchungszeitpunkten erhöht. Der Verlauf des LI war bei CCF, BCF und NAH von einer initialen Steigerung über die Kontrollen, einem darauffolgenden Abfall und einer erneuten Erhöhung nach 13 Wochen gekennzeichnet (CCF: 19,2 %, 15,3 %, 24,8 % (4,6-, 3,7-, 6,1-fach); BCF: 33,3 %, 16,6 %, 25,8 % (9,5-, 3,4-, 4,3-fach); NAH: 6,9 %, 4,4 %, 9,8 % (6,9-, 7,3-, 5,2-fach)). GST-P-negative CCF ließen den gleichen Verlauf erkennen, GST-P-positive CCF dagegen zeigten nach 13 Wochen eine weitere Verringerung (auf das 3,7-fache der Kontrollen) und keinen erneuten Anstieg des LI (s. Tab. 50). Die Zellproliferation in MCF stieg im Zeitverlauf stetig von 23,2 % nach 1 Woche auf 28,1 % nach 4 Wochen und 36,1 % nach 13 Wochen an.

Der Apoptose-Index war im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert. In MCF, die in den Kontrollgruppen nach 1 Woche gar nicht, nach 4 und 13 Wochen nur vereinzelt auftraten, lag der durchschnittliche AI zwischen 0,006 % und 0,012 %.

4.5.5 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

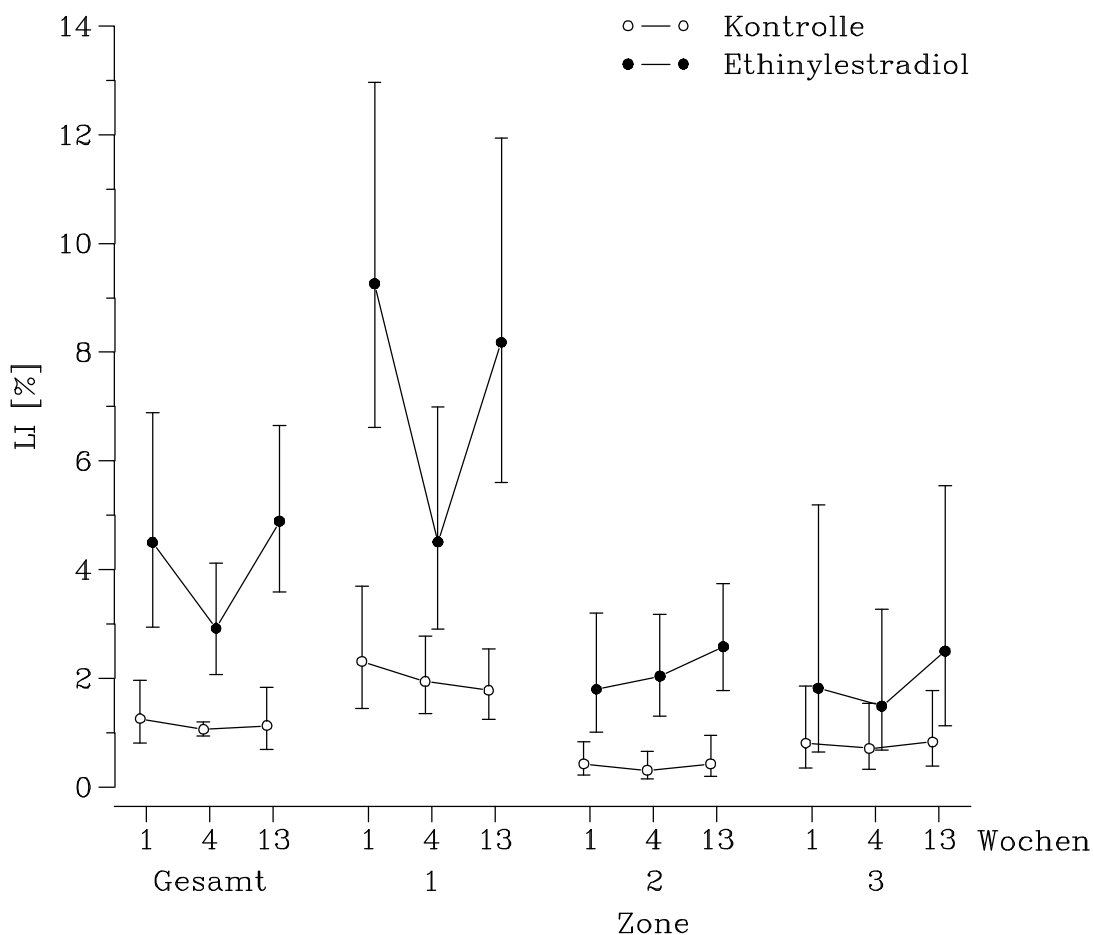


Abb. 27: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) des extrafokalen Lebergewebes in den 3 Zonen sowie Gesamt-LI nach Verabreichung von Ethinylestradiol

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| Gesamt | b | b | b |
| Zone 1 | b | b | b |
| Zone 2 | b | b | b |
| Zone 3 | | | a |

Tab. 27: Signifikanzen zu Abb. 27

a, b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$

Der LI_{GES} lag während der gesamten Ethinylestradiol-Applikation über den Kontrollwerten. Der Steigerung auf 4,5 % (3,6-faches der Kontrollen) nach 1 Woche folgte ein leichter Abfall auf 2,9 % (2,8-faches der Kontrollen) nach 4 Wochen und ein wiederholter Anstieg auf 4,9 % (4,3-faches der Kontrollen) nach 13 Wochen. Die absolut höchsten LI wurden in Zone 1 er-

mittelt, die mit 9,3 %, 4,5 % und 8,2 % nach 1, 4 und 13 Wochen einen ähnlichen Verlauf zeigten wie der LI_{GES} . Diese Werte entsprachen im Vergleich mit den Kontrollwerten Erhöhungen um den Faktor 4, 2,3 und 4,6. Der LI_{Z3} nach 1, 4 und 13 Wochen war 2,3-, 2,1- und 3-fach höher als die Kontrollwerte. Der LI_{Z2} betrug nach 1,4 und 13 Wochen 1,8 %, 2 % und 2,6 %. Damit konnten die relativ höchsten Steigerungen (4,2-, 6,6- und 6-fach) über Kontrollwerte in Zone 2 beobachtet werden.

4.6 PCB 126

Aus der 13-Wochen-Gruppe verstarb ein Tier am 32. Behandlungstag, ein weiteres Tier wurde am 79. Behandlungstag moribund getötet. Die Befunde des moribund getöteten Tieres wurden mit in die makroskopische Bewertung aufgenommen.

4.6.1 Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht

Tabl. 28: Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht nach Verabreichung von PCB 126

| Applikationsdauer | Körpergewicht (g) (MW±SD) | | Lebergewicht (g) (MW±SD) | | rel. Lebergewicht (%) (MW±SD) | |
|-------------------|------------------------------|-------------|-----------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
| | PCB 126 | Kontrolle | PCB 126 | Kontrolle | PCB 126 | Kontrolle |
| 1 Woche | 742,8±101,7 | 713,3±107,3 | 23,6±2,2 | 24,3±3,9 | 3,28±0,30 | 3,42±0,31 |
| 4 Wochen | 691,5±45,6 | 680,8±78,2 | 25,0±2,3 | 24,4±3,1 | 3,62±0,34 | 3,58±0,22 |
| 13 Wochen | 658,1±50,4 | 685,4±56,9 | 26,5±2,4* | 23,0±3,1 | 4,03±0,36** | 3,30±0,38 |

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, zweiseitig)

abs. = absolut; MW = Mittelwert; rel. = relativ; SD = Standardabweichung

Das Körpergewicht der Tiere verringerte sich, allerdings in statistisch nicht signifikantem Ausmaß, kontinuierlich während der Behandlung. Das absolute und das relative Lebergewicht waren nach 13 Wochen ca. 1,2-fach über die Kontrollen erhöht.

4.6.2 Makroskopische Befunde

Nach 1 Woche betrug die Prävalenz auf der Leberoberfläche beobachteter roter, gelber und brauner herdförmiger Veränderungen (Durchmesser 1-5 mm) 50 %, nach 4 Wochen 70 % und nach 13 Wochen 44 %. Ein bei dem moribund getöteten Tier gefundener Herd hatte einen Durchmesser von 10 mm. Zysten (Durchmesser 3-4 mm) traten nach 1 Woche bei 10 %, nach 4 Wochen bei keinem Tier und nach 13 Wochen bei 20 % der Tiere auf.

4.6.3 Histologische Befunde

Bei den mit PCB 126 behandelten Tieren wurde eine stärkere Verfettung der Hepatozyten als bei den Kontrolltieren beobachtet, die sich nach 1 Woche überwiegend in Zone 1, nach 4 Wochen in den Zonen 1 und 3, und nach 13 Wochen hauptsächlich in Zone 3 fand. Im Verlaufe der Applikation stieg die Prävalenz an Ratten mit mononukleären Infiltraten an (von 70 % auf 100 %), die vorwiegend Bestandteil kleiner Granulome waren, z. T. aber auch die Gallengänge umgaben. 90 % der Lebern wiesen nach 1 Woche Gallengangsproliferationen auf, zu den späteren Zeitpunkten lag die Prävalenz bei 20 % und 25 %. Zwei Tiere der 4-Wochen-Gruppe entwickelten je eine Neoplasie, die als hepatozelluläres Adenom und als histiozytisches Sarkom diagnostiziert wurden.

4.6.4 FAH

4.6.4.1 Prozentuale Verteilung der FAH-Typen

Die prozentuale Verteilung der FAH-Typen wich nicht auffällig von den Kontrollen ab. Bei CCF konnte aber während der Verabreichung von PCB 126 eine Verringerung von 92 % nach 1 Woche auf ca. 86 % nach 4 und 13 Wochen beobachtet werden. Der prozentuale Anteil an BCF stieg von 5 % nach 1 Woche auf ca. 9 % nach 4 und 13 Wochen an. In geringem Ausmaß (0,4 % bis 1,6 %) wurden ECF gefunden (s. Tab. 69). Nach 13-wöchiger Applikation exprimierte mit 31 % ein höherer Anteil an BCF GST-P als bei den Kontrollen (19 %). Zu allen Untersuchungszeitpunkten fanden sich BCF-NOS, deren prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der BCF nach 1 Woche am höchsten lag (1 Woche: 4 von 27, 4 Wochen: 2 von 35, 13 Wochen: 9 von 22).

4.6.4.2 Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

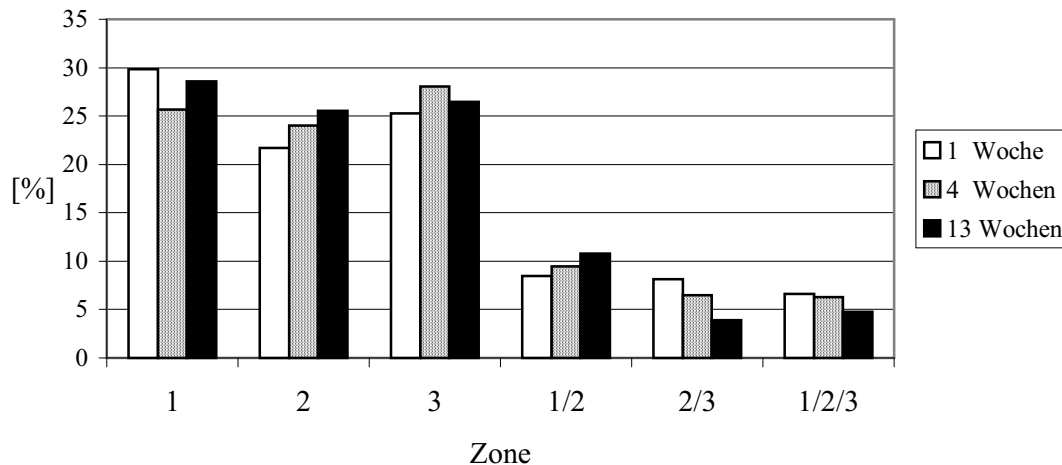


Abb. 28: Prozentualer Anteil der FAH in den verschiedenen Zonen nach Verabreichung von PCB 126

Die FAH waren zu allen drei Untersuchungszeitpunkten zu ähnlichen prozentualen Anteilen in allen drei Zonen lokalisiert (22 % bis 30 %). Es erfolgten zwar während der Verabreichung geringe Schwankungen, aber keine Zone konnte als Hauptlokalisationszone ausgemacht werden. Bei der differenzierten Betrachtung der verschiedenen FAH-Typen (s. Tab. 66) fiel auf, daß der prozentuale Anteil an NAH in Zone 1 (36 %, 24 % und 18 % nach 1, 4 und 13 Wochen) nach der Verabreichung von PCB 126 deutlich höher war als bei den Kontrollen und sich über die Zeit verringerte. Gleichzeitig erfolgte eine Reduktion in Zone 3 (57 %, 43 %, 35 %) und ein Anstieg in Zone 2 (7 %, 29 %, 35 %). Die Hauptlokalisationszone der GST-P-negativen CCF lag bei jedem Untersuchungstermin mit 36 % bis 38 % in Zone 1. Der prozentual höchste Anteil der GST-P-positiven CCF fand sich in Zone 3 mit ansteigender Tendenz (39 %, 45 %, 54 %) (s. Tab. 67).

4.6.4.3 Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche

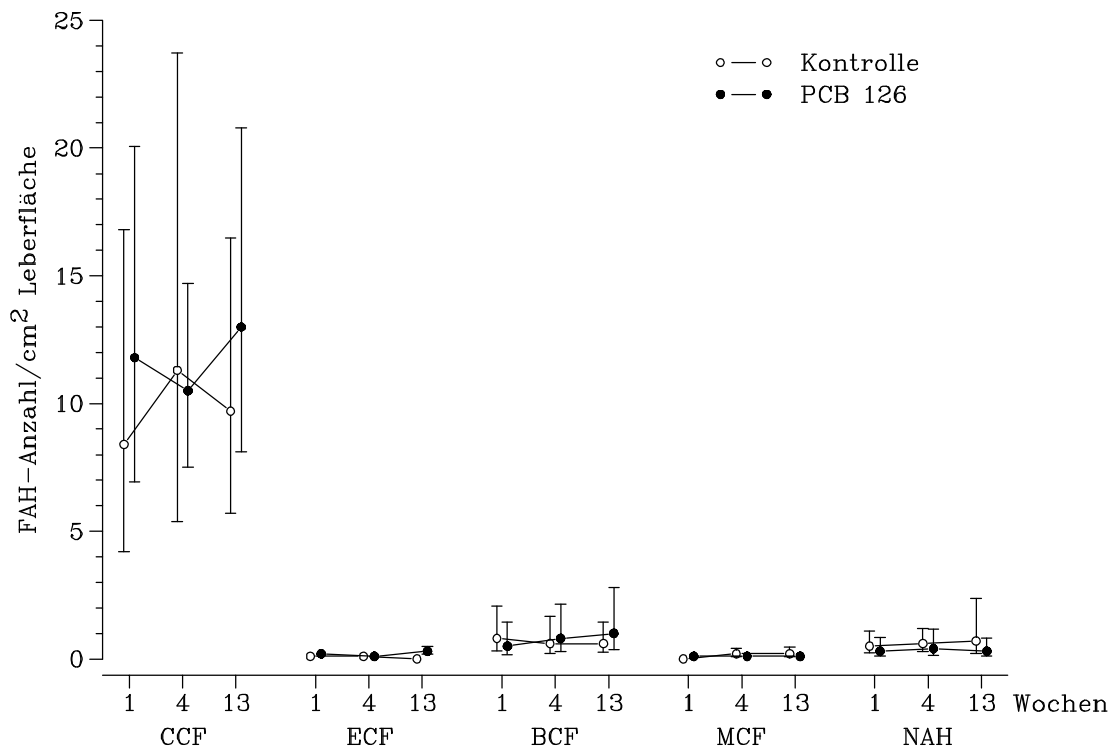


Abb. 29: Anzahl der verschiedenen FAH-Typen pro cm² Leberfläche (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von PCB 126

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus", ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus", NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|------|
| CCF | | | |
| ECF | | h | b, f |
| BCF | | | |
| MCF | | | |
| NAH | | | |

Tab. 29: Signifikanzen zur Abb. 29

b: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,01$

f: signifikante Unterschiede zu 4 Wochen mit $p \leq 0,01$

h: signifikante Unterschiede zu 13 Wochen mit $p \leq 0,01$

Die Gesamtzahl an FAH pro cm² Leberfläche wich zu keinem Zeitpunkt signifikant von den Kontrollen ab (s. Tab. 68). Ursächlich dafür war die Anzahl/cm² an CCF (10,5-13), die sowohl in der Gesamtanzahl als auch in der Anzahl GST-P-positiver und -negativer CCF (s. Tab. 52) ungefähr den Kontrollen entsprach und auch im Zeitverlauf keine Veränderungen zeigte. Die Anzahl/cm² an NAH (0,3-0,35) und BCF (0,5-1) blieb relativ konstant. Als statistisch signifikant wurde der Anstieg in der Anzahl der ECF/cm² von 0,1 nach 4 Wochen auf 0,3 nach 13 Wochen berechnet.

4.6.4.4 Zellzahl pro FAH-Querschnitt

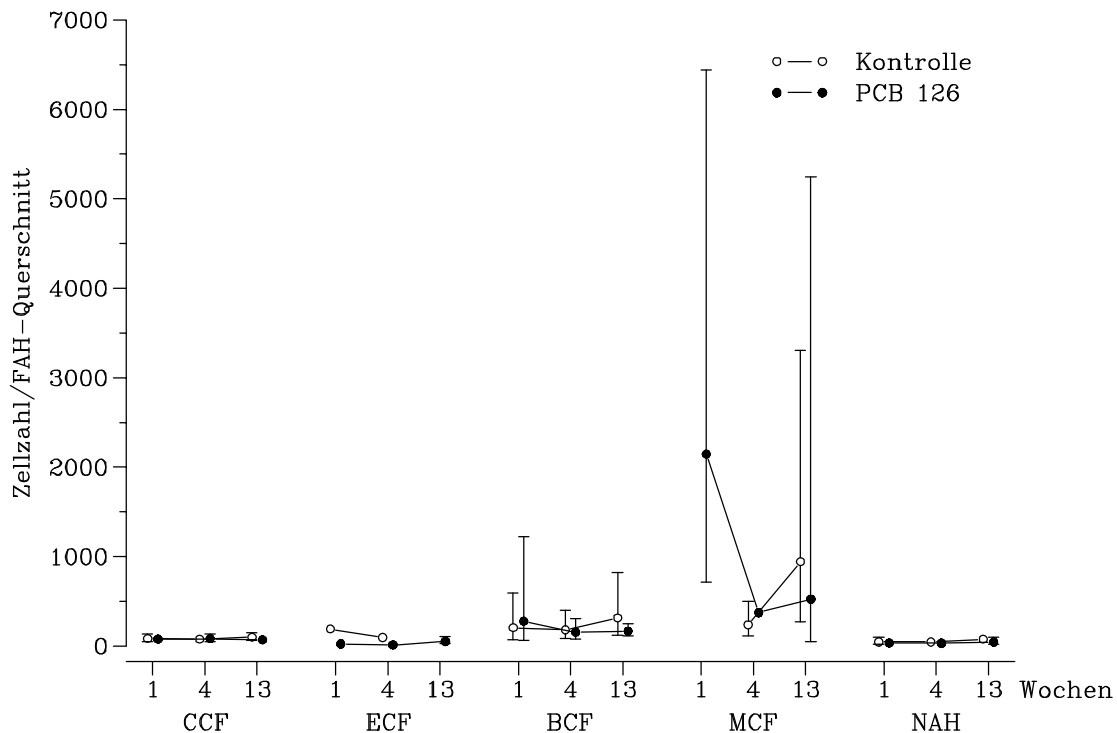


Abb. 30: Zellzahl der verschiedenen FAH-Typen pro FAH-Querschnitt (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) nach Verabreichung von PCB 126

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| CCF | | | a |
| ECF | | | |
| BCF | | | |
| MCF | | | |
| NAH | | | |

Tab. 30: Signifikanzen zur Abb. 30

a: signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,05$

Bis auf eine auf 70 % der Kontrollwerte verringerte durchschnittliche Zellzahl pro FAH-Querschnitt der CCF nach 13 Wochen bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen. Der niedrige Wert war bedingt durch die Anzahl der GST-P-positiven CCF (48 % des Kontrollwertes) (s. Tab. 53). Die durchschnittliche Zellzahl der ECF betrug 23, 13 und 51 Hepatozyten/FAH-Querschnitt nach 1, 4 und 13 Wochen. MCF traten nach 1 und 13 Wochen je bei 2 Tieren (2146 und 525 Hepatozyten/FAH-Querschnitt), nach 4 Wochen bei 1 Tier (374 Hepatozyten/FAH-Querschnitt) auf.

4.6.4.5 Zellproliferation und Apoptose innerhalb von FAH

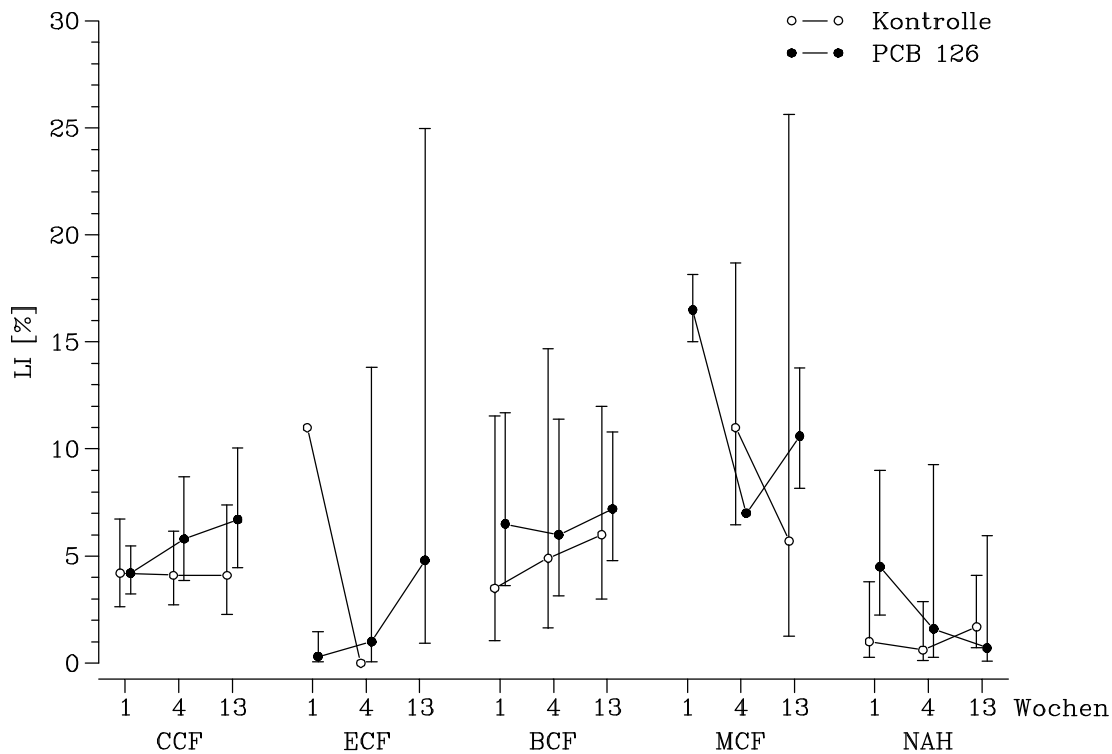


Abb. 31: Labelling-Indizes (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der verschiedenen FAH-Typen nach der Verabreichung von PCB 126

FAH = "focus of altered hepatocytes"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; BCF = "basophilic cell focus"; MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde

| Wochen | 1 | 4 | 13 |
|--------|---|---|----|
| CCF | g | | c |
| ECF | | | |
| BCF | | | |
| MCF | | | |
| NAH | | | |

Tab. 31: Signifikanzen zur Abb. 31

c: signifikante Unterschiede zu 1 Woche mit $p \leq 0,05$

g: signifikante Unterschiede zu 13 Wochen mit $p \leq 0,05$

Für keinen FAH-Typ konnten statistisch signifikante Unterschiede im Labelling-Index zu den Kontrollen nachgewiesen werden. Tendenziell zeigte aber der LI in CCF während der Verabreichung von PCB 126 einen Anstieg (4,2 %, 5,8 %, 6,7 %), so daß nach 13 Wochen 1,7-fache Kontrollwerte erreicht waren. Dieser Verlauf war sowohl bei GST-P-positiven als auch bei GST-P-negativen CCF nachzuvollziehen, wobei der LI in GST-P-negativen FAH geringfügig niedriger lag (s. Tab. 54). In NAH wurde eine Verminderung des LI beobachtet (4,5 %, 1,6 %, 0,7 %). Der LI in MCF belief sich nach 1 Woche auf 16,5 %, nach 4 Wochen auf 7 % und nach 13 Wochen auf 10,6 %. Ein stetiger Anstieg trat in ECF (0,3 %, 1,0 %, 4,8 %) auf.

Die Apoptose-Rate ließ keine statistisch signifikanten Abweichungen von den Kontrollen erkennen (s. Tab. 55).

4.6.5 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

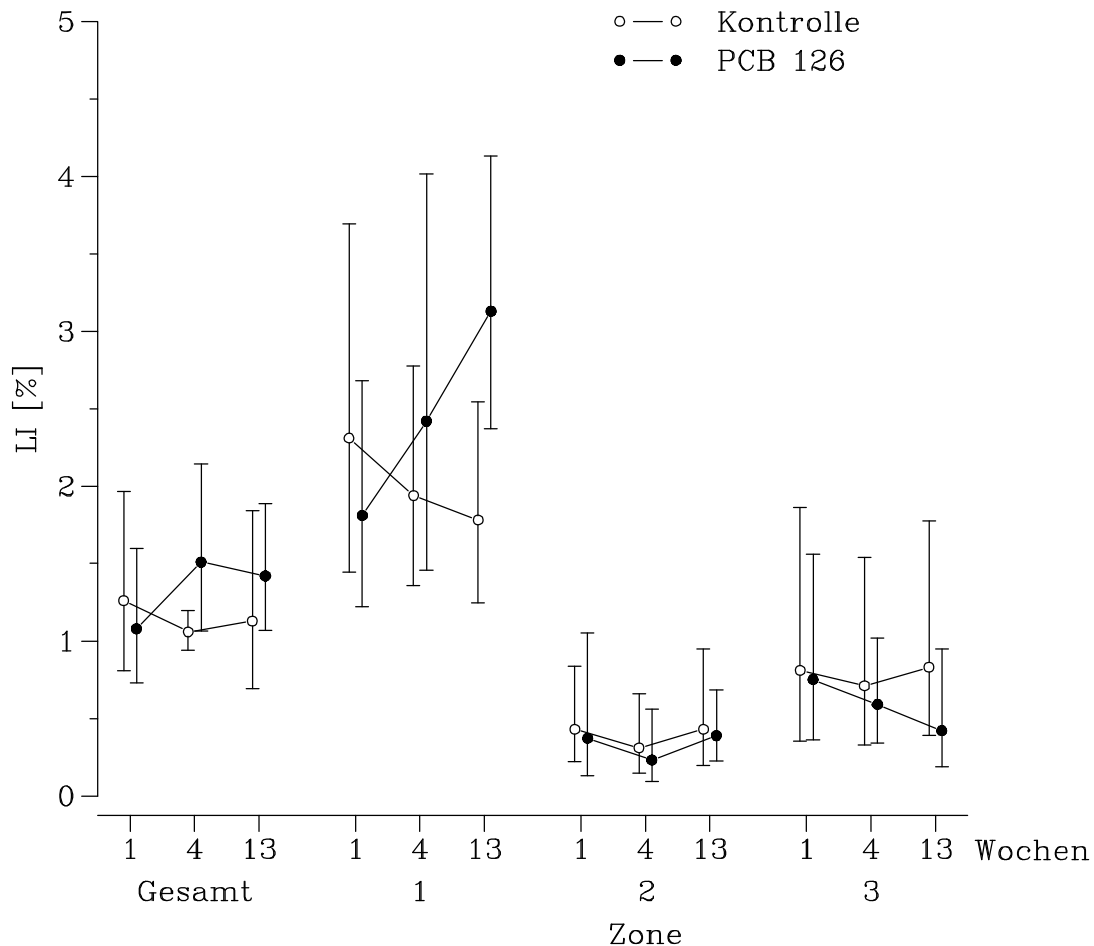


Abb. 32: Labelling-Indizes (%) (Mittelwerte und Streufaktoren) des extrafokalen Lebergewebes der 3 Zonen sowie Gesamt-LI nach Verabreichung von PCB 126

Sowohl der LI_{GES} als auch der LI der verschiedenen Zonen war zu keinem Zeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant verändert. Wie bei den Kontrollen war die Hauptproliferationszone Zone 1. Tendenziell konnte aber über die Zeit ein Anstieg des LI_{GES} (von 84 % auf 142 % und 126 % der Kontrollen) und des LI_{Z1} (von 78 % auf 176 % der Kontrollen) beobachtet werden.

5 DISKUSSION

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Versuchsmodell

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der promovierenden Wirkung fünf verschiedener bekannter Lebertumor-Promotoren im Kurzzeitversuch (1-, 4- und 13-wöchige Applikation) auf die Leber ca. 2 Jahre alter männlicher Wistar Ratten. Die verwendeten Substanzen stehen stellvertretend für fünf verschiedene Gruppen von Promotoren, deren karzinogene Wirkung auf verschiedenen Mechanismen beruht: 1. Phenobarbital, ein klassischer Enzyminduktor, 2. Chloroform, eine zytotoxisch wirkende Substanz, 3. Wyeth-14,643, ein Peroxisomenproliferator, 4. Ethinylestradiol, ein über einen zytosolischen Steroidrezeptor wirkendes Hormon und 5. PCB 126, einen Induktor des zytosolischen Arylhydrocarbon-Rezeptors. Die Substanzen wurden in Dosierungen und Applikationsformen verabreicht, die sich im Langzeitversuch als karzinogen erwiesen haben (Literaturzitate siehe bei den jeweiligen Substanzen in der Literaturübersicht).

In der biomedizinischen Forschung erfolgt üblicherweise die Prüfung einer potentiell promovierenden Wirkung einer chemischen Substanz in Initiations-Promotions-Studien, in denen im Anschluß an die Verabreichung eines Initiators die zu prüfende Substanz verabreicht wird. Als Endpunkt dieser Studien wird als Indikator der Promotionswirkung die Entstehung und das Wachstum von FAH („foci of altered hepatocytes“), die als präneoplastische Herde gelten (BANNASCH et al., 1989), genutzt. Es bestehen bezüglich der Promotionswirkung tierart-, tierstamm-, alters- und geschlechtsabhängige Unterschiede. Weiterhin ist die Entstehung von FAH vom Initiationsprotokoll (Art des Initiators, Dosierung und Applikationsdauer) abhängig. Um die Wirkung der Lebertumor-Promotoren unter „natürlichen Bedingungen“ auf spontan initiierte Hepatozyten ohne Beeinflussung des Ergebnisses durch einen Initiator zu untersuchen, wurde in dieser Studie ein Rattenstamm gewählt (Wistar Ratte, Chbb: THOM), der sich durch eine hohe Prävalenz spontan entstandener FAH in der Leber auszeichnet (BASF Datenbank). Die Tiere waren zu Versuchsbeginn im Alter von 18 bis 22 Monaten. Es wurden männliche Tiere verwendet, da bei weiblichen Tieren der Leberstoffwechsel eine stärkere hormonelle Beeinflussung als bei männlichen Tieren und zyklusabhängige Veränderungen zeigt (PALMER et al., 1979).

Die Untersuchungen wurden nach der Verabreichungsdauer von 1, 4 und 13 Wochen vorgenommen. Diese Zeitpunkte haben sich für Zellproliferationsmessungen als günstig erwiesen,

da so akute, subakute und chronische Effekte untersucht werden können (GOTTSCHLING, 1999).

5.1.2 Untersuchung der promovierenden Eigenschaften der Prüfsubstanzen

Um die promovierenden Eigenschaften der Prüfsubstanzen aufzudecken, wurde das Wachstumsverhalten der FAH und die Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe ermittelt.

5.1.2.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens der FAH

Es gilt als gesichert, daß FAH präneoplastische Läsionen darstellen, die in Größe und Prävalenz eine gute Korrelation zu später auftretenden Tumoren zeigen. (OGISO et al., 1985; ZERBAN et al., 1988; BANNASCH et al., 1989; ITO et al., 1989). Sie können daher als Endpunkt bei der Prüfung einer potentiell krebserregenden Wirkung einer Substanz zur Vorhersage genutzt werden (SCHULTE-HERMANN, 1985). FAH können aufgrund regulatorischer Defekte der Wachstumskontrolle auf die Verabreichung eines Promotors überproportional reagieren, wodurch die Nettowachstumsrate der FAH durch Induktion der Zellproliferation und/oder Inhibition der Apoptose erhöht wird. Weiterhin können Promotoren den FAH durch Hemmung der Zellproliferation im Umgebungsgewebe einen selektiven Wachstumsvorteil verleihen (SOLT und FARBER, 1976; BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1986; JIRTLE, 1991). Mehrere Autoren (BANNASCH, 1986; MOORE et al., 1982; ENZMANN und BANNASCH, 1987; WEBER und BANNASCH, 1994) vertreten die Ansicht, daß die verschiedenen FAH-Typen aufeinanderfolgende Stadien phänotypischer und metabolischer Veränderungen darstellen, die ein ansteigendes karzinogenes Potential innehaben. Die Abfolge erstreckt sich von den zuerst erscheinenden glykogenreichen CCF und ECF über MCF zu BCF.

5.1.2.1.1 Nachweis der FAH

Der Nachweis der FAH erfolgte in der HE-Färbung. In dieser Färbung werden die vom Umgebungsgewebe abweichende Zellmorphologie und tinktorielle Färbung der FAH meist deutlich. Da FAH sich durch eine veränderte Enzymexpression auszeichnen, wurde zusätzlich zur Identifizierung solcher FAH der immunhistochemische Nachweis von GST-P eingesetzt. Dieser positive FAH-Marker wurde gewählt, da dieses Enzym häufig von initiierten Zellen exprimiert wird und im Vergleich zu anderen Markern eine hohe Aufdeckungsquote zeigt (HENDRICH et al., 1987; TATEMATSU et al., 1988; XU et al., 1990). FAH wurden auch

dann als GST-P-positiv eingestuft, wenn nur ein Teil der Hepatozyten GST-P exprimierten. Der Anteil an GST-P-positiven FAH an der Gesamt-FAH-Anzahl betrug bei den 3 Kontrollgruppen der eigenen Untersuchung nur 22 % bis 28 % und lag damit deutlich unter dem von MITAKA und TSUKADA (1987) bei alten, unbehandelten männlichen F344/DuCrj gefundenen Anteil von 90 %. Während der Substanzapplikation über 1, 4 und 13 Wochen erhöhte sich der Anteil GST-P-exprimierender FAH auf maximal 44 % (Phenobarbital: 30 %, 44 %, 36 %; Wyeth-14,643: 10 %, 25 %, 35 %; Chloroform: 30 %, 15 %, 20 %; Ethinylestradiol: 27 %, 28 %, 12 %; PCB 126: 24 %, 37 %, 28 %).

5.1.2.1.2 Klassifizierung der FAH

Die FAH wurden in Anlehnung an die internationale Klassifikation (MOHR, 1997) in klarzellige FAH (CCF), eosinophile FAH (ECF), basophile FAH (BCF) und gemischtzellige FAH (MCF) eingeteilt. Kombinierte FAH, die sowohl aus klarzelligen als auch eosinophilen Hepatozyten zusammengesetzt waren, wurden dem FAH-Typ zugeordnet, dessen Anteil innerhalb des FAH überwog. Zusätzlich trat ein weiterer FAH-Typ auf, der GST-P exprimierten, sich im HE-Schnitt aber durch keinerlei Abweichung vom Umgebungsgewebe auszeichnete (NAH = nicht abgrenzbare Herde). In den Kontrollgruppen betrug der Anteil an NAH 4 % bis 8 %. Durch die Substanzapplikation wurde der Anteil nicht deutlich verändert (Phenobarbital: 10 %, 10 %, 3 %; Chloroform: 4 %, 7 %, 6 %; Wyeth-14,643: 6 %, 6 %, 10 %; Ethinylestradiol: 7 %, 6 %, 5 %; PCB 126: 3 %, 4 %, 3 %). ENZMANN et al. (1989) berichteten vom Auftreten solcher FAH, deren Bedeutung bisher aber noch nicht untersucht worden ist.

Die FAH, die nach Verabreichung der einzelnen Prüfsubstanzen auftraten, zeigten innerhalb eines FAH-Typs geringfügige Unterschiede in Zell- und Kernmorphologie. Auf eine weitere Subklassifikation wurde aber, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen und die Übersichtlichkeit zu wahren, verzichtet. Schwierigkeiten bereitete die weitere Unterteilung der BCF. Es trat eine Vielzahl unterschiedlicher FAH mit einer unterschiedlichen starken Basophilie des Zytoplasmas und unterschiedlicher Zellmorphologie auf. Letztendlich wurden alle FAH mit einer basophilen Färbung des Zytoplasmas den BCF zugeordnet.

5.1.2.1.3 Wahl der Meßparameter

Der Quantifizierung des Wachstumsverhaltens der FAH dienten als Meßparameter die Anzahl an FAH pro cm² Leberfläche, die Größe, die Zellproliferationsrate (LI %) und die Apoptose-Rate innerhalb von FAH. Weiterhin wurde die Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens untersucht, um potentielle Zielzonen der Substanzen zu ermitteln.

5.1.2.1.3.1 Größe der FAH

Die Größe von FAH wird üblicherweise in cm^2 , in cm^3 oder als Volumenanteil (Anteil der FAH am Lebervolumen) angegeben. Diese Maße lassen aber keinen Rückschluß darauf zu, ob eine Vergrößerung eines FAH auf einer Hypertrophie der Zellen oder einer tatsächlichen Erhöhung der Zellzahl beruht. Da ein Schwerpunkt dieser Studie in der Ermittlung des Zellproliferationsverhaltens in FAH lag, wurde als Maß für die Größe der FAH die Zellzahl pro FAH-Querschnitt gewählt.

5.1.2.1.3.2 Messung der Zellproliferation

Eine häufig gefundene Eigenschaft nicht-genotoxischer Karzinogene ist die Steigerung der Zellproliferationsrate (BUTTERWORTH, 1990; COHEN und ELLWEIN, 1990, 1991). Verschiedene Autoren konnten eine Korrelation zwischen Ausmaß und Dauer einer Zellproliferationssteigerung und dem karzinogenen Potential einer Substanz feststellen (MARSMAN et al., 1988; KLAUNIG et al., 1991).

5.1.2.1.3.3 Wahl des Proliferationsmarkers und dessen Applikation

Die Messung der Zellproliferation im histologischen Schnitt kann durch Zählung der mitotischen Figuren oder durch Nutzung verschiedener exogener (BrdU, [^3H]Thymidin) oder endogener Marker (z. B. Ki 67, PCNA) erfolgen. Da es sich bei der Leber um ein Gewebe mit einer sehr niedrigen basalen Zellteilungsrate handelt, ist es sinnvoll, kumulative Messungen durchzuführen, um Kontrollwerte von aussagekräftiger Höhe zu erhalten. Diese Möglichkeit besteht nur bei der Verwendung von exogenen Markern, da diese über längere Zeiträume appliziert werden können und so die markierten Kerne kumulieren. Die Wahl des Markers fiel auf das Thymidin-Analogon BrdU, das keine radioaktiven Eigenschaften besitzt und somit gegenüber [^3H]-Thymidin einen Vorteil bietet.

BrdU wird in der S-Phase der Zelle in die DNA eingebaut. Daraus ergibt sich der Nachteil, daß nicht die tatsächliche Teilung der Zelle nachgewiesen wird, sondern nur das Durchlaufen einer S-Phase.

GOLDWORTHY et al. (1991) forderten in ihrem Leitfaden zur Messung chemisch induzierter Zellproliferation, daß Methoden angewendet werden sollten, durch die aussagekräftig hohe Kontrolldaten ermittelt werden können. Bei sehr niedrig liegenden Kontrollwerten bestehe die Gefahr einer Überbewertung geringgradiger Proliferationsschwankungen, da bereits kleine Änderungen in der absoluten Anzahl positiv markierter Zellen einen vielfachen Anstieg oder Abfall bedeuten können. Der Vergleich verschiedener Applikationsarten- und dauern von

BrdU (GÖTTEL, 1997) hat gezeigt, daß für Gewebe mit niedrigen Zellproliferationsraten wie der Leber die Anwendung einer osmotischen Minipumpe, die 7 Tage vor der Tötung subkutan im Rückenbereich der Ratte implantiert wird, sinnvoll ist.

5.1.2.1.3.4 Apoptose

Verschiedene nicht-genotoxische Karzinogene sollen durch Hemmung der Apoptose von präkanzerösen und kanzerösen Zellen deren Überlebenszeit verlängern und ihnen damit einen Wachstumsvorteil vor unveränderten Zellen verleihen (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1990; ROBERTS et al., 1995). In dieser Studie sollte untersucht werden, inwieweit die fünf nicht-genotoxischen Karzinogene ihre Promotionswirkung über eine Inhibition des apoptotischen Prozesses in FAH ausüben.

Es existieren verschiedene Methoden zur Identifizierung der Apoptosen im histologischen Schnitt. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Studie (BLAZEY, 2001) wurden drei Methoden verglichen: 1) Bestimmung der Apoptoserate im HE-Schnitt; 2) TUNEL-Methode; 3) Eosinfluoreszenz. Die Eosinfluoreszenz wurde dabei in Abhängigkeit von der Fixationsmethode als nicht geeignet für Routinestudien eingestuft. Im Vergleich zu den beiden anderen Methoden wurden sehr viel geringere Apoptose-Indizes und eine höhere Anzahl an falsch-positiven Signalen ermittelt. Bei der TUNEL-Methode erwies sich die falsch-positive Markierung von nekrotischen Hepatozyten und die Markierung von Nicht-Hepatozyten (Kupffer-Zellen, Blutzellen) als nachteilig. Bei der Identifizierung der Apoptosen in der HE-Färbung wurden generell niedrigere Apoptose-Indizes bestimmt als bei Verwendung der TUNEL-Methode. Ursächlich dafür könnte die Schwierigkeit sein, sehr frühe Phasen und Endstadien der Apoptose anhand ihrer Morphologie zu erkennen. In der HE-Diagnostik konnten aber die gleichen biologischen Effekte (nur auf niedrigerem Niveau) wie mit der TUNEL-Methode dargestellt werden. Ein Vorteil der HE-Diagnostik gegenüber der TUNEL-Methode und der Eosinfluoreszenz bestand darin, daß durch die HE-Färbung kein Morphologie-Verlust erfolgte, der bei den beiden anderen Methoden die Identifizierung der falsch-positiven Signale anhand der Morphologie erschwerte.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Berücksichtigung der Faktoren Kosten und Arbeitsaufwand wurde in dieser Studie der Apoptose-Index in der HE-Färbung ermittelt.

Zur Beurteilung des Nettowachstums von FAH ist parallel zur Messung der Zellproliferation die Ermittlung der Apoptoserate innerhalb der FAH wichtig (GOLDWORTHY et al., 1993; SCHULTE-HERMANN et al., 1993). KONG und RINGER (1996) bestimmten eine Nettowachstumsrate aus mittels PCNA-Nachweis und TUNEL-Methode ermittelten Zellprolifera-

tions- und Apoptosedaten. Jedoch muß bei der Berechnung und Beurteilung einer Nettowachstumsrate berücksichtigt werden, daß in Abhängigkeit von der Methode bei der Bestimmung von Zellproliferations- und Apoptosedaten unterschiedlich große Zeitfenster erfaßt werden. Durch eine gleichwertige Gewichtung dieser Daten in einer Berechnung kann also nicht das reale Nettowachstum dargestellt werden. In der eigenen Studie wurden bei der Ermittlung des Labelling-Index und des Apoptose-Index sehr unterschiedlich große Zeitfenster erfaßt. Bei der Messung des Labelling-Index wurden die innerhalb einer Woche kumulierten markierten Zellkerne gezählt, während die Bestimmung des Apoptose-Index eine Momentaufnahme darstellte. Das in der HE-Färbung sichtbare Stadium der Apoptose in der Leber umfaßt ca. 2-3 Stunden (BURSCH et al., 1990). Für die Berechnung des Nettowachstums von FAH wäre daher die Verwendung von Zellproliferationsdaten, die ein ähnliches Zeitfenster einnehmen, sinnvoll. In Frage kommende Methoden sind die Bestimmung des Labelling-Index mittels 2-Stunden-Puls (BrdU) und des Labelling-Index von PCNA (nur S-Phasen-Nachweis). Der Labelling-Index von PCNA entspricht in der Leber nach ELDRIDGE und GOLDSWORTHY (1996) ungefähr dem mit 2-Stunden-Puls (BrdU) ermittelten Labelling-Index. Der Mitose-Index umfaßt eine Zeitspanne von ca. 1 Stunde (SCHRÖDER und DIENER, 2000). Der von KONG und RINGER (1996) verwendete „Staining-Index“ von PCNA umfaßt nicht nur die S-Phase, sondern auch die G1-, G2- und M-Phase des Zellzyklus (DIETRICH et al., 1994). Da die Phasen variable Zeitspannen einnehmen können (G1-Phase ca. 10 Stunden, S-Phase 6 bis 8 Stunden, G2-Phase 2 bis 6 Stunden (SCHRÖDER und DIENER, 2000)), ist eine genaue Eingrenzung des umfaßten Zeitfensters nicht möglich. Für unverändertes Lebergewebe bestimmten die Autoren einen „adjusted growth index“ (Verhältnis PCNA-Staining-Index/Apoptose-Index) von 8, in präneoplastischen Knötchen bei erhöhtem PCNA-Staining-Index als auch angestiegenen Apoptose-Index von 11. Präneoplastische Knötchen wiesen also eine gegenüber dem unveränderten Lebergewebe gesteigerte Nettowachstumsrate auf.

5.1.2.2 Messung der extrafokalen Zellproliferation

Zonale Auswertstrategie

In zahlreichen Studien erfolgte die Messung der Zellproliferation in der Leber in zufällig ausgewählten Bereichen ohne Berücksichtigung der zonalen Struktur des Leberläppchens (SCHULTE-HERMANN et al., 1982; ELDRIDGE et al., 1990; LARSON et al., 1995 a, 1995 b; KOLOJA et al., 1996 b). Innerhalb des Verlaufs von der Zentralvene bis zum Portalfeld innerhalb eines Leberläppchens bestehen aber zonale Unterschiede im Gehalt des Blutes an Sauerstoff, Substraten und Hormonen, und auch die Hepatozyten zeigen zonale Unterschiede

in der Anzahl und Größe der Zellorganellen, der enzymatischen Ausstattung und somit auch in der metabolischen Kapazität (RAPPAPORT, 1954; JUNGGERMANN und KATZ, 1989).

Diese zonalen Unterschiede spiegeln sich auch im Proliferationsverhalten der Hepatozyten wieder. Von einigen Substanzen ist bekannt, daß sie die Zellproliferation hauptsächlich in einer bestimmten Zone beeinflussen. So steigert z. B. Phenobarbital die Zellproliferation in Zone 3 (SCHULTE-HERMANN et al., 1986), Peroxisomenproliferatoren wie Wyeth-14,643 wirken dagegen hauptsächlich in Zone 1 (MARSMAN et al., 1988; EACHO et al., 1991). Es konnte demonstriert werden, daß verschiedene chemische Substanzen unterschiedliche Proliferationsmuster hervorrufen, die durch zonale Verteilung der Zellproliferation, Reaktionsstärke und Veränderungen der Zellproliferationsrate im Zeitverlauf charakterisiert sind (BAHNEMANN und MELLERT, 1997; BAHNEMANN, 2000).

Es bestehen verschiedene methodische Ansätze, durch die diese zonalen Unterschiede in der Zellproliferation quantifiziert werden sollen. CHEN et al. (1995) bestimmten die Entfernung der BrdU-markierten Kerne von der Zentralvene. In dieser Studie erfolgte jedoch keine Zuordnung, in welchem Abstand von der Zentralvene die Grenze zwischen den Zonen liegt. KOLAJA et al. (1996 a) definierten den Bereich von 5 Hepatozyten, LEE et al. (1993) von 7 Hepatozyten um die Zentralvene bzw. Portalvene herum als perivenös bzw. periportal. Hepatozyten, die mehr als 5 Hepatozyten von der Zentral- oder Portalvene entfernt lagen, wurden von KOLAJA et al. (1996 a) als midzonal gelegen bezeichnet. Andere Autoren (SCHULTE-HERMANN et al., 1986; MARSMAN et al., 1988; EACHO et al., 1991; MAYOL et al., 1992; WADA et al., 1992) vollzogen keine genauere Eingrenzung der 3 Zonen und orientierten sich an der anatomischen Nähe zur Zentralvene oder zum Portalfeld.

Von BAHNEMANN und MELLERT (1997) wurde die auch in dieser Studie verwendete LZM („lobule-dependent zonal measurement“-)Methode entwickelt. Dabei wird der Bereich zwischen der Zentralvene und einem Portalfeld eines Leberläppchens in drei gleich große, ca. 100 Hepatozyten umfassende Abschnitte unterteilt, die die drei Zonen repräsentieren. Um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wird innerhalb einer Leber die Zellproliferationsrate in 10 Leberläppchen ermittelt. Daraus ergibt sich pro Tier eine Gesamtzahl von ca. 3000 gemessenen Hepatozyten (10 Leberläppchen à 3 Zonen à 100 Zellen).

Im Vergleich der LZM-Methode mit der Messung der Zellproliferation in zufällig ausgewählten Feldern hat sich die LZM-Methode als sensitiver erwiesen (BAHNEMANN, 2000). Bei einer zufälligen Auswahl der Meßfelder besteht die Gefahr, daß bei Vorliegen eines zonalen Proliferationsmusters die Messungen zufällig vermehrt in Bereichen erhöhter oder erniedrig-

ter Proliferation durchgeführt werden und somit das Ergebnis verfälscht wird. Weiterhin können zonale Effekte bei der alleinigen Betrachtung des Gesamtwertes unentdeckt bleiben.

5.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben

Bei dem Vergleich der Resultate der hier dokumentierten Analyse mit anderen Studien ist zunächst zu berücksichtigen, daß die Ergebnisse von zahlreichen Faktoren wie Rattenstamm, Alter und Geschlecht der Versuchstiere sowie Dosierung, Applikationsart und -dauer der Prüfsubstanzen abhängen. Bei der Ermittlung von Zellproliferationsdaten machen weitere Variablen (Wahl und Applikation des Markers, Auswertstrategien) den direkten Vergleich häufig unmöglich. Ebenso ist der Vergleich von FAH-Daten aufgrund der Wahl unterschiedlicher FAH-Marker und Meßparameter schwierig.

5.2.1 Kontrolltiere

5.2.1.1 FAH

Prozentuale Verteilung der FAH-Typen

Über den prozentualen Anteil der verschiedenen FAH-Typen an der Gesamtzahl aller FAH bei alten Ratten bestehen in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben.

In Studien von WARD (1981; männliche und weibliche F344 Ratten), POPP et al. (1985; CDF (F344)/CrIBR Ratten) und SCHULTE-HERMANN et al. (1983 a; weibliche Han-Wistar Ratten) waren basophile FAH der am häufigsten gefundene FAH-Typ. Es scheinen geschlechtsabhängige Unterschiede im Auftreten der verschiedenen FAH-Typen zu bestehen. Bei Untersuchungen im Rahmen des National Toxicology Program (HARADA et al., 1989) dominierten bei weiblichen Tieren die basophilen FAH, bei männlichen Tieren war zusätzlich ein großer Anteil der FAH klarzellig. MITAKA und TSUKADA (1987) fanden ebenfalls ein Überwiegen basophiler FAH bei weiblichen Ratten (F344/DuCrj), während bei männlichen Tieren klarzellige und klarzell/eosinophil-gemischte FAH am häufigsten vorlagen. In einer Studie von KRAUPP-GRASL et al. (1991; männliche Wistar Ratten) war der Anteil klarzelliger und eosinophiler FAH am höchsten, bei WEBER und BANNASCH (1994; Sprague-Dawley) waren klarzellige und klarzellig/eosinophil-gemischte FAH am stärksten vertreten.

In den in der vorliegenden Studie untersuchten männlichen Tieren eines Wistar Rattenstammes betrug der Anteil von CCF an der Gesamtanzahl der FAH 84,5 % bis 89 %. BCF und NAH lagen nur in geringen Anteilen vor (4 % bis 8 %), ECF und MCF wurden nur vereinzelt klassifiziert.

Prävalenz, Anzahl pro cm² Leberfläche und Größe der FAH

Die in der Literatur beschriebenen FAH-Prävalenzen liegen bei 24 Monate alten Ratten bei 100 % (HARADA et al., 1989: männliche und weibliche F344 Ratten; SCHULTE-HERMANN et al., 1983 a: weibliche Wistar Ratten). Bei Ratten, die im Alter den Ratten der vorliegenden Studie vergleichbar waren, wurde eine Gesamtzahl an FAH pro cm² Leberfläche von 13,9 und 15,7 (HARADA et al., 1989: männliche und weibliche F344 Ratte, 24 Monate) und 8,33 (WEBER und BANNASCH, 1994: männliche Sprague-Dawley Ratten, 18 Monate) bestimmt. Die in der eigenen Studie gefundene FAH-Prävalenz bei 19-24 Monate alten männlichen Wistar Ratten entsprach mit 100 % den in der Literatur für F344 und weibliche Wistar Ratten angegebenen Werten. Die ermittelte Anzahl/cm² lag mit 10,7-13,4 ebenfalls im Bereich der bei F344 und Sprague-Dawley Ratten beschriebenen Werte. Die Zellzahl/FAH-Querschnitt der CCF lag zu den drei Untersuchungszeitpunkten zwischen 77 und 99 Zellen. BCF wiesen durchschnittlich höhere, NAH niedrigere Zellzahlen auf. GST-P-positive und -negative FAH zeigten gleiche Größenordnungen. Innerhalb eines FAH-Typs bestanden zwischen den drei Untersuchungsterminen Differenzen in der Zellzahl/FAH-Querschnitt, die aber aufgrund hoher Streufaktoren nicht von statistischer Signifikanz waren.

Die Tatsache, daß trotz einer hohen Anzahl an CCF keine hepatozellulären Adenome und Karzinome gefunden wurden, läßt auf das geringe karzinogene Potential der CCF schließen. Damit läßt sich die Hypothese einer „progressiven phänotypischen Instabilität“ nachvollziehen. Nach dieser Hypothese wandeln sich die zuerst erscheinenden glycogenreichen CCF und ECF über MCF zu BCF, die wiederum Vorläufer hepatozellulärer Karzinome darstellen (BANNASCH, 1986; MOORE et al., 1982; ENZMANN und BANNASCH, 1987; WEBER und BANNASCH, 1994).

GST-P-Expression

Der Anteil von GST-P-positiven FAH an der Gesamtzahl der spontan entstandenen FAH betrug in einer Studie an alten F344/DuCrj von MITAKA und TSUKADA (1987) bei männlichen Ratten mehr als 90 %, bei weiblichen weniger als 20 %. BCF scheinen nur zu geringen Anteilen (5,7 %) eine GST-P-Expression zu zeigen (WARD und HENNEMANN, 1990).

In unserer Studie wiesen nur 22 % bis 28 % aller bei den Kontrolltieren gefundenen FAH eine GST-P-Expression auf, obwohl es sich um männliche Tiere handelte. 18 % bis 23 % der CCF und 11 % bis 19 % der BCF exprimierten GST-P. Der Anteil GST-P-positiver BCF lag zu jedem Untersuchungszeitpunkt unter dem GST-P-positiver CCF.

Diese Ergebnisse zeigen, daß GST-P als allein verwendeter Marker nicht geeignet ist, die spontan bei alten Wistar Ratten entstandenen FAH aufzudecken.

Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

Vergleiche mit absoluten Werten aus der Literatur fallen aufgrund der Anwendung unterschiedlicher Verfahren schwer. WARD und OHSHIMA (1985) z. B. bestimmten bei alten F344/NCr Kontroll-Ratten mittels 1-Stunden-Puls-Labeling ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) in basophilen FAH einen LI von ca. 0,3 % bis 0,4 %, der über dem der unveränderten Hepatozyten (ca. 0,1 % bis 0,3 %) lag. SCHULTE-HERMANN et al. (1983 a) ermittelten in spontan entstandenen FAH gegenüber dem Umgebungsgewebe 5- bis 10-fach erhöhte DNA-Syntheseraten, wobei die verschiedenen FAH-Typen keine signifikanten Unterschiede zeigten. Die eigenen Untersuchungen erbrachten zu den drei Zeitpunkten einen durchschnittlichen Labelling-Index von 4,1 % bis 4,2 % in CCF. Der LI der BCF lag in ähnlichen Bereichen, zeigte aber eine höhere Variabilität sowohl zu einem Zeitpunkt als auch zwischen den 3 Zeitpunkten (3,5 % bis 6 %). NAH wiesen einen niedrigeren LI auf (0,6 % bis 1,9 %). Der Vergleich GST-P-positiver und -negativer FAH ließ einen geringfügig niedrigeren LI der GST-P-positiven CCF erkennen.

Die Zellproliferation spielt im Stadium der Progression im Mehrstufenkonzept der Karzinogenese eine bedeutende Rolle, da durch sie die Wahrscheinlichkeit weiterer Spontanmutationen erhöht wird. Es ist daher einleuchtend, daß FAH mit höheren LI auch ein höheres Potential zur malignen Transformation besitzen. Nach der Hypothese der „progressiven phänotypischen Instabilität“ (BANNASCH, 1986; MOORE et al., 1982; ENZMANN und BANNASCH, 1987; WEBER und BANNASCH, 1994) besitzen basophile FAH das größte Potential zur malignen Transformation. Bei Betrachtung der Durchschnittswerte zeigten die BCF im Durchschnitt keinen deutlichen höheren LI als CCF. Die Auswertung der Einzeltierwerte (Tab. 34) und der LI der einzelnen FAH erbrachte aber, daß die absolut höchsten ermittelten Werte in BCF vorlagen. Es kann daher durchaus nachvollzogen werden, daß bestimmte Subpopulationen der BCF die größte Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation aufweisen. Entsprechend dieser Annahme bestände in spontan entstandenen NAH das geringste Risiko einer Tumorentstehung.

Bei verschiedenen Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von FAH fiel auf, daß spontan entstandene FAH trotz über das Umgebungsgewebe erhöhten Zellproliferationsraten ein nur geringes Nettowachstum zeigten. Der Grund dafür soll in einem höheren Apoptose-Index in FAH gegenüber dem unveränderten Lebergewebe liegen (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1993; KOLAJA et al., 1996 b). Die in FAH von BURSCH et al. (1984) ermittelten Werte von 1,2 % und 0,7 % wurden aber nach Initiation bzw. Initiation und Promotion ermittelt, womit ein Vergleich mit den eigenen Ergebnissen nur bedingt möglich ist. Im unveränderten Lebergewebe wurde von Apoptose-Indizes von 0,013 % bis 0,7 % berichtet

(MARSMAN et al., 1992; MAYOL et al., 1992; ZERBAN et al., 1994; ROBERTS et al., 1995; STINCHCOMBE et al., 1995; BLAZEY, 2001). Die weite Spanne der Werte gibt Aufschluß darüber, wie stark die Ergebnisse von Rattenstamm, Alter, Geschlecht, Versuchsprotokoll und Auswertstrategien beeinflusst werden können.

Die CCF der Kontrolltiere der eigenen Studie wiesen einen Apoptose-Index von 0,011 % bis 0,023 % auf, der Apoptose-Index in BCF lag geringfügig niedriger. Der AI in NAH lag zu allen 3 Zeitpunkten bei 0 % . Spontan entstandene NAH scheinen somit – in Verbindung mit dem geringen LI – einen geringen Zellumsatz aufzuweisen. Eine sichere Aussage über das Apoptoseverhalten der ECF und der MCF kann aufgrund der nur sehr geringen Anzahl nicht getroffen werden (je 1 ECF nach 1 und 4 Wochen: AI 0 %; 8 MCF nach 4 Wochen, 5 MCF nach 13 Wochen: AI 0 % und 0,014 %). Der Apoptose-Index des extrafokalen Lebergewebes wurde in der eigenen Studie nicht erhoben, so daß nicht beurteilt werden konnte, ob auch in der eigenen Studie FAH einen höheren AI aufweisen als das extrafokalen Lebergewebe. Die von BLAZEY (2001) bei Ratten des gleichen Rattenstammes, der auch in der eigenen Untersuchung verwendet wurde, mittels HE-Diagnostik in unverändertem Lebergewebe ermittelten Apoptose-Indizes zwischen 0,044 % und 0,088 % lagen höher als die AI der FAH der eigenen Studie. Diese Werte wurden aber an jungen Ratten ermittelt (9 bis 26 Wochen), so daß der direkte Vergleich der Werte wenig sinnvoll ist.

Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

Der Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben wird durch Unterschiede in der Zonendefinition erschwert. Nach der Zonenfestlegung nach RAPPAPORT (1954) umgibt Zone 1 die interlobuläre Grenzfläche des Leberazinus spindelförmig. Daran schließt sich schalenförmig Zone 2 an. Zone 3 wird, der Zentralvene anliegend, von dem restlichen Leberparenchym des Azinus gebildet. Sowohl Zone 2 als auch Zone 3 erstrecken sich in Randgebieten bis zum Portalfeld. Eine genau definierte Zonenbegrenzung existiert nicht. In der eigenen Studie erfolgte die Zonenfestlegung nicht innerhalb des Azinus, sondern nach der LZM-Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) innerhalb des Leberläppchens. Auf der Strecke Portalfeld-Zentralvene wurden drei gleich große, ca. 100 Zellen umfassende Felder gebildet, wobei das periportale Feld als Zone 1, das zentrolobuläre Feld als Zone 3 und der dazwischenliegende Bereich als Zone 2 definiert wurde. Bei FAH, die sich nicht auf der Strecke Portalfeld-Zentralvene befanden, diente die Nähe zum Portalfeld bzw. Zentralvene Bewertungsgrundlage. Folge der verschiedenen Zonendefinitionen sind Überschneidungen der Zonen. Zone 1 der LZM-Methode beinhaltet Zone 1 und 2 sowie geringe Anteile der Rappa-

portschen Zone 3. Die Zone 2 der LZM-Methode beinhaltet zusätzlich Anteile der Zone 3 nach Rappaport.

HARADA et al. (1989) fanden in alten F344 Ratten die FAH zufällig über den Azinus verteilt. Davon abweichend bestimmten WARD (1981) sowie WARD und HENNEMANN (1990) ohne Angabe der Zonendefinition bei alten weiblichen F344 bzw. weiblichen und männlichen F344/NCr Ratten Zone 1 des Leberazinus als Hauptlokalisationszone. In der Studie von WARD und OHSHIMA (1985) mit alten weiblichen F 344/NCr Ratten basierte die Bestimmung der Lokalisation auf der anatomischen Nähe zur Zentralvene bzw. Portalfeld. In dieser Untersuchung lagen 100 % der GGT-positiven FAH und 54,6 % der BCF in Zone 1 (16,4 % in Zone 2, 29 % in Zone 3).

In der eigenen Studie wurde der Hauptanteil der FAH Zone 2 zugeordnet. Ursache für die Abweichung des Ergebnisses von o. g. Untersuchungen kann in der Verwendung eines anderen Rattenstammes begründet sein. Weiterhin muß aber auch in Betracht gezogen werden, daß, als Folge der Methodik (Einordnung der FAH, die weder in der Nähe eines Portalfeldes noch in der Nähe einer Zentralvene lagen in Zone 2), FAH, deren tatsächliche Zuordnung zu Zone 1 oder 3 aufgrund eines fehlenden Gefäßanschnittes nicht erfolgen konnte, falsch Zone 2 zugeordnet wurden. Zwischen den drei Kontrollgruppen bestanden deutliche Unterschiede. Der Anteil in Zone 2 differierte zwischen 43 % nach 1 Woche und 29 % nach 13 Wochen. In Zone 1 und 3 lagen nach 1 und 13 Wochen Werte in ähnlichen Größenordnungen vor (18 % bis 23 %), nach 4 Wochen dagegen waren in Zone 3 deutlich weniger FAH lokalisiert. Unter der Annahme, daß die sich aus der Methodik ergebenden Ungenauigkeiten in der zonalen Zuordnung in allen 3 Kontrollgruppen von gleichem Ausmaß war, kann aus diesen Resultaten geschlossen werden, daß bei diesem Wistar Rattenstamm die FAH mehr oder weniger zufällig im Leberläppchen verteilt mit Häufung in Zone 2 entstehen. Der Anteil der FAH, die aufgrund ihrer Größe nicht nur einer Zone zugeordnet werden konnte, betrug zwischen 16 % nach 1 Woche und 27 % nach 13 Wochen. Der zonale Ursprung dieser FAH konnte nicht mehr bestimmt werden.

Die Verteilung aller FAH wurde im wesentlichen durch die CCF bestimmt, die den größten prozentualen Anteil ausmachten. NAH wurden nach 1 und 13 Wochen überwiegend Zone 2 zugeordnet (70 % und 61 %), nach 4 Wochen fanden sie sich zu 40 % in Zone 2 und zu 47 % in Zone 3. Der Anteil der NAH in Zone 1 lag mit 0 % bis 3 % merklich niedriger als in den anderen Zonen. Für BCF konnte keine Hauptlokalisationszone bestimmt werden. Der hohe Anteil (32 % und 46 %) an BCF, die nach 4 und 13 Wochen den Zone 1/2/3 zugeordnet wurden, war u. a. durch das Auftreten der großen BCF-NOS bedingt. Anders als bei WARD und

HENNEMANN (1990), die von einem 75 %igen Anteil spontan entstandener GST-P-positiver FAH (ab 3 Hepatozyten) bei alten weiblichen F344/NCr Ratten in periportalen Bereichen berichteten, lag in der eigenen Untersuchung der deutlich geringste Anteil der GST-P-positiven FAH (4 % bis 8 %) in Zone 1. Grund für diese Differenz könnte in die Verwendung von Tieren eines anderen Rattenstammes und eines anderen Geschlechts liegen.

5.2.1.2 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

Die in der Literatur angegebenen Labelling-Indizes im unveränderten Lebergewebe unbehandelter Ratten liegen zwischen 0,3 % und 14,9 %. Die Unterschiede begründen sich durch den verwendeten Rattenstamm, Alter und Geschlecht der Tiere sowie das Labelling-Protokoll. Die Höhe des mittels 7-Tage-Pumpe (BrdU) ermittelten Wertes von 14,9 % (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) resultierte aus dem Alter der Tiere von 7 Wochen. In diesem Alter kann in der Leber aufgrund von Wachstumsvorgängen eine hohe Zellproliferationsrate beobachtet werden. Studien mit dem in dieser Studie angewendeten Labelling-Protokoll (7-d-Pumpe BrdU) erbrachten Labelling-Indizes von ca. 4 % (YAGER et al., 1994: weibliche Lewis Ratten, 19 Wochen alt), 2,2 % (GÖTTEL, 1997: männliche Wistar Ratten, ca. 18 Wochen alt) und 1,31 % (BAHNEMANN und MELLERT, 1997: männliche Wistar Ratten, 19 Wochen alt). CATTLEY et al. (1991) bestimmten bei Ratten, die im Alter ungefähr den hier untersuchten Ratten entsprachen (männliche F344 Ratten, 20 Monate alt) mittels 6-d-Pumpe ($^3\text{[H]}$ -Thymidin) einen LI von 1,95 %. Die in der eigenen Studie zu den 3 Untersuchungszeitpunkten ermittelten Kontrollwerte (1,06 % bis 1,26 %) lagen im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte bzw. gering darunter. Die niedrigeren Werte lassen sich durch das höhere Alter der Tiere erklären.

Die zonale Auswertung des Proliferationsverhaltens bei adulten männlichen Wistar Ratten hat Zone 1 als Hauptproliferationszone identifiziert. Differenzen bestehen aber in der Höhe des LI in Zone 2 und 3. BAHNEMANN und MELLERT (1997) beobachteten ein Abfallen der Zellproliferation von Zone 1 zu Zone 3 (2,58 %, 0,82 %, 0,55 % in Zone 1, 2 und 3), während GÖTTEL (1997) den niedrigsten LI in Zone 2 nachwies (2,75 %, 1,65 %, 2,28 %). Bei den eigenen Messungen erwies sich ebenfalls die Zone 1 als Hauptproliferationszone (2,31 %, 1,94 % und 1,78 % nach 1, 4 und 13 Wochen). Der Studie von GÖTTEL (1997) entsprechend lag der niedrigste LI in Zone 2, allerdings auf deutlich niedrigerem Niveau (0,43 %, 0,31 %, 0,43 %).

5.2.1.3 Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten

Einigkeit herrscht in der Literatur darüber, daß FAH, ob spontan entstanden oder chemisch induziert, eine gegenüber dem Umgebungsgewebe erhöhte DNA-Syntheserate bzw. Zellteilungsrate aufweisen (SCHULTE-HERMANN et al., 1982, 1983 a; MARSMAN und POPP, 1994). In Untersuchungen von SCHULTE-HERMANN et al. (1983 a) lag die DNA-Syntheserate in FAH zwei Jahre alter unbehandelter Ratten fünf bis zehn mal höher als in unveränderten Hepatozyten. In Übereinstimmung dazu wiesen die CCF und BCF der Kontrolltiere der eigenen Studie zu jedem Untersuchungstermin einen höheren LI auf als das extrafokale Lebergewebe. Dabei war der LI_{CCF} 3,3- bis 3,9-fach, der LI_{BCF} 2,8- bis 5,3-fach größer als der LI_{GES} . Der LI_{NAH} lag nach 1 und 4 Wochen unter dem LI_{GES} (0,8- und 0,56-fach), nach 13 Wochen 1,7-fach darüber.

Korrelation zwischen Labelling-Index und FAH-Größe

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von SCHULTE-HERMANN et al. (1983 a, 1990) und TSUDA et al. (1992) bestand nur eine sehr geringe Korrelation (Korrelationskoeffizient 0,12 bis 0,23) zwischen der Größe der FAH und der Höhe des Labelling-Index der FAH. Ausgehend von der Annahme, daß FAH mit erhöhtem LI ein höheres Potential zur malignen Entartung besitzen, konnte aufgrund der eigenen Ergebnisse deshalb nur ein geringer Zusammenhang zwischen der Größe der FAH und ihrem Potential zur malignen Transformation postuliert werden.

Zwischen den drei Kontrollgruppen traten bei verschiedenen Parametern trotz randomisierter Gruppeneinteilung Differenzen auf. Die Unterschiede in Anzahl an FAH pro cm^2 Leberfläche und Zellzahl/FAH-Querschnitt waren aufgrund der hohen biologischen Variabilität und den daraus resultierenden hohen Streufaktoren jedoch nicht von statistischer Signifikanz. Weiterhin zeigten sich bei den Parametern „prozentuale Verteilung der FAH-Typen“ und „Lokalisation innerhalb des Leberläppchens“ sowie in der Verteilung der FAH auf Größenklassen Abweichungen zwischen den drei Zeitpunkten. Der größte Anteil der FAH befand sich zwar in allen drei Gruppen in Zone 2, die Anteile in den Zonen differierten aber sowohl bei Betrachtung der Gesamt-FAH-Anzahl als auch innerhalb eines FAH-Typs. Erschwert wurde die Bewertung durch den hohen und über die Zeit schwankenden Anteil an FAH, die aufgrund ihrer Größe mehr als einer Zone zugeordnet wurden. Die Beurteilung eines Substanzeffektes wurde dadurch wesentlich verkompliziert.

5.3 Phenobarbital

Phenobarbital ist eine nicht-genotoxische Substanz (ANDERSON und STYLES, 1978; BRADLEY, 1985), die sich sowohl nach Langzeitverabreichung (ROSSI et al., 1977; WARD, 1983) als auch in Initiations-Promotions-Studien in der Nagerleber als karzinogen erwiesen hat (PERAINO et al., 1973, 1977; ITO et al., 1984).

5.3.1 Allgemeine Wirkung von Phenobarbital auf die Leber

In der Literatur werden nach der Verabreichung von Phenobarbital Erhöhungen des relativen Lebergewichts bis zu 30 % beschrieben (SCHULTE-HERMANN et al., 1990; JONES et al., 1993; GARCIA-ALLEN et al., 1997), die aus einer Hypertrophie und einer Hyperplasie der Hepatozyten resultierten (CARTHEW et al., 1998). Die Hypertrophie ist Folge einer Induktion spezifischer fremdstoffmetabolisierender Enzyme (Cytochrome CYP 2B1/2, CYP 3A1) sowie einer Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (CHEN et al., 1992) und befindet sich in Zone 3 (CARTHEW et al., 1998).

Diese Beobachtungen bestätigten sich in der eigenen Studie. Die Erhöhung des relativen Lebergewichts lag nach 1- und 13-wöchiger Applikation bei ca. 20 %. Nach 4 Wochen war das relative Lebergewicht um 4 % - allerdings statistisch nicht signifikant - erhöht. Die Hepatozyten in Zone 3 wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten eine ausgeprägte Hypertrophie auf.

5.3.2 FAH

Eine hohe Anzahl an Untersuchungen beschäftigte sich mit der Wirkung von Phenobarbital auf Rattenlebern. Eine entsprechende Vielzahl abweichender Versuchsprotokolle erbrachte sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Großzahl der Initiations-Promotions-Studien berichtete von einer Promotion von FAH, d. h. Erhöhung der FAH-Anzahl (PITOT et al., 1987; SCHULTE-HERMANN et al., 1982, 1990; HASEGAWA et al., 1991; CHEN et al., 1992; KOLAJA et al., 1996 b) und einer Vergrößerung der FAH (GOLDSWORTHY et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1990; CHEN et al., 1992). MOORE et al. (1983 b) dagegen fanden keinen signifikanten Unterschied in der FAH-Anzahl, DRAGAN et al. (1996) ermittelten keine Differenzen im Volumenanteil der FAH zwischen den nur initiierten und den zusätzlich promovierten Tieren.

Die eigene Untersuchung erbrachte zu keinem Zeitpunkt eine Erhöhung der FAH-Anzahl/cm² infolge der Phenobarbital-Verabreichung. Es zeigte sich im Gegenteil eine Verminderung

gegenüber den Kontrollwerten (auf 80 %, 53 % und 70 % nach 1, 4 und 13 Wochen), die aber nicht von statistischer Signifikanz war. Ein ähnliches Ergebnis erhielten KRAUPP-GRASL et al. (1991). Nach einer 13-monatigen Verabreichung (50 mg/kg Körpergewicht) an 57 Wochen alte männliche Wistar Ratten war die Anzahl der zu einer Gruppe zusammengefaßten CCF/ECF sowie der tigroiden FAH pro cm² Leberfläche - allerdings auch nicht statistisch signifikant - niedriger als bei den Kontrolltieren. Auch HASEGAWA et al. (1994) konnten nach 52-wöchiger Exposition 5 Wochen alter, männlicher Fischer Ratten (500 ppm im Futter) keinen zahlenmäßigen Anstieg ausmachen. XU et al. (1990) stellten in einem Protokoll mit partieller Hepatektomie, Initiation und 6-monatiger Phenobarbital-Behandlung (500 ppm im Futter) eine geringere Promotorwirkung von Phenobarbital bei alten männlichen F344 Ratten im Vergleich zu jüngeren Tieren fest. Bei Versuchsbeginn 12 Monate alte Ratten zeigten eine signifikant niedrigere FAH-Anzahl pro Leber und einen geringeren Volumenanteil als Ratten, die bei Versuchsbeginn 6 Monate alt waren.

Eosinophile FAH scheinen die durch Phenobarbital bevorzugt promovierten FAH zu sein. In einer Initiations-Promotions-Studie von SCHULTE-HERMANN et al. (1990) an jungen Wistar Ratten führte die Verabreichung von Phenobarbital nach 2 Wochen zur Entstehung von eosinophilen und klarzellig-eosinophil-gemischtzelligen FAH. Ab der 10. Behandlungswoche dominierten eosinophil-basophil-gemischtzellige FAH. KOLAJA et al. (1996 b) konnten bei jungen F344 Ratten nur für eosinophile FAH statistisch signifikante Unterschiede im Volumenanteil zwischen mit Phenobarbital behandelten Tieren und nur initiierten Tieren nachweisen. Ebenso führte die alleinige Applikation von Phenobarbital an alte F344/NCr Ratten (150 bis 189 Tage) zur Promotion (Steigerung in Prävalenz, Größe und Anzahl) eosinophiler, nicht aber basophiler FAH (WARD, 1983; WARD und OHSHIMA, 1985; WARD und HENNEMANN, 1990).

In der vorliegenden Untersuchung machten CCF - wie bei den Kontrolltieren - den höchsten prozentualen Anteil aus. Der prozentuale Anteil der CCF lag jedoch niedriger als bei den Kontrollen und verringerte sich im Laufe der Applikation. Die Promotion der ECF wurde in einer Zunahme des Anteils der ECF während der Applikation deutlich (9 %, 19 % und 27 % nach 1, 4 und 13 Wochen). Gleichzeitig stieg der Anteil an FAH, die sowohl klarzellige als auch eosinophile Hepatozyten beinhalteten. Diese Entwicklung läßt sich auch bei der Anzahl der FAH nachvollziehen. Die Anzahl an CCF/cm² Leberfläche war zu allen drei Zeitpunkten (nach 4 Wochen statistisch signifikant) gegenüber den Kontrollen verringert. Die Anzahl der ECF dagegen zeigte - im wesentlichen durch GST-P-positive ECF bedingt - einen stetigen Anstieg. Die durchschnittliche Größe der FAH (durchschnittliche Zellzahl/FAH-Querschnitt)

wurde bei keinem FAH-Typ signifikant durch die Phenobarbital-Verabreichung beeinflusst. Auch KRAUPP-GRASL et al. (1991) berichteten von einer gleichbleibenden Fläche der zu einer Gruppe zusammengefaßten CCF/ECF nach 13-monatiger Verabreichung von Phenobarbital an alte Wistar Ratten. Die Fläche der tigroiden FAH zeigte sich sogar signifikant vermindert. In Betracht zu ziehen ist aber auch, daß die Dauer der Exposition in der eigenen Studie für eine signifikante Vergrößerung der FAH eventuell nicht ausreichte. Eine Vergrößerungstendenz war bei basophilen FAH erkennbar (107, 146 und 180 Hepatozyten/FAH-Querschnitt nach 1, 4 und 13 Wochen). ITO et al. (1984) konnten erstmals nach 52-wöchiger Exposition nicht vorbehandelter junger Sprague-Dawley Ratten geringfügig höhere Flächen und Volumenanteile messen als bei unbehandelten Tieren.

Die Promotion eosinophiler FAH (Erhöhung in der Anzahl/cm² Leberfläche, höchster LI gegenüber den anderen FAH-Typen s. u.) durch Phenobarbital konnte in der eigenen Untersuchung bestätigt werden. SCHULTE-HERMANN et al. (1986) sehen die Ursache für den Anstieg in der Anzahl GGT- und/oder Cytochrom P450-PB-positiver FAH nach Initiation und 14-tägiger Phenobarbital-Verabreichung an weibliche Wistar Ratten nicht in der Promotion initiiertes Einzelzellen, sondern in der Induktion dieser Marker in zuvor schon vorhandenen, aber „latent“ vorliegenden FAH. Unterstützt wird diese These durch Ergebnisse ihrer Initiations-Promotions-Studie im Jahr 1990, in der der Anteil GGT-positiver FAH nach zweiwöchiger Phenobarbital-Applikation im Vergleich zu den nur initiierten Tieren von 50 % auf 90 % bei sich nur geringfügig erhöhender Gesamt-FAH-Anzahl anstieg. Die Veränderungen in der Enzymexpression gingen mit einem Shift von klarzelligen FAH zu eosinophilen und basophilen FAH einher.

Da sich die Gesamt-FAH-Anzahl/cm² in der eigenen Studie im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch über die Zeit nicht erhöhte und eine Verringerung der Anzahl/cm² der CCF bei gleichzeitigem Anstieg der Anzahl/cm² der ECF erfolgte, ist anzunehmen, daß die Verabreichung von Phenobarbital nicht die Entstehung von ECF de novo, sondern eine phänotypische Transformation der CCF zu ECF hervorruft. Unterstützt wird diese Annahme durch den zunehmenden Anteil an FAH, die sowohl aus eosinophilen als auch klarzelligen Hepatozyten zusammengesetzt waren. Im Vergleich zu den anderen FAH zeigte ein höherer Anteil der ECF, der auch mit Applikationsdauer zunahm (50 % nach 1 Woche, 80 % nach 4 und 13 Wochen), eine GST-P-Expression. Somit scheint der morphologische Wandel mit einer zunehmend veränderten Enzymexpression einherzugehen. Ähnlich den Kontrollen exprimierten nur 17 %-28 % der CCF GST-P.

Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

SCHULTE-HERMANN et al. (1982) ermittelten in einer Initiations-Promotions-Studie mittels Puls-Labeling ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) eine vorübergehende initiale Steigerung der Zellproliferationsrate in FAH. Nach ca. einer Woche lagen die Werte wieder auf Kontrollniveau. Der in der gleichen Studie mittels 2-Wochen-Pumpe ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) bestimmte LI in FAH initiierten und zusätzlich 2 Wochen promovierter Tiere überstieg den LI der FAH in nur initiierten Tieren 1,6-fach. Es erfolgte keine Auswertung unter Berücksichtigung verschiedener FAH-Typen. In der vorliegenden Zellproliferationsstudie konnten diese Ergebnisse für CCF nachvollzogen werden. Nach einem initialen Peak nach 1 Woche (1,9-fach über Kontrollwerten) lag der LI nach 4 und 13 Wochen wieder auf Kontrollniveau. Die initiale Zellproliferationssteigerung wurde sowohl bei GST-P-positiven als auch bei GST-P-negativen CCF beobachtet, war aber bei GST-P-positiven CCF stärker ausgeprägt und nur hier von statistischer Signifikanz. KOLAJA et al. (1996 b) wiesen im Vergleich zu nur initiierten Tieren einen durch Phenobarbital-Applikation (bis 60 Tage, 7-Tage-Pumpe BrdU) dauerhaft 1,4- bis 1,5-fach erhöhten LI in FAH promovierter Tiere nach. Dabei lagen zwischen den verschiedenen FAH-Typen keine deutlichen Differenzen im absoluten LI vor, die eosinophilen FAH zeigten aber die höchsten Steigerungen über Kontrollwerte. WARD und OHSHIMA (1985) bestimmten während einer bis zu 27 Wochen dauernden Applikation von Phenobarbital an alte F344/FCr Ratten (1-Stunde-Puls $[^3\text{H}]$ -Thymidin) in eosinophilen FAH (mit einem LI von ca. 0,5 % bis 1,2 %) höhere Zellproliferationsraten als in basophilen FAH (ca. 0,3 % bis 0,4 %) und unveränderten Hepatozyten (ca. 0,1 % bis 0,3 %). Eosinophile FAH traten bei den Kontrollen nicht auf, so daß kein Vergleich erfolgen konnte. BCF zeigten zu jedem Untersuchungszeitpunkt einen über unveränderte Hepatozyten erhöhten LI, der aber nicht durch die Phenobarbital-Gabe beeinflußt wurde. In der eigenen Untersuchung befand sich der LI in ECF zu jedem Untersuchungszeitpunkt über dem in CCF (1,2- bis 1,7-fach) und zeigte wie der LI in CCF einen initialen Peak mit darauffolgendem Abfall. Unerwarteter Weise lag der LI in GST-P-negativen ECF höher als in GST-P-positiven ECF, obwohl sich die Promotion der ECF deutlicher bei den GST-P-positiven ECF - in Form einer Zunahme in der Anzahl/cm² - darstellte. BCF wurden den Ergebnissen von WARD und OHSHIMA (1985) entsprechend nicht statistisch signifikant beeinflußt.

SCHULTE-HERMANN et al. (1989, 1990, 1993) ermittelten in Initiations-Promotions-Studien ein verstärktes FAH-Wachstum, obwohl sie keine länger anhaltende Erhöhung der Zellproliferationsrate durch Phenobarbital-Verabreichung nachweisen konnten. Die Autoren bestimmten, ebenso wie BURSCH et al. (1984) und KOLAJA et al. (1996 b), in FAH Pheno-

barbital behandelte Tiere gegenüber FAH nur initiierte Tiere verringerte Apoptose-Indizes. Sie vermuteten daher, daß die Promotionswirkung von Phenobarbital z. T. auf der Inhibition der Apoptose beruht, wodurch das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose, aus dem das langsame Nettowachstum der FAH beruht, gestört wird. Die von KOLAJA et al. (1996 b) beobachtete statistisch signifikante Senkung der Apoptoserate in FAH (bezogen auf die Gesamtheit aller FAH ohne Unterscheidung verschiedener FAH-Typen) nach 7, 30 und 60 Tagen beruhte auf einer geringfügigen Minderung bei allen FAH-Typen, aber nur bei eosinophilen FAH konnte nach 1 Woche ein statistisch signifikanter Unterschied zur nur initiierten Gruppe ausgemacht werden.

In der eigenen Studie wich der Apoptose-Index in keinem FAH-Typ signifikant von den Kontrollen ab. Da ECF bei den Kontrollen nur vereinzelt auftauchten, konnte aufgrund der fehlenden Vergleichsmöglichkeit nicht beurteilt werden, ob die Inhibition der Apoptose bei der Promotion der ECF eine Rolle spielte. Der AI in ECF lag in dem Bereich der AI der CCF. Durch die eigenen Untersuchungen konnte also die in der Literatur beschriebene Inhibition der Apoptose in FAH nicht bestätigt werden.

Warum in dieser Studie nach der Verabreichung von Phenobarbital trotz initialer Steigerung der Zellproliferation und nicht veränderter Apoptoserate in FAH keine Erhöhung der Gesamt-FAH-Anzahl/cm² und der durchschnittlichen Zellzahl/FAH-Querschnitt stattfand, kann nur vermutet werden. Bei der Messung der Zellproliferation wurden die in einer Woche akkumulierten markierten Zellkerne gezählt. Der ermittelte erhöhte Wert beinhaltet somit eine initiale Zellproliferationssteigerung, deren genaue Höhe und Dauer nur mittel Puls-Methode bestimmt werden könnte. Die Bestimmung des Apoptose-Index erfolgte durch Zählung der Apoptotischen Körperchen. Da das sichtbare Stadium der Apoptose in der Leber ca. 3 Stunden dauert (BURSCH et al., 1990), stellt diese Messung folglich eine Momentaufnahme dar. Da die FAH trotz erhöhtem LI nach einer Woche kein Wachstum zeigten, ist möglich, daß parallel zur initialen Erhöhung der Zellproliferation, die nach Literaturangaben vermutlich innerhalb der ersten Behandlungswoche beendet war (SCHULTE-HERMANN et al., 1982, 1986), auch eine Steigerung der Apoptoserate stattfand, die am 7. Tag aber nicht mehr nachweisbar war.

Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

WARD und OHSHIMA (1985) fanden während einer 27-wöchigen Verabreichung von Phenobarbital an weibliche alte F344/CNr Ratten 90,4 % der eosinophilen FAH (bei Kontrollen kaum vorhanden) und 85,9 % der GGT-positiven FAH (Kontrolle 100 %) in Zone 1. Die Bestimmung der Lokalisation basierte auf der anatomischen Nähe zu Portalfeld bzw. Zentralvene. Wie mit FAH verfahren wurde, die sich nicht in der Nähe eines Portalfeldes bzw. einer Zentralvene befanden, wurde nicht beschrieben. In der eigenen Studie wurde der höchste prozentuale Anteil der Gesamt-FAH-Anzahl (ohne Berücksichtigung der verschiedenen FAH-Typen) wie bei den Kontrollen zu allen drei Zeitpunkten in Zone 2 beobachtet. Im Laufe der Verabreichung konnte dabei eine geringfügige Verschiebung zu Zone 3 festgestellt werden (Abnahme des Anteils in Zone 2 und 1, Zunahme in Zone 3). Dieser Trend war am deutlichsten bei den ECF vorhanden, konnte aber auch bei den CCF nachvollzogen werden. Nach 4 Wochen lag der höchste Anteil der ECF in Zone 2, nach 13 Wochen in Zone 3.

Die Unterschiede zu den Ergebnissen von WARD und OHSHIMA (1985) könnten Folge der Verwendung von Ratten eines anderen Rattenstammes und eines anderen Geschlecht sein. Deutliche Unterschiede bestanden schon zwischen den Kontrolltieren der beiden Studien (s. 5.2.2.1). Weiterhin stellten die Autoren die Ergebnisse von mehreren Untersuchungen im Laufe der 27-wöchigen Applikation als Gesamtergebnis dar, so daß über die Lokalisation der FAH zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten und eventuelle Verschiebungen während der Verabreichung keine Aussage getroffen werden kann.

Wie bei den Kontrollen fielen bei der gesonderten Betrachtung der GST-P-positiven und GST-P-negativen CCF Unterschiede in der zonalen Verteilung der FAH auf. GST-P-positive CCF lagen deutlich häufiger in Zone 3 als in Zone 1, GST-P-negative CCF dagegen deutlich häufiger in Zone 1 als in Zone 3. Der prozentuale Anteil sowohl der GST-P-positiven als auch der GST-P-negativen CCF in Zone 3 erhöhte sich während der Phenobarbital-Applikation.

5.3.3 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

Übereinstimmend wurde in der Literatur von einem transienten Anstieg der Zellproliferation bzw. DNA-Synthese im extrafokalen Lebergewebe innerhalb der ersten Woche einer Phenobarbital-Verabreichung an Ratten berichtet, unabhängig davon, ob ein Protokoll mit (PERAINO et al., 1977; SCHULTE-HERMANN et al., 1986) oder ohne (JONES et al., 1993; KOLAJA et al., 1996 a) Initiation durchgeführt wurde. PERAINO et al. (1977) und JONES et al. (1993) bestimmten nach 5 Tagen wieder Werte auf Kontrollniveau oder darunter. Die von KOLAJA et al. (1996 a) mittels 7-Tage-Pumpe ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) nachgewiesene 4,7-fache

Steigerung nach einwöchiger Verabreichung von Phenobarbital (500 ppm im Futter) an F344 Ratten spiegelt diese initiale Zellproliferationssteigerung wider. Nach 2 Wochen war der LI weiterhin 1,4-fach erhöht, nach 3, 4 und 13 Wochen lag er wieder auf Kontrollniveau. Die zonale Messung der Zellproliferation ergab nach 1 Woche einen ca. 10-fachen Anstieg des LI in Zone 3 (von 2,2 % auf 21 %) sowie eine Verfünffachung des LI in Zone 2 (von 2,5 % auf 12 %). Nach 2 Wochen war nur noch in Zone 3 eine Erhöhung des LI nachzuweisen (2-fach). Ebenso beobachteten SCHULTE-HERMANN et al. (1986) und BAHNEMANN (2000) die initiale Proliferationssteigerung überwiegend in zentrolobulären Bereichen des Leberläppchens. CHEN et al. (1995) dagegen berichteten von höchsten Labelling-Indizes in Zone 1. Diese auffälligen Unterschiede könnten auf der Wahl des Versuchsprotokolls und der Auswertungsstrategie beruhen. CHEN et al. (1995) verabreichten Phenobarbital über 8 Tage und verwendeten zur Bestimmung der Zellproliferation eine 3-Tage-Pumpe (BrdU), die am 5. Tag der Phenobarbital-Applikation implantiert wurde. Zu diesem Zeitpunkt war aber der in den anderen Studien beschriebene initiale Peak in der Zellproliferation vermutlich schon überschritten. Die zonale Zuordnung erfolgte in dieser Studie durch Messung der Abstände der BrdU-markierten Kerne von der Zentralvene. Bei genauerer Betrachtung wird deutlich, daß sich der größte Anteil aller markierten Kerne in einem Abstand größer 150 µm von der Zentralvene befanden. Bei einem durchschnittlichen Durchmesser eines Leberläppchens von 400 µm ist in diesem Bereich auch unsere Zone 2 enthalten. Zudem ist fraglich, ob durch die Auswertung von je 1500 Zellen bei insgesamt 3 Tieren ein aussagekräftiges Ergebnis erreicht werden konnte.

Auch in der eigenen Untersuchung wurde ein initialer Peak in der Zellproliferation mit einer 2-fachen Steigerung des LI_{GES} nach 1 Woche ermittelt. Die nach 4- und 13-wöchiger Phenobarbital-Behandlung bestimmten Werte lagen wieder auf Kontrollniveau. Bei Betrachtung der einzelnen Zonen konnte Zone 3 deutlich als Hauptproliferationszone identifiziert werden. Die Erhöhung über Kontrollwerte war nach 1 Woche (6,8-fach) am höchsten, aber auch bei den bei den anderen Untersuchungszeitpunkten wurden noch merklich erhöhte LI (3,4- und 3,1-fach) gemessen. Im Gegenzug dazu war die Zellproliferation in Zone 1 deutlich verringert. Die zellproliferationshemmende Wirkung von Phenobarbital, wie sie von JRTLE et al. (1991, 1994) beschrieben wird, konnte also in der eigenen Studie nicht für das gesamte Leberläppchen, aber für Zone 1 nachvollzogen werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer zonalen Auswertung. Die anhaltende Induktion der Zellproliferation durch Phenobarbital in Zone 3, die mit einer erhöhten Wahr-

scheinlichkeit spontaner Mutationen einher geht, wäre bei nicht-zonaler Auswertung übersehen worden.

5.3.4 Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten

SCHULTE-HERMANN et al. (1982) bestimmten in einer Initiations-Promotions-Studie nach zweiwöchiger Phenobarbital-Verabreichung (2-Wochen-Pumpe [³H]-Thymidin) einen 3,8-fach höheren LI in FAH gegenüber dem LI unveränderter Hepatozyten. In der eigenen Untersuchung zeigten der LI in CCF und der LI_{GES} prinzipiell den gleichen Verlauf mit einem initialen Peak und nachfolgendem Abfall auf Kontrollwerte. Der LI in CCF lag dabei aber zu jedem Zeitpunkt deutlich (3,1- bis 4,1-fach) über dem LI_{GES}. Dieses Verhältnis entsprach den Kontrollen, was auf eine gleichermaßen vorhandene Ansprechbarkeit normaler und klarzelliger fokaler Hepatozyten auf Phenobarbital in Bezug auf die Zellproliferation schließen läßt. BCF, die ein höheres Potential zur malignen Transformation besitzen sollen, reagierten nur nach 4 Wochen stärker auf die zellproliferationssteigernde Wirkung von Phenobarbital als das Umgebungsgewebe (LI_{GES}:LI_{BCF}: 1:6,2). Insofern kann die „over-response“ Hypothese von SCHULTE-HERMANN (1986, 1989), nach der fokale Zellen überproportional auf die Verabreichung von Phenobarbital reagieren, nur bedingt nachvollzogen werden.

5.4 Chloroform

Es gilt allgemein als anerkannt, daß die karzinogene Wirkung von Chloroform auf einem nongenotoxisch-zytotoxischen Wirkmechanismus beruht (REITZ et al., 1982; LARSON et al., 1993; BUTTERWORTH et al., 1995). Chloroform führt nur in Dosierungen und Applikationsformen, die zytotoxische Erscheinungen und nachfolgend eine regenerative Zellteilung auslösen, zur Entstehung von Lebertumoren.

5.4.1 Allgemeine Wirkung auf die Leber

LARSON et al. (1993, 1995 a) diagnostizierten zentrolobuläre Leberzellnekrosen nach der Applikation von Chloroform, deren Ausmaß von Geschlecht der Ratten, Applikationsart, Dosis und Dauer der Verabreichung abhängig war. Bei der Exposition männlicher F344 Ratten per Sonde traten die zytotoxischen Erscheinungen innerhalb der ersten Behandlungswoche auf. Je höher die Dosierung war, desto früher manifestierte sich die Schädigung. Das Ausmaß der zentrolobulären Leberzellnekrosen reduzierte sich im Laufe der Verabreichung, so daß

nach drei Wochen bei einer mit der eigenen Studie vergleichbaren Dosierung (90 mg/kg) keine Veränderungen mehr ersichtlich waren. Ähnliche Beobachtungen wurden in der vorliegenden Studie gemacht. Neben der Degeneration und dem Untergang einzelner bis vieler Hepatozyten in Zone 3 nach 1 Woche traten weitere zytotoxische Erscheinungen in Form eines hohen Anteils an Tieren mit mononukleären Infiltraten und Leberzellverfettung auf. Im Laufe der Verabreichung verminderten sich die beschriebenen hepatotoxischen Veränderungen bei gleichzeitiger Zunahme der Prävalenz an Gallengangsproliferation. Die zytotoxischen Effekte spiegelten sich in einer hellbraunen Verfärbung der Lebern, dem Gewichtsverlust der Tiere (auf 87 % nach 13 Wochen), dem damit verbundenen Anstieg des relativen Lebergewebes und der hohen Todesrate (9 von 30 Tieren) wider.

5.4.2 FAH

Uneinigkeit herrscht in der Literatur über die Entstehung von FAH in Initiations-Promotions-Protokollen. DEML und OESTERLE (1985, 1987) beschrieben eine Steigerung in Größe und Anzahl ATPase-negativer und GGT-positiver FAH nach 11-wöchiger Chloroform-Verabreichung. PEREIRA et al. (1982) hingegen konnten keine promovierende Wirkung feststellen, und REDDY et al. (1992) schrieben Chloroform sogar eine inhibierende Wirkung auf mit DEN initiierte und mit Phenobarbital promovierte FAH zu. Die Ursache wurde in einer Zerstörung der initiierten Zellen vor der durch Phenobarbital induzierten klonalen Expansion vermutet.

Die Promotionswirkung von Chloroform wurde in der vorliegenden Studie bei Betrachtung der sich nicht signifikant verändernden Parameter Größe und Anzahl der FAH weder für die Gesamtheit der FAH noch bei gesonderter Untersuchung der verschiedenen FAH-Typen deutlich. Der stetige Anstieg in der Anzahl/cm² Leberfläche, der im wesentlichen durch GST-P-negative CCF hervorgerufen wurde, läßt aber vermuten, daß nach längerer Verabreichung auch signifikante Unterschiede zu den Kontrollgruppen erreicht würden.

Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

In der Literatur liegen keine Informationen über das Proliferationsverhalten von FAH nach der Gabe von Chloroform vor.

In der eigenen Untersuchung reagierten die verschiedenen FAH-Typen unterschiedlich auf die Verabreichung von Chloroform. Der LI in CCF zeigte einen initialen 3-fachen Anstieg und einen nachfolgenden Abfall auf weiterhin erhöhte Werte (ca. 2-faches der Kontrollwerte nach

4 und 13 Wochen). Dieser Verlauf wurde - aufgrund ihres hohen prozentualen Anteils an der Gesamtanzahl der CCF - durch GST-P-negative CCF bestimmt. In GST-P-positiven CCF wies der LI mit einem erneuten Anstieg nach 13 Wochen (3,4-faches der Kontrollen) einen anderen Verlauf auf. Der initiale Peak nach einer Woche konnte auch bei GST-P-negativen CCF ausgemacht werden (5,7-fach), die nach 4 und 13 Wochen gemessenen Werte lagen wieder auf Kontrollniveau. Der LI in NAH war zu jedem Untersuchungszeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht, wobei infolge schwankender Kontrollwerte Differenzen im Verlauf der absoluten Werte und der relativen Werte bestanden. Der absolut höchste Wert (8,1 %) wurde nach 13 Wochen ermittelt, während die höchste Steigerung über Kontrollwerte (7,2-fach) nach 4 Wochen vorlag.

Die absolute Anzahl an Apoptosen lag auffällig unter den bei den Kontrolltieren bestimmten Werten, bei der statistischen Auswertung konnte aber zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

Nach 1 und 4 Wochen lag der prozentual höchste Anteil der FAH in Zone 2. Im Laufe der Verabreichung sank der Anteil in dieser Zone bei gleichzeitiger Erhöhung in Zone 1 nach 4 Wochen und in Zone 3 nach 13 Wochen. Die Verschiebung der Hauptlokalisierung von Zone 2 zu Zone 3 zwischen 4 und 13 Wochen ließ sich bei NAH und CCF nachvollziehen. Der größte Anteil der GST-P-positiven CCF fand sich schon nach 1 Woche in Zone 3. Deutlich von der Verteilung bei den Kontrolltieren abweichend lag nach 13 Wochen auch der höchste Anteil der GST-P-negativen CCF in Zone 3.

5.4.3 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

Proliferationsmessungen im Lebergewebe wurden bisher nur bis zu einer Verabreichungsdauer von drei Wochen und ohne Berücksichtigung zonaler Unterschiede durchgeführt. LARSON et al. (1995 a) verabreichten Chloroform in verschiedenen Dosierungen per Sonde an männliche F344 Ratten und ermittelten nach 4-tägiger Verabreichung eine dosisabhängige Erhöhung des LI (4-Tage-Pumpe BrdU), die erst ab 90 mg/kg Körpergewicht im Vergleich zu Kontrollwerten Signifikanz zeigte. Um auch nach drei Wochen erhöhte LI (4,5-fach) zu erzeugen, war in dieser Studie eine Dosierung von 180 mg/kg Körpergewicht notwendig.

In der eigenen Studie wurde die Dosierung am 9. Behandlungstag wegen des Todes von 3 Tieren von 150mg/kg auf 100 mg/kg Körpergewicht herabgesetzt. Bei allen drei Untersuchungszeitpunkten wurde ein erhöhter LI_{GES} (6,6-fach nach 1 Woche, 4,4- und 4,7-fach nach

4 und 13 Wochen) festgestellt. Es ist möglich, daß die hohe Steigerung nach 1 Woche z. T. auch eine Folge der höheren Dosierung darstellt. Die stärkste Proliferation (6,7-fach) war nach 1 Woche in Zone 1 zu finden. In dieser Zone verminderte sich der LI im Verlaufe der Applikation (3,8- und 2,9-fach) bei gleichzeitiger Zunahme in Zone 3 (auf das 10-fache der Kontrollwerte nach 13 Wochen). Diese Verschiebung von Zone 1 zu Zone 3 ist typisch für zytotoxische Substanzen (LEE et al., 1998).

5.4.4 Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten

Die Entwicklung des LI während der Applikation zeigte in CCF und im extrafokalen Lebergewebe (LI_{GES}) einen parallelen Verlauf. Der LI in CCF lag dabei 1,5- bis 1,8-fach über dem LI im extrafokalen Lebergewebe, womit ein niedrigeres Verhältnis als bei den Kontrollwerten bestand. Ebenso war das Verhältnis $LI_{GES}:LI_{BCF}$ bei allen Untersuchungsterminen kleiner als bei den Kontrolltieren (1:1-2,3). Ursache dafür kann eine höhere zytotoxische Wirkung auf extrafokale Hepatozyten als auf klarzellige fokale Hepatozyten sein. Diese Annahme entspricht der „resistant cell hypothesis“ von SOLT und FARBER (1976).

5.5 Wyeth-14,643

Wyeth-14,643, eine Substanz aus der Gruppe der Peroxisomenproliferatoren, entfaltet seine in Langzeitversuchen (CATTLEY et al., 1989; MARSMAN und POPP, 1994) und Initiations-Promotions-Studien (CATTLEY et al., 1989) nachgewiesene hepatokarzinogene Wirkung in der Nagerleber nicht über einen genotoxischen Mechanismus (GLAUERT et al., 1984; GOEL et al., 1985).

5.5.1 Allgemeine Wirkung auf die Leber

In der Literatur werden Lebergewichtszunahmen beschrieben, die über die Dauer der Verabreichung von Wyeth-14,643 bestehen bleiben. Es wird von Steigerungen des relativen Lebergewichts um den Faktor 1,8 nach 1 Woche, um den Faktor 2,2 nach 6 Wochen und den Faktor 2,5 nach 13 Wochen berichtet (WADA et al., 1992; LAKE et al., 1993). In diesen Studien wurden junge Sprague-Dawley und F344 Ratten verwendet. Bei alten F344 wurde nach zweiwöchiger Applikation eine 1,8-fache Erhöhung ermittelt (MARSMAN et al., 1992). Der Anstieg des relativen Lebergewichts (1,4-fach nach 1 und 4 Wochen, 1,6-fach nach 13 Wochen) der Ratten der eigenen Studie unter der Verabreichung von Wyeth-14,643 lag in ähnlichen Bereichen und resultierte aus einer Minderung des Körpergewichts bei gleichzeitig

chen Bereichen und resultierte aus einer Minderung des Körpergewichts bei gleichzeitig erhöhtem absolutem Lebergewicht (1,3- bis 1,4-fach).

Die Lebergewichtszunahme soll auf einer Hyperplasie und einer zentrolobulären Hypertrophie der Hepatozyten beruhen. Die Hypertrophie ist Folge einer Zunahme und Vergrößerung intrazytoplasmatischer Peroxisomen (REDDY et al., 1980; WADA et al., 1992). Histologisch war bei allen drei Untersuchungszeitpunkten eine panlobuläre Hypertrophie der Hepatozyten zu erkennen. Die Peroxisomenproliferation äußerte sich in einem fein granulierten eosinophilen Zytoplasma. Weiterhin wurde eine bisher bei Ratten noch nicht beschriebene zytotoxische Wirkung von Wyeth-14,643 beobachtet, die sich in einer 60 %igen Prävalenz an hämorrhagischen Nekrosen nach 1 Woche äußerte. Die Prävalenz an Nekrosen lag nach 4 und 13 Wochen unter der nach 1 Woche (20 % und 40 % nach 4 und 13 Wochen), gleichzeitig stieg während der Applikation die Prävalenz an herdförmigen mononukleären Infiltraten und an Gallengangsproliferation an. Nach 13 Wochen wies die Leber ein extrem heterogenes Bild mit polymorphen Hepatozyten, die eine ausgeprägte Anisokariose zeigten, und eine unregelmäßige Läppchenstruktur auf. Als Ursache für diese Veränderungen kommt eine zu hohe Dosierung und eine besonders hohe Sensibilität des verwendeten Rattenstammes für Wyeth-14,643 in Frage. Die Dosierung von 1000 ppm im Futter entspricht zwar der in verschiedenen Studien (CATTLEY et al., 1991; MARSMAN und POPP, 1994) angewendeten Dosierung, diese Studien wurden aber an anderen Rattenstämmen durchgeführt.

5.5.2 FAH

Die Datenlage zu Entstehung und Wachstumsverhalten von FAH nach Applikation von Wyeth-14,643 ist sehr uneinheitlich. In Abhängigkeit vom Protokoll gehen die Berichte von der Erhöhung der Anzahl und der Größe bis hin zur alleinigen Steigerung von entweder Anzahl oder Volumen bzw. Volumenanteil (GLAUERT et al., 1986 a; CATTLEY et al., 1989, 1994; MARSMAN und POPP, 1994). Übereinstimmend wird aber in der Literatur das Auftreten eines besonderen FAH-Typs mit großen Zellen mit homogenem basophilen Zytoplasma geschildert (CATTLEY et al., 1989, 1991, 1994; MARSMAN und POPP, 1994; MILLER et al., 1995).

Bei der eigenen Untersuchung konnte ein Anstieg des prozentualen Anteils der BCF bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils der CCF beobachtet werden.

BCF waren der einzige FAH-Typ, für den ein statistisch signifikanter Anstieg in der Anzahl/cm² beobachtet werden konnte. Die Anzahl an BCF/cm² war nach 4 und 13 Wochen 3,1-fach höher als bei den Kontrollen. Die Gesamt-FAH-Anzahl/cm² fiel nach der 1,9-fachen

Steigerung nach 1 Woche wieder auf Kontrollniveau, um dann nach 13 Wochen wieder 1,6-fach über den Kontrollwerten zu liegen. Dieser Verlauf war stark durch die Entwicklung der den höchsten Anteil ausmachenden CCF bedingt, konnte aber auch bei NAH nachvollzogen werden. Ursächlich für das Verhalten der Gesamtzahl an CCF und BCF waren die GST-P-negativen FAH. Laut Literaturangaben sollen die durch Wyeth-14,643 promovierten FAH keine GST-P-Expression zeigen (RAO et al., 1986; HENDRICH et al., 1987). In der eigenen Studie exprimierten nach 1 Woche 4 % der CCF GST-P, der Anteil steigerte sich aber im Verlaufe der Behandlung auf 31 % nach 13 Wochen. Das Ausmaß der GST-P-Expression war gegenüber den Kontrollen verändert. Ein Teil der CCF wies nur eine schwache Intensität in der GST-P-Färbung auf (8 % und 44 % nach 4 und 13 Wochen). Nach 13 Wochen zeigten 47 % der CCF nur eine partielle GST-P-Expression. Die Ursache für diese Entwicklung lag in einer GST-P-Expression zahlreicher Hepatozyten, die disseminiert ohne Konzentration auf die FAH im Lebergewebe verteilt waren. Daraus resultierte die häufige Zuordnung von FAH zu den GST-P-positiven Herden, auch wenn nur wenige Zellen eines FAH GST-P exprimierten. Die Anzahl der GST-P-positiven CCF/cm² war nach 1 Woche auf 28 % der Kontrollwerte verringert und stieg während der Verabreichung auf das 1,4-fache der Kontrollwerte an. Wären aber nach der 13-wöchigen Applikation die nur partiell GST-P-positiven CCF als GST-P-negativ klassifiziert worden, lägen die Werte auf Kontrollniveau. Nur 2 % bis 4 % der BCF exprimierten GST-P. Insofern lassen sich die Untersuchungsergebnisse von RAO et al. (1986) und HENDRICH et al. (1987), bei denen die durch Wyeth-14,643 promovierten FAH nicht durch den Marker GST-P nachzuweisen waren, nachvollziehen.

Die Zellzahl/FAH-Querschnitt veränderte sich während der Applikation von Wyeth-14,643 bei keinem FAH-Typ in statistisch signifikanten Ausmaß. Bei CCF war aber ein kontinuierlicher Anstieg von 65 auf 118 Zellen pro FAH-Querschnitt erkennbar, der auf ein Wachstum der CCF hinweist, das wahrscheinlich bei längerer Applikation deutlicher würde und durch höhere Tierzahlen statistisch abgesichert werden könnte.

Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

Nach 1 Woche lag der Hauptanteil der FAH (38 %) den Kontrollgruppen entsprechend in Zone 2. Im Laufe der Verabreichung von Wyeth-14,643 wurde bei Abnahme des Anteil in Zone 2 eine Zunahme in Zone 1 erkannt. Die Verschiebung zu Zone 1 als Hauptlokalisationszone konnte bei allen FAH-Typen nachvollzogen werden.

Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

Die in der Literatur aufgeführten LI in nach Langzeit-Applikation von Wyeth-14,643 entstandenen homogen basophilen FAH von 60 % (MARSMAN und POPP, 1994) und 36 % (MILLER et al., 1995) sind aufgrund der Verwendung junger F344 Ratten nicht direkt mit der eigenen Studie vergleichbar. Zudem konnte in diesen Studien infolge eines Mangels an spontan entstandenen FAH kein Vergleich mit FAH der Kontrollgruppe erfolgen.

In der eigenen Studie lag der LI in jedem FAH-Typ zu jedem Zeitpunkt über den Kontrollwerten. Die LI der FAH-Typen unterschieden sich aber im Kurvenverlauf und im Ausmaß der Erhöhung über die Kontrollwerte. Die Zellproliferation in CCF und BCF lag nach einem initialen Peak nach 1 Woche (CCF: 7,8-faches; BCF: 12-faches der Kontrollwerte) auch im weiteren Verlauf der Applikation signifikant über den Kontrollwerten, wobei der LI in CCF auf konstantem Niveau verblieb (4,5- und 4,8-faches der Kontrollwerte nach 4 und 13 Wochen) und in BCF kontinuierlich kleiner wurde (4,1- und 2,7-fach). Einen grundsätzlich anderen Verlauf wiesen NAH mit einem deutlichen Anstieg des LI zwischen 1 und 4 Wochen (11- und 25-faches der Kontrollwerte) auf.

Über die Auswirkung einer Verabreichung von Wyeth-14,643 auf das Apoptoseverhalten der Hepatozyten eines FAH ist aus der Literatur nichts bekannt. Im normalen Lebergewebe konnten MARSMAN et al. (1992) erst am Ende einer 22-wöchigen Applikation an F344 Ratten (1000 ppm im Futter) eine Verdreifachung des AI beobachten. Dem entgegen stehen Ergebnisse von BAYLY et al. (1994), ROBERTS et al. (1995) sowie JAMES und ROBERTS (1996), nach denen Nafenopin, ein weiteres nicht-genotoxisches Karzinogen aus der Gruppe der Peroxisomenproliferatoren, in vivo und in vitro die Apoptose hemmen soll. ROBERTS et al. (1995) stellten eine Reduktion des AI von 0,031 % auf 0,002 % infolge der Nafenopin-Behandlung fest. Die eigenen Messungen wiesen nicht auf eine Hemmung, sondern auf eine deutliche Induktion der Apoptose innerhalb der FAH durch die Applikation von Wyeth-14,643 hin. Diese manifestierte sich in einem in CCF und NAH signifikant erhöhten AI, der die höchsten Werte bzw. Steigerungen über Kontrollwerte nach 1 Woche zeigte (CCF: 14-fach über Kontrollwerten; NAH 0,006 % gegen 0 % bei den Kontrollen). Nach 4 Wochen befand sich der AI nur gering über Kontrollwerten und stieg nach 13 Wochen wieder auf erhöhte Werte an (CCF: 5,6-fach; NAH: 0,02 % gegen 0 % bei den Kontrollen). In einer Studie von MARSMAN et al. (1992) zeigten verschiedene Substanzen aus der Gruppe der Peroxisomenproliferatoren unterschiedliche Auswirkungen auf die Apoptoserate. Die Abweichung von den Ergebnissen nach Nafenopin-Verabreichung kann daher einerseits auf einen unterschiedlichen Einfluß verschiedener Peroxisomenproliferatoren auf die Apoptose hinweisen,

andererseits könnte die Induktion der Apoptose mit der beobachteten zytotoxischen Wirkung von Wyeth-14,643 in Zusammenhang stehen.

Die Entwicklung der Zellproliferation, der Apoptose und der Anzahl der FAH/cm² während der Applikation können in einen zeitlichen Zusammenhang gebracht werden. Die signifikante Erhöhung in der Anzahl der CCF und NAH/cm² nach der einwöchigen Verabreichung von Wyeth-14,643 ging einher mit einer gesteigerten Zellproliferationsrate in diesen FAH. Der Abfall in der Anzahl nach 4 Wochen könnte durch eine Zerstörung/Regression der FAH durch die Induktion von Apoptose und herdförmigen Nekrosen, die nach 1 Woche festgestellt wurden, bedingt sein. Bei weiterhin erhöhter Zellproliferationsrate, aber wieder verringerter Apoptoserate kam es dann zu einem erneuten Ansteigen der Anzahl an FAH/cm² nach 13 Wochen.

In BCF dagegen war der AI zu keinem Zeitpunkt gegenüber den Kontrollen verändert, so daß deren Anzahl bei dauerhaft erhöhtem LI zunahm.

5.5.3 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

Übereinstimmend wird in der Literatur eine Induktion der Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe innerhalb der ersten Verabreichungswoche von Wyeth-14,643 beschrieben. MARSMAN et al. (1988) konnten am ersten Verabreichungstag mittels Puls-Labeling eine innerhalb von 4 Tagen vorübergehende 4,4-fache Steigerung des LI (auf 8,8 %) ermitteln. Nach der Nutzung subkutaner Minipumpen (3- bis 7-tägige Applikation des Markers) wurde von einer initial starken Steigerung des LI nach 1 Woche und einem Abfall auf dauerhaft (bis 52 Wochen) über Kontrollwerte erhöhtes Niveau berichtet. Die Werte differierten zwischen 3,5- und 17-fachen Steigerungen über die Kontrollwerte (MARSMAN et al., 1988; CATTLEY et al., 1991; WADA et al., 1992; LAKE et al., 1993; MARSMAN und POPP, 1994; MILLER et al., 1995). Ursache für die Differenzen sind Unterschiede im Versuchs- und Labeling-Protokoll. Diese Studien wurden an jungen Ratten durchgeführt. CATTLEY et al. (1991) beobachteten im Vergleich alter mit jungen Ratten eine geringere Ansprechbarkeit alter Ratten auf die zellproliferationssteigernde Wirkung von Wyeth-14,643. Die 22-wöchige Verabreichung von Wyeth-14,643 (1000 ppm) an 15 Monate alte F344 Ratten führte zu einer 2,2-fachen Erhöhung (auf 4,3 %) des LI (6-Tage-Pumpe [³H]-Thymidin) im Vergleich zu einer 17-fachen Steigerung (auf 9,9 %) bei 2 Monate alten Tieren.

Auch die eigenen Messungen ließen eine initiale Steigerung (14,2-fach über Kontrollwerte) nach 1 Woche und auch im weiteren Verlauf erhöhte (7,9- und 7,7-fach) LI_{GES} erkennen. Die

Zellproliferation war bei allen Untersuchungszeitpunkten in allen drei Zonen gesteigert, als Hauptproliferationszone mit absolut höchsten LI und im Vergleich zur Kontrolle höchsten Steigerungen (17,9-, 9,6- und 9-fach) konnte aber eindeutig Zone 1 ausgemacht werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von MARSMAN et al. (1988), EACHO et al. (1991) und WADA et al. (1992) überein, die ebenfalls die Proliferationssteigerung nach Verabreichung von Wyeth-14,643 (bis 52 Wochen) überwiegend in periportalen Bereichen des Leberläppchens beobachteten.

5.5.4 Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten

MARSMAN und POPP (1994) ermittelten in nach 37- und 52-wöchiger Verabreichung von Wyeth-14,643 entstandenen BCF einen 5,5-fach höheren LI als im Umgebungsgewebe.

Auch in der eigenen Studie lagen die LI der FAH deutlich über dem LI_{GES} . Die Entwicklung des LI in CCF und BCF zeigte Parallelen zum LI_{GES} . Das Verhältnis $LI_{GES}:LI_{CCF}$ bzw. LI_{BCF} betrug 1:1,8-2,4 und lag damit unter dem bei Kontrollen für CCF und BCF errechneten Verhältnis (CCF: 1:3,3-3,9; BCF: 1:2,8-4,9). Dieses Ergebnis deutet auf eine stärkere Ansprechbarkeit der extrafokalen Hepatozyten auf den von Wyeth-14,643 ausgehenden Proliferationsreiz hin.

5.6 Ethinylestradiol

Ethinylestradiol ist ein synthetisches Steroidhormon, dessen tumorpromovierende Wirkung nachgewiesen ist, über dessen Initiationskapazität aber Uneinigkeit herrscht (LANG und REDMANN, 1979; GHIA und MERETO, 1989; MAYOL et al., 1991; SHIMOMURA et al., 1992).

5.6.1 Allgemeine Wirkung auf die Leber

Die kontinuierliche Verabreichung von Ethinylestradiol an junge Ratten führt zu einer Erhöhung des absoluten Lebergewichts. Nach 7-tägiger Verabreichung (0,5 mg) an weibliche Wistar Ratten lagen die Werte 1,2-fach (OCHS et al., 1986), nach 2- bzw. 4-monatiger Applikation (0,15 mg) 1,3- bis 1,4-fach (MACHISHI et al., 1995) über Kontrollwerten. Aus gegenüber den Kontrollen verringerten Körpergewichten (70 %) resultierte eine 1,3- bis 1,4-fache Zunahme des relativen Lebergewichts (OCHS et al., 1986). In der eigenen Studie konnte kein Anstieg des absoluten Lebergewebes beobachtet werden, das relative Lebergewicht zeigte

aber infolge einer Reduktion des Körpergewichts (auf 83 % und 74 %) nach 4 und 13 Wochen einen 1,1- und 1,4-fachen Anstieg über Kontrollwerte.

MAYOL et al. (1992) bemerkten eine unterschiedliche Empfindlichkeit von F344 Ratten und Sprague-Dawley Ratten auf die Applikation von Ethinylestradiol (10 ppm im Futter). Nur bei Sprague-Dawley Ratten konnten die Autoren nach chronischer Exposition toxische Effekte in Form einer Vakuolisierung (Dilatation und Vesikularisierung des Endoplasmatischen Retikulums, Schwellung von Mitochondrien) feststellen. Bei diesem Rattenstamm wurde nach einer einjährigen Verabreichung nach Initiation eine Gallengangshypertrophie und -plasie diagnostiziert (MAYOL et al., 1991). Auch bei den in der vorliegenden Studie verwendeten Wistar Ratten wiesen die Lebern bei allen Untersuchungszeitpunkten eine ausgeprägte Gallengangsproliferation auf, die in Ausmaß und Prävalenz deutlich über den Kontrollen lag. Gleichzeitig erhöht war die Prävalenz an mononukleären Infiltraten (80 % bis 90 %), die sich überwiegend in Zone 1 fanden. Weiterhin wurde eine nach 4 Wochen beginnende Umstrukturierung des Lebergewebes in periportalen Bereichen beobachtet. Nach 13 Wochen wiesen die Hepatozyten der Zone 1 eine Anisozytose und -karyose sowie ein basophiles Zytoplasma auf. Der Verlauf der z. T. zweireihigen Leberzellbälkchen von der Zentralvene zur Läppchenperipherie konnte in vielen Leberläppchen nicht mehr nachvollzogen werden. Weite Sinusoide, sich aus dem Zellverband lösende Zellen und degenerative Erscheinungen bei einzelnen Hepatozyten (Kondensation des Zytoplasmas, Kernpyknosen) wiesen auf einen vermehrten Zelluntergang in Zone 1 hin. Ab 4 Wochen zeigten die Hepatozyten in Zone 1 eine zunehmende Basophilie. Eventuell ist dieser Befund mit den von MAYOL et al. (1992) beschriebenen diffus hyperplastischen, basophilen GGT-positiven Arealen in periportalen Bereichen in Zusammenhang zu bringen.

5.6.2 FAH

Die promovierende Wirkung einer 4-monatigen Verabreichung von Ethinylestradiol (10 ppm) nach Initiation äußert sich nach MAYOL et al. (1991) in einer Vergrößerung der durchschnittlichen Fläche, nicht aber in der Erhöhung der Anzahl GST-P-positiver FAH (2,6-fach bei männlichen, 2,9-fach bei weiblichen Sprague-Dawley Ratten). YAGER et al. (1986) dagegen ermittelten in einer vergleichbaren Studie neben der Vergrößerung auch einen Anstieg der Anzahl GGT-positiver FAH. Auch ohne vorherige Initiation entwickelten sich nach 4-monatiger Exposition bei allen jungen weiblichen Wistar (ab 0,075 mg/d) und Sprague-Dawley Ratten (2,5 µg/d) FAH, deren Anzahl und Fläche im Laufe der Verabreichung anstiegen (YAGER et al., 1986; SHIMOMURA et al., 1992; MACHISHI et al., 1995; OGAWA et

al., 1995). MAYOL et al. (1992) beschrieben nach 6- und 9-monatiger Behandlung von Sprague-Dawley Ratten große hyperplastische FAH, die aus klarzelligen und eosinophilen Hepatozyten zusammengesetzt waren und keine GST- und GGT-Expression zeigten. Ebenso waren die von SHIMOMURA et al. (1992) und MACHISHI et al. (1995) nach 4-monatiger Applikation an Wistar Ratten nachgewiesenen FAH klarzellig/eosinophil-gemischt, ließen aber eine GGT- und GST-P-Expression erkennen.

In der vorliegenden Studie machten CCF den größten Anteil aus, der sich im Laufe der Verabreichung von 85 % auf 75 % reduzierte. Im Gegenzug stieg der Anteil an BCF (von 7 % auf 12 %) und MCF (von 0,8 % auf 8 %) an. Nur 0 % bis 7 % der BCF und MCF exprimierten GST-P.

Die Gesamt-FAH-Anzahl/cm² Leberfläche stieg im Laufe der Behandlung kontinuierlich von 10,3 nach einer Woche auf 15,7 und 22,8 nach 4 und 13 Wochen an, womit die Anzahl am Ende der Studie 1,9-fach über Kontrollniveau lag. Diese Steigerung war bei MCF, CCF und BCF deutlich wiederzufinden. Mit MCF wurde damit ein FAH-Typ promoviert, der bei den Kontrollen nur vereinzelt nachgewiesen wurde. Die Promotion der MCF, die aus basophilen und klarzelligen Hepatozyten zusammengesetzt waren, wurde schon nach 4-wöchiger Applikation deutlich. Zu diesem Zeitpunkt lag die Anzahl mit 0,6/cm² 3-fach über den Kontrollwerten und erhöhte sich weiterhin auf 1,6/cm² (7,9-faches der Kontrollen). Die Promotion der CCF und BCF wurde erst nach 13 Wochen offensichtlich. Die Anzahl der CCF war mit 16,6/cm² 1,7-fach, die Anzahl der BCF mit 2,7/cm² 4,5-fach über Kontrollwerte erhöht. Für keinen FAH-Typ konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der durchschnittlichen Zellzahl/FAH-Querschnitt ermittelt werden. Bei CCF ließ sich aber über den Zeitverlauf ein stetiger Anstieg von 69 Zellen/FAH-Querschnitt nach 1 Woche in auf 104 Zellen/FAH-Querschnitt nach 13 Wochen ermitteln. Der gegenüber den Kontrollen leicht geminderte Wert nach 1 Woche kann als Folge einer Entstehung neuer, anfangs noch kleiner FAH gedeutet werden, wodurch sich die durchschnittliche Größe verringert. BCF und MCF wiesen merklich höhere durchschnittliche Zellzahlen/FAH-Querschnitt auf (BCF: 213-343; MCF: 256-516) als CCF.

Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

Über das Proliferationsverhalten der FAH ist aus der Literatur wenig bekannt. Nur MAYOL et al. (1992) schilderten ohne Angabe eines genauen LI eine hohe Anzahl BrdU-gelabelter Zellen in den nach 6- und 9-monatiger Verabreichung nachgewiesenen klarzellig/eosinophil-gemischten FAH.

In der eigenen Studie lag der LI in allen FAH-Typen zu allen Untersuchungszeitpunkten über Kontrollwerten. Der Verlauf des LI in CCF, BCF und NAH zeigte während der Applikation eine ähnlichen Entwicklung. Nach einer initialen Steigerung nach 1 Woche kam es zu einem Abfall nach 4 Wochen und einem erneuten Anstieg nach 13 Wochen. Dabei wiesen BCF nach 1 Woche sowohl absolut als auch im Vergleich zu Kontrollen höhere LI auf als CCF (BCF: 33,31 %, 9,5-faches der Kontrollen; CCF: 19,2 %, 4,6-faches der Kontrollen). Nach 4 und 13 Wochen lagen die LI der beiden FAH-Typen in ähnlichen Bereichen (BCF: 16,6 %, 25,8 %, CCF: 15,3 %, 24,8%). Der LI in NAH war mit 6,9 %, 4,4 % und 9,8 % nach 1, 4 und 13 Wochen deutlich niedriger als in den anderen FAH-Typen. Einen anderen Verlauf über die Zeit wies der LI der MCF auf. Hier konnte eine kontinuierliche Steigerung von 23,2 % nach 1 Woche auf 28,1 % und 36,4 % nach 4 und 13 Wochen ermittelt werden.

Über das Apoptoseverhalten von FAH nach Ethinylestradiol-Verabreichung liegen keine Informationen vor. Im extrafokalen Lebergewebe ermittelten MAYOL et al. (1992) nach 3-tägiger Verabreichung von Ethinylestradiol (10 ppm) einen ca. 1,7-fach erhöhten Apoptose-Index (Kontrolle ca. 0,09 %). Nach 1 Woche lag der AI wieder auf Kontrollniveau. In der eigenen Studie konnte in keinem FAH-Typ ein Abweichen des AI von den Kontrollwerten ermittelt werden, so daß vermutet werden kann, daß die Inhibition der Apoptose in FAH bei der Ethinylestradiol-Promotion keine Bedeutung hat.

Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

Der Hauptanteil der FAH lag zu allen Untersuchungszeitpunkten in Zone 1 des Leberläppchens (32 % bis 37 %). Bei der gesonderten Betrachtung der einzelnen FAH-Typen wurde für CCF und BCF der Schwerpunkt in Zone 1 deutlich. Die Zunahme des prozentualen Anteils der BCF in Zone 1 zwischen 1 und 4 Wochen (10 %, 38 %) ist in Zusammenhang mit der Abnahme des Anteils in Zone 1/2/3 (57 %, 25 %) zu sehen. Der hohe Anteil in Zone 1/2/3 nach 1 Woche war durch den hohen prozentualen Anteil der großen BCF-NOS (13 von 28 BCF) bedingt. Bei fast gleichbleibender absoluter Anzahl der BCF-NOS sank nach 4 Wochen ihr prozentualer Anteil an der Gesamt-BCF-Anzahl (18 von 61). Die sich neu entwickelnden FAH entstanden also überwiegend in Zone 1. Für MCF kann aufgrund der häufigen Zuordnung zu mehr als einer Zone infolge der Größe der zonale Ursprung in Zone 1 nur vermutet werden. Der größte Anteil der NAH fand sich zu allen drei Zeitpunkten in Zone 3 (44 %, 37 % und 39 %).

5.6.3 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

Übereinstimmend wurde von einem initialen Proliferationsanstieg im extrafokalen Lebergewebe infolge der Verabreichung von Ethinylestradiol berichtet. Die Angaben differieren in Zeitpunkt und Ausmaß der maximalen Erhöhung sowie in der Geschwindigkeit des Rückfalls auf Kontrollniveau. OCHS et al. (1986; Wistar Ratten, 0,5 mg/d) fanden einen 20-fachen Anstieg nach 1 Tag, MACHISHI et al. (1995; Wistar Ratten, 0,15 mg/d) eine 4-fache Erhöhung nach 3 Tagen. In beiden Studien fiel der LI innerhalb von 7 Tagen auf Kontrollniveau. YAGER et al. (1986; Sprague-Dawley Ratten, 2,5 µg/d), die auch nach 1 Tag einen 4-fach erhöhten LI feststellten, bestimmten auch nach 7 Tagen noch einen 2-fach erhöhten LI. Erst nach 14 Tagen war wieder das Kontrollniveau erreicht. Die von YAGER et al. (1994; Lewis Ratten, 5µg/d) nach 7-tägiger Applikation mittels 7-Tage-Pumpe (BrdU) ermittelte Erhöhung des LI von 13,3 % (Kontrolle) auf 34,6 % spiegelt den initialen Peak wider. Nach 4- und 7-wöchiger Exposition beobachteten die Autoren eine deutliche Inhibition der Zellproliferation. Dieses Ergebnis geht nicht konform mit den Resultaten von MACHISHI et al. (1995; Wistar Ratten, 0,15 mg/d), die mittels Puls-Labeling ($^3\text{[H]}$ -Thymidin) bei einer Langzeitapplikation (bis 8 Monate) dauerhaft erhöhte LI nachwies. Die höchste Steigerung über Kontrollwerte (5-fach) lag nach 2 Monaten vor. MAYOL et al. (1992; Sprague-Dawley Ratten, 10 ppm im Futter) beschrieben einen erneuten Anstieg der Zellproliferation nach 6 Monaten (von 0,2 % auf 1,5 %) und nach 9 Monaten (von 0,4 % auf 2,9 %). YAGER et al. (1994) vermuteten, daß die von MAYOL et al. (1992) ermittelten erhöhten Zellproliferationsraten Folge einer zytotoxischen Schädigung der Hepatozyten seien, die aus einer hohen Dosierung resultiert. Die in der eigenen Studie eingesetzte Dosierung von 10 ppm im Futter entspricht der von MAYOL et al. (1992) verwendeten. Ebenso wie in dieser Studie konnte nach einer initialen Steigerung der Zellproliferation (4,5 % nach 1 Woche, 3,6-faches der Kontrollen) zunächst ein Abfall (nach 4 Wochen 2,9 %, 2,8-fach) und später ein erneuter Anstieg in der Zellproliferation (nach 13 Wochen 4,9 %, 4,3-fach) beobachtet werden. Der Unterschied zwischen den Resultaten bestand aber in dem hier dauerhaft über die gesamte Applikationsperiode erhöhten LI_{GES} und in dem zeitlich viel früher stattfindenden erneuten Anstieg der Zellproliferation. MAYOL et al. (1992) beobachteten während der akuten Hyperplasie eine panlobulär gesteigerte Zellproliferationsrate. Nach der Langzeitapplikation dagegen wurde als Hauptproliferationszone bei Sprague-Dawley Ratten Zone 2, bei F344 Ratten Zone 1 bestimmt. In der vorliegenden Studie war die Hauptproliferationszone bei allen Untersuchungszeitpunkten Zone 1. Dort fanden sich mit 9,3 %, 4,5 % und 8,2 % nach 1, 4 und 13 Wochen die absolut höchsten LI (4-, 2,3- und 4,6-faches der Kontrollwerte). Die höchsten Steigerungen über Kontrollwerte konnten bei

absolut niedrigeren LI (1,8 %, 2 % und 2,6 %) aber in Zone 2 beobachtet werden (4,2- 6,6- und 6-fach).

5.6.4 Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten

CCF, BCF und NAH zeigten mit einer initialen Steigerung nach 1 Woche, einem darauffolgendem Abfall nach 4 Wochen und einem erneuten Anstieg des LI nach 13 Wochen tendenziell die gleiche Entwicklung wie die extrafokalen Hepatozyten. Dabei lag der LI in CCF 4,3- bis 5,3-fach, in BCF 5,3- bis 7,4-fach und in NAH 1,5- bis 2-fach über dem LI_{GES} . Die fokalen Zellen sprachen somit stärker auf die zellproliferationssteigernde Wirkung von Ethinylestradiol an als extrafokale Hepatozyten. Der LI in MCF stieg während der Applikation von Ethinylestradiol kontinuierlich an und lag dabei 5,1- bis 9,6-fach über dem LI_{GES} . Der von den anderen FAH-Typen abweichende Verlauf des LI spricht für eine verringerte Abhängigkeit der MCF von den Wachstumskontrollmechanismen.

5.7 PCB 126

PCB 126, eines der am stärksten wirksamen Polychlorierten Biphenyle (KRISHNAN und SAFE, 1993), ist ein Lebertumor-Promotor, der nach überwiegender Meinung keine genotoxischen Eigenschaften besitzt (SCHOENY et al., 1979; SCHOENY, 1982; PROBST et al., 1981; WHYSNER et al., 1998). Andere Autoren hingegen wiesen PCB auch eine genotoxische Wirkung zu (WONG et al., 1979; SARGENT et al., 1989).

5.7.1 Allgemeine Wirkung auf die Leber

In einer Untersuchung von CHU et al. (1994) führte die alleinige 13-wöchige Verabreichung von PCB 126 an Sprague-Dawley Ratten dosisabhängig (10-100 ppb im Futter) zu einer 1,2- bis 1,6-fachen Erhöhung des relativen Lebergewichts. Auch in der eigenen Studie lag das relative Lebergewicht nach 13 Wochen 1,2-fach über den Kontrollen. Histologisch stellten verschiedene Autoren bei Sprague-Dawley Ratten eine hepatotoxische Wirkung von PCB 126 fest. MACLELLAN et al. (1994) beobachteten nach 13-wöchiger Verabreichung (100 ppb im Futter) eine hepatozelluläre Verfettung und eine Lipofuszin-Akkumulation, CHU et al. (1994) stellten milde zytoplasmatische Vakuolisierungen in Zone 3 und 2 fest. HEMMING et al. (1995) und HAAG-GRÖNLUND et al. (1997) berichteten nach 20- bzw. 52-wöchiger Applikation (10 µg/kg Körpergewicht/Woche) von fokalen hämorrhagischen Nekrosen, regenerativer Hyperplasie, multinukleären Riesenzellen und Gallengangsproliferation. Die histologi-

schen Befunde der eigenen Studie ließen auch eine zytotoxische Wirkung von PCB 126 auf die Leber alter Wistar Ratten vermuten. Die Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrollen eine stärkere hepatozelluläre Verfettung auf, die nach 1 Woche überwiegend in Zone 1, nach 4 Wochen in Zone 1 und 3 und nach 13 Wochen hauptsächlich in Zone 3 vorlag. Zusätzlich stieg im Laufe der Verabreichung die Prävalenz an herdförmigen mononukleären Infiltraten von 70 % auf 90 % an. Eine deutlich erhöhte Prävalenz an Gallengangsproliferation (90 %) fand sich nach 1 Woche.

5.7.2 FAH

HAAG-GRÖNLUND et al. (1997) konnten nach 20-wöchiger Applikation von PCB 126 (10 µg kg Körpergewicht/Woche) an weibliche, ca. 12 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten weder eine Erhöhung der Anzahl noch des Volumenanteils GST-P-positiver FAH feststellen. Nach vorheriger Initiation mit Nitrosodiethylamin führte die Verabreichung von PCB 126 zu einem Anstieg des Volumenanteils (2,8-fach (BAGER et al., 1997), ca. 3-fach (HEMMING et al., 1995), 8-fach (HAAG-GRÖNLUND et al., 1997)), der Anzahl/cm³ (ca. 3-fach (HAAG-GRÖNLUND et al., 1997)) und des Volumens der FAH (1,6-fach (HEMMING et al., 1995)). Eine Klassifikation der FAH erfolgte in diesen Studien nicht. Bei der Untersuchung der Auswirkung unterschiedlich langer Applikation von PCB-Gemischen (18 und 105 Wochen) beschrieben PRESTON et al. (1981) und WARD (1985) die Promotion eosinophiler FAH. MAYES et al. (1998) beobachteten nach 24 Monaten ebenfalls das Auftreten eosinophiler FAH, zusätzlich auch klarzelliger und gemischtzelliger FAH in geringerer Anzahl. Bei den in der eigenen Studie verwendeten alten Wistar Ratten wurde die prozentuale Verteilung der FAH-Typen nur geringfügig durch die PCB 126-Gabe beeinflusst. ECF schienen durch PCB 126 promoviert zu werden. Der prozentuale Anteil an ECF lag zwischen 0,4 % und 1,6 % und damit über den Kontrollen. Ebenso wurde nur für ECF der Anstieg in der Anzahl/cm² von 0,12 auf 0,26, der durch GST-P-positive ECF hervorgerufen wurde, zwischen 4 und 13 Wochen als statistisch signifikant bewertet. Die geringe Zellzahl/ECF-Querschnitt (23, 13, 51 nach 1, 4 und 13 Wochen) deutete auf eine Neuentwicklung der ECF hin. Die Anzahl/cm² der Gesamt-FAH-Anzahl und der anderen FAH-Typen sowie die durchschnittliche Zellzahl/FAH-Querschnitt blieben durch die Verabreichung von PCB 126 im wesentlichen unbeeinflusst. Die Zellzahl/CCF-Querschnitt war nach 13 Wochen auf 70 % der Kontrollwerte reduziert, was auf einer Verminderung der Zellzahl der GST-P-positiven CCF auf 48 % der Kontrollwerte beruht. Die Ursache dafür ist im Zusammentreffen eines im Vergleich zu den

anderen Kontrollgruppen hohen Kontrollwertes nach 13 Wochen und einer nur geringen Senkung der Zellzahl/FAH-Querschnitt bei der PCB 126-Gruppe zu sehen.

Zellproliferation und Apoptose innerhalb der FAH

Der LI der ECF, des einzigen FAH-Typs, für den ein statistisch signifikanter Anstieg in der Anzahl/cm² ermittelt werden konnte, stieg im Laufe der Verabreichung an (0,3 %, 0,97 %, 4,76 %). Der Vergleich mit den Kontrollgruppen ist wenig sinnvoll, da bei den Kontrollgruppen nach 1 und 4 Wochen nur je ein ECF auftrat (LI: 11 % und 0 %). Ein promovierender Effekt von PCB 126 auf die anderen FAH-Typen konnte auch bei der Untersuchung des Proliferationsverhaltens nicht festgestellt werden. Kein FAH-Typ wies statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen auf. Der LI in CCF zeigte aber während der Verabreichung einen stetigen Anstieg (4,24 %, 5,8 %, 6,74 %), so daß nach 13 Wochen der LI_{CCF} 1,7-fach über Kontrollwerten lag. Eventuell ist das Ausdruck für eine sich mit Dauer der Verabreichung erhöhende Empfänglichkeit der fokalen Hepatozyten auf den promovierenden Effekt von PCB 126. Für NAH ist diese Entwicklung nicht nachzuvollziehen, der LI_{NAH} sank während der Verabreichung (4,51 %, 1,6 %, 0,65 %). Der sich in keinem FAH-Typ von den Kontrollwerten unterscheidende Apoptose-Index nach PCB 126-Verabreichung spricht dafür, daß die Hemmung der Apoptose im Rahmen der Promotion durch PCB 126 nicht von Bedeutung war.

Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens

Es konnte nach der Verabreichung von PCB 126 für die Gesamtheit aller FAH keine Hauptlokalisationszone bestimmt werden. Das gleiche galt für die Gesamtheit der CCF. Bei gesonderter Betrachtung der GST-P-positiven und -negativen CCF wurde aber für GST-P-positive CCF Zone 3 (39 %, 45 %, 54 % nach 1, 4 und 13 Wochen), für GST-P-negative CCF Zone 1 (36 % bis 38 %) als Hauptlokalisationszone ermittelt.

5.7.3 Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe

Messungen der Zellproliferation und Apoptose wurden bisher mit PCB 126 als Einzelsubstanz nicht durchgeführt. DEML und OESTERLE (1982) bestimmten nach 24-stündiger Verabreichung des PCB-Gemisches Clophen A50 bei männlichen Sprague-Dawley Ratten einen 8-fach erhöhten, bei weiblichen Tieren nicht veränderten Mitose-Index. Nach 48 Stunden lag der Mitose-Index wieder auf Kontrollniveau. Diese initiale transiente Erhöhung der Zellproliferation konnte in der eigenen Untersuchung nicht nachvollzogen werden. Nach 1 Woche war der LI_{GES} sogar auf 84 % der Kontrollwerte reduziert. Allerdings stellt der LI infolge des ver-

wendeten Labelling-Protokolls eine Summation der innerhalb einer Woche markierte Kerne da, so daß auch in Betracht gezogen werden muß, daß es nach einem initialen Proliferationsanstieg zu einer Inhibition der Zellteilung gekommen sein kann. Daraufhin erfolgte ein Anstieg des LI_{GES} (auf das 1,4- bzw. 1,3-fache der Kontrollwerte nach 4 bzw. 13 Wochen). Diese Unterschiede zu den Kontrollen waren aber zu keinem Zeitpunkt von statistischer Signifikanz. Die Hauptproliferationszone war, den Kontrollen entsprechend, Zone 1.

5.7.4 Vergleich der Zellproliferation fokaler und extrafokaler Hepatozyten

Das Verhältnis zwischen LI_{GES} und LI_{CCF} betrug nach 1 und 4 Wochen 1:3,9 bzw. 3,8 und stieg nach 13 Wochen auf 1:4,7 an. Damit lag erst nach 13 Wochen ein höheres Verhältnis vor als bei den Kontrollen, wodurch die Annahme, daß die fokalen Hepatozyten der CCF erst bei längerer Applikation von PCB 126 auf dessen promovierende Eigenschaften reagieren, unterstützt wird.

5.8 Versuchsmodell

FAH entstehen durch Promotion, d. h. durch klonale Expansion initiiertes Hepatozyten. Die Initiation kann durch die Einwirkung unterschiedlicher Noxen (z. B. genotoxische Chemikalien oder radioaktive Strahlung) oder auch spontan durch Ablesefehler während der Replikation der DNA erfolgen (SCHULTE-HERMANN et al., 1985, FARBER und SARMA, 1987; BUTTERWORTH et al., 1992). Die Wirkung von Promotoren scheint vom Alter der Versuchstiere abhängig zu sein. Es existieren aber widersprüchliche Auffassungen darüber, ob alte oder junge Tiere auf die Applikation von Promotoren stärker reagieren. Verschiedene Autoren konnten in ihren Studien eine höhere Empfindlichkeit alter Ratten auf die promovierende Wirkung verschiedener nicht-genotoxischer Karzinogene feststellen. Die Ursache dafür sahen sie in der Promotion spontan initiiertes Hepatozyten. WARD (1983) verglich die Wirkung einer 150-tägigen Phenobarbital-Applikation auf 42 Tage und 875 alte F344/Ncr Ratten. Die jungen Ratten entwickelten keine FAH, die alten dagegen zeigten einen Anstieg in der Anzahl GGT-positiver und eosinophiler FAH. WARD und HENNEMANN (1990) beobachteten nach der Verabreichung von Phenobarbital ein schnelleres Entstehen von hepatozellulären Adenomen und Karzinomen bei alten Ratten als bei jungen Ratten. CATTLEY et al. (1991) stellten nach 22-wöchiger Applikation von Wyeth-14,643 an 2 und 15 Monate alte F344 Ratten keinen Unterschied im prozentualen Anteil tumortragender Tiere zwischen jungen und alten Tieren fest. Die alten Ratten wiesen aber 5-7 mal mehr Tumoren pro Leber und auch einen höheren Volumenanteil der homogen basophilen FAH auf als die jungen Tiere.

KRAUPP-GRASL et al. (1991) beschrieben eine höhere Empfänglichkeit alter Wistar Ratten auf die promovierende Effekte des Peroxisomenproliferators Nafenopin. Nach 13-monatiger Verabreichung an zu Versuchsbeginn 13 Wochen alte Ratten lag die Prävalenz an Karzinomen bei 35 % (Kontrolle 0 %), bei zu Versuchsbeginn 57 Wochen alte Ratten bei 90 % (Kontrolle 3 %). Nafenopin soll selektiv eine bestimmte Population an FAH (schwach basophile FAH) bei alten Ratten stärker als bei jungen Ratten promovieren. Im Gegensatz dazu führte in der gleichen Studie eine 13-monatige Verabreichung von Phenobarbital an alte Ratten weder zur Erhöhung in der FAH-Anzahl noch der FAH-Größe. XU et al. (1992) entdeckten, daß Ratten ab 1 Lebensjahr deutlich geringer auf die promovierenden Effekte von Phenobarbital reagieren. HASEGAWA et al. (1991) halten die Verwendung junger Ratten im Tierversuch für geeigneter, die promovierende Wirkung einer Substanz zu untersuchen. In einer Initiations-Promotions-Studie (8 Wochen Phenobarbital an F344 Ratten) konnten die Autoren einen stärkeren Anstieg in der FAH-Anzahl bei 6 Wochen alten als bei 46 Wochen alten Tieren feststellen.

Um die Wirkung der 5 Promotoren auf spontan initiierte Hepatozyten zu untersuchen, wurde für die vorliegende Studie eine Zuchtlinie eines Wistar Rattenstammes (Chbb: THOM) gewählt, dessen hohe Prävalenz spontan entstandener FAH bekannt ist (BASF Datenbank). Ein direkter Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Studien, in denen junge Ratten mit und ohne Initiation mit einem der hier verwendeten Promotoren behandelt worden sind, wird durch Unterschiede in Versuchsprotokoll (Dauer, Dosis und Art der Verabreichung), Tiermaterial (Rattenstamm, Alter, Geschlecht) und Auswertestrategie (Wahl der Meßparameter) erschwert. Zudem zeigten auch schon die in der Literatur ermittelten Ergebnisse z. T. erhebliche Differenzen. So beobachteten z. B. DEML und OESTERLE (1985, 1987) in einer Initiations-Promotions-Studie nach 11-wöchiger Verabreichung von Chloroform eine Vermehrung und Vergrößerung von FAH, PEREIRA et al. (1982) dagegen konnten keinen promovierenden Effekt von Chloroform feststellen. Der Großteil der mit den hier verwendeten Promotoren durchgeführten Initiations-Promotions-Studien erbrachte einen Anstieg in der FAH-Anzahl gegenüber den nur initiierten Tieren. In der eigenen Studie reichte die Betrachtung der Gesamt-FAH-Anzahl pro cm^2 Leberfläche nicht aus, um nach 13-wöchiger Applikation den promovierenden Effekt der Substanzen statistisch belegen zu können. Nur für Ethinylestradiol konnte eine statistisch signifikante Steigerung über Kontrollwerte (1,9-fach) bestimmt werden. Aber auch in den anderen Substanz-Gruppen (außer Phenobarbital) lag nach 13 Wochen eine durchschnittlich höhere FAH-Anzahl/ cm^2 vor als bei den Kontrollgruppen (Chloroform 1,3-fach, Wyeth-14,643 1,6-fach, PCB 126 1,3-fach). Der Grund für die Bewertung als nicht

signifikant ist z. T. sicherlich auf die hohe biologische Variabilität der Einzeltiere zurückzuführen, die trotz randomisierter Gruppenzusammenstellung schon bei der Betrachtung der 3 Kontrollgruppen deutlich wird. In Anbetracht des hohen Alters der Tiere (82-89 Wochen bei Versuchsbeginn) ist der Untersuchungszeitraum von 13 Wochen als unerheblich einzustufen. Entgegen der Erwartung ähnlicher Werte in den 3 Kontrollgruppen differierte die FAH-Anzahl/cm² zwischen 10,7 und 13,4 mit maximalen Werten nach 4 Wochen. Weiterhin ist es bei einer so hohen Ausgangszahl an FAH verständlich, daß eine eventuelle Erhöhung weniger deutlich wird als in Initiations-Promotions-Studien, in denen eine sehr viel geringere Ausgangszahl an FAH/cm² vorliegt. Eine weitere Ursache für die nicht deutliche Erhöhung der Gesamt-FAH-Anzahl könnte darin begründet sein, daß die Substanzen nur bestimmte FAH-Typen, nicht aber die in allen Gruppen den höchsten prozentualen Anteil ausmachenden CCF promovieren. Bei keiner Substanz konnte für CCF ein signifikanter Unterschied in der Anzahl pro cm² ermittelt werden. Allerdings war nach 13-wöchiger Verabreichung die Anzahl der CCF in allen Gruppen (bis auf die Phenobarbital-Gruppe) über die Kontrollwerte erhöht (Chloroform 1,4-fach, Wyeth-14,643 1,5-fach, Ethinylestradiol 1,7-fach, PCB 126 1,3-fach). Auch bei den CCF schwankte die Anzahl/cm² in den 3 Kontrollgruppen (zwischen 8,4 und 11,3). Der stetige Anstieg in der Anzahl an CCF/cm² während der Chloroform- und Ethinylestradiol-Applikation spricht für einen Substanzeffekt, der bei längerer Verabreichung oder größerer Tierzahl signifikante Unterschiede zu den Kontrollgruppen erwarten läßt. Eine Promotionswirkung der verschiedenen Substanzen wurde erst bei der Betrachtung der verschiedenen FAH-Typen deutlich. Signifikante Erhöhungen in der Anzahl/cm² im Vergleich zu den Kontrollgruppen wurden nach 13 Wochen für ECF in der Phenobarbital-Gruppe, für BCF in der Wyeth-14,643-Gruppe, für BCF und MCF in der Ethinylestradiol-Gruppe und für ECF in der PCB 126-Gruppe nachgewiesen. Überraschenderweise konnte bei keiner Substanz für keinen FAH-Typ trotz Erhöhung der Zellproliferationsrate und nicht veränderter Apoptose (Ausnahme Wyeth-14,643) ein Anstieg der durchschnittliche Zellzahl/FAH-Typ festgestellt werden. Auch dieser Parameter wurde durch die hohe biologische Variabilität der Einzeltiere beeinflusst, die sich in den zwischen den 3 Kontrollgruppen differierenden Werten äußert. Besonders auffällig ist die große Variabilität bei BCF und MCF. Innerhalb dieser FAH-Typen kamen Einzeltierwerte von 55 bis 5700 Zellen/FAH-Querschnitt vor. In Betracht zu ziehen ist die Auswahl eines für die Beurteilung so großer FAH ungeeigneten Parameters. Bei der Bewertung der durchschnittlichen Größe der FAH mittels des Parameters Zellzahl/FAH-Querschnitt ist zu bedenken, daß die Zellzahl eines einzelnen FAH von der äquatorialen zur polaren Schnittebene abnimmt. Ein FAH-Querschnitt mit einer geringen Zellzahl kann den

Anschnitt eines großen FAH darstellen. Große FAH werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit angeschnitten als kleine. Ausgehend von einer gleichmäßigen Verteilung der FAH über die Leber können die ermittelten Werte aber als repräsentativ angesehen werden. Weiterhin nimmt die Anzahl der sich potentiell pro cm^2 Leberfläche befindlichen FAH mit zunehmender Größe ab. Interessant wäre daher die Ermittlung - dem Volumenanteil (prozentualer Anteil des durch FAH eingenommenen Lebergewebes) entsprechend- des prozentualen Anteils der fokalen Zellen an der Gesamtzellzahl der Leber. Die meisten Rechenmodelle, in denen eine Umrechnung von einem zweidimensionalen in einen dreidimensionalen Faktor erfolgt, basieren auf der Bestimmung des Durchmessers der FAH (SALTIKOV, 1967; CAMPBELL et al., 1982; PUGH et al., 1983, MOOLGAVKAR et al., 1990), der in unserer Studie nicht ermittelt wurde. Zudem wäre solch ein Parameter auch kritisch zu beurteilen, da die Umrechnung unter der Annahme einer kugelförmigen Form der FAH erfolgt (PUGH et al., 1983), die ab einer bestimmten Größe nicht mehr gewährleistet ist.

Bei den ermittelten Größen handelt es sich um Durchschnittswerte. Eine mögliche Erklärung für die nicht nachweisbare Vergrößerung der FAH könnte in der Entstehung neuer kleiner FAH liegen, wodurch der Durchschnittswert trotz Vergrößerung der schon existenten FAH konstant bleibt. Aber auch die Ermittlung von Größenklassen (s. 4.1.4.4) brachte keine Erklärung. Schon die Kontrollgruppen zeigten zu den 3 Untersuchungszeitpunkten große Unterschiede in dem Anteil der FAH an bestimmten Größenklassen, so daß die Ermittlung für die Substanzgruppen als nicht sinnvoll erachtet wurde.

Für keine der Substanzen konnte, unabhängig vom FAH-Typ, eine Inhibition der Apoptose als Mechanismus der Promotion festgestellt werden. Bei extrem niedrigen Kontrollwerten (max. 0,023 %) mit gleichzeitig sehr hohen Streufaktoren sind Substanzeffekte schwer zu ermitteln. Die Bestimmung des AI mittels Zählung der Apoptotischen Körperchen im HE-Schnitt stellt eine Momentaufnahme dar, da das in der HE-Färbung sichtbare Stadium der Apoptose in der Leber nur ca. 3 Stunden umfaßt (BURSCH et al., 1990). Eine Methode zur kumulativen Messung von Apoptosen über längere Zeiträume, mit der höhere und damit aussagekräftigere Werte erreicht würden, existiert nicht.

5.9 Vergleich der fünf Promotoren

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung 5 verschiedener Promotoren auf die Leber alter Ratten untersucht. Der Einteilung von BUTTERWORTH (1990) entsprechend wird Chloroform den zytotoxisch wirkenden, die 4 anderen Promotoren den mitogen wirkenden nicht-genotoxischen Karzinogenen zugeordnet.

Ein Merkmal der mitogen wirkenden nicht-genotoxischen Karzinogene ist eine auf einer Hypertrophie und/oder Hyperplasie beruhende Erhöhung des Lebergewichts. Eine Hypertrophie der Hepatozyten konnte während der gesamten Applikationsdauer in den Lebern der mit Phenobarbital und Wyeth-14,643 behandelten Tieren festgestellt werden. Die stärkste Steigerung sowohl des relativen als auch des absoluten Lebergewichts verursachte die Verabreichung von Wyeth-14,643 (relatives Lebergewicht 1,4- bis 1,6-fach, absolutes Lebergewicht 1,3- bis 1,4-fach). Erst nach der 13-wöchigen Verabreichung von PCB 126 fand sich eine signifikante Erhöhung des relativen Lebergewichts, die auch mit der Steigerung des absoluten Lebergewichts einher ging (je 1,2-fach). Das relative Lebergewicht nach Phenobarbital-Gabe war nach 1 und 13 Wochen ca. 1,2-fach erhöht. Der 1,2- und 1,4-fache Anstieg nach 4 und 13 Wochen in der Ethinylestradiol-Gruppe war allerdings durch eine Verringerung des Körpergewichts auf 83 % und 74 % bedingt. Ebenfalls Folge eines im Verlaufe der Applikation von Chloroform abnehmenden Körpergewichts war bei relativ konstant bleibendem absoluten Lebergewicht die 1,1 und 1,2-fache Erhöhung des relativen Lebergewichts nach 1 und 13 Wochen. Die Verabreichung von Chloroform hatte eine deutliche zytotoxische Wirkung auf die Leber, die auf Zone 3 des Leberläppchens beschränkt war. Aber auch die histologischen Befunde nach Wyeth-14,643- (hämorrhagische Nekrosen), Ethinylestradiol- (Umstrukturierung der Leber in Zone 1 mit weiten Sinusoiden, sich aus dem Zellverband lösenden Hepatozyten und Degeneration von Hepatozyten) und PCB 126-Applikation (hepatozelluläre Verfettung) wiesen auf zytotoxische Effekte dieser Substanzen hin.

Die extrafokalen Hepatozyten zeigten auf die Verabreichung der Promotoren ein unterschiedliches Zellproliferationsverhalten. Eine Gemeinsamkeit der Substanzen (mit Ausnahme von PCB 126) bestand in einer initialen Steigerung und einem darauffolgenden Abfall des Labeling-Index. Die höchste Steigerung über die Kontrollwerte bewirkte die Gabe von Wyeth-14,643 (14,2-fach), gefolgt von Chloroform (6,6-fach), Ethinylestradiol (3,6-fach) und Phenobarbital (2-fach). Der LI fiel in der Phenobarbital-Gruppe auf Kontrollniveau, in der Wyeth-14,643- und in der Chloroform-Gruppe auf einen weiterhin relativ konstant erhöhten Wert (Wyeth-14,643 7,7- bis 7,9-fach, Chloroform 4,4- bis 4,7-fach). Ethinylestradiol war die einzige Substanz, nach deren Applikation ein erneuter Anstieg des LI nach 13 Wochen auf einen Wert, der über dem LI nach 1 Woche lag, beobachtet werden konnte (vom 2,8-fachen der Kontrollwerte nach 4 Wochen auf das 4,3-fache). Ein grundsätzlich anderer Verlauf ergab sich nach der Gabe von PCB 126. Der LI war nach 1 Woche auf 86 % reduziert und stieg dann auf das 1,4- bzw. 1,3-fache der Kontrollwerte an.

Weitere Unterschiede zwischen den fünf Substanzen bestanden in der Promotion verschiedener FAH-Typen. Unter Phenobarbital-Behandlung kam es zu einer merklichen Promotion der ECF, die schon nach 1 Woche auffiel und sich in einer Erhöhung der Anzahl/cm² über die Zeit (0,5, 1 und 2,2 nach 1, 4 und 13 Wochen) und in einem hohen LI_{ECF} äußerte. In den Kontrollgruppen trat nach 1 und 4 Wochen je nur 1 ECF auf (Zellzahl/ECF-Querschnitt: 191 und 95, LI: 11 % und 0 %), so daß der Vergleich mit den Substanzgruppen wenig aussagekräftig ist. Der Vergleich mit CCF erbrachte eine höhere durchschnittliche Zellzahl/FAH-Querschnitt (1,5- bis 2,4-fach) und einen höheren LI (1,2- bis 1,7-fach) in ECF. Der LI in ECF zeigte aber mit einem initialen Peak und einem darauffolgenden Abfall einen ähnlichen Verlauf wie der LI_{CCF} und der LI_{GES}, was darauf hinweist, daß ECF trotz höherer Zellproliferationsrate den gleichen Wachstumskontrollmechanismen unterstehen wie CCF und extrafokale Hepatozyten. Ob die Promotionswirkung von Phenobarbital auf ECF auch auf einer Inhibition der Apoptose beruht, kann aufgrund der geringen Anzahl der ECF in den Kontrollgruppen (AI 0 %) schwer beurteilt werden. Der AI in ECF der Phenobarbital-Gruppe wich aber nicht von dem der CCF ab. Die Tatsache, daß sich die Anzahl/cm² der ECF bei gleichzeitiger Verringerung der CCF erhöhte, spricht für eine phänotypische Transformation der CCF zu ECF. Auch PCB 126 schien, wenn auch in geringerem Ausmaß als Phenobarbital, ECF zu promovieren. Erst nach 13-wöchiger Verabreichung trat eine gegenüber der Anzahl/cm² nach 1 und 4 Wochen (0,2 und 0,1) signifikant erhöhte Anzahl an ECF/cm² auf (0,3). Die gegenüber den anderen Untersuchungszeitpunkten höhere Zellzahl/ECF-Querschnitt nach 13 Wochen (23, 13 und 51 Zellen nach 1, 4 und 13 Wochen) spricht, anders als nach Phenobarbital-Verabreichung, für eine Entstehung der ECF de novo unter PCB 126-Behandlung. Die Werte nach 1 und 4 Wochen sind aber vorsichtig zu beurteilen, da nur 5 bzw. 2 Tiere ECF aufwiesen. Entsprechend muß der kontinuierliche Anstieg des LI in ECF während der PCB 126-Applikation (0,3 %, 0,97 %, 4,76 %) betrachtet werden.

BCF wurden unter Wyeth-14,643- und Ethinylestradiol-Gabe in Form einer Erhöhung der Anzahl/cm² und einer Steigerung des LI promoviert. Die BCF der beiden Gruppen unterschieden sich aber in ihrer Morphologie und zeigten auch ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Die Steigerung in der Anzahl/cm² nach Wyeth-14,643-Applikation stagnierte nach 4 Wochen und blieb mit 1,8/cm² konstant 3-fach über Kontrollwerten. Diese Entwicklung ging einher mit einem initialen 12-fachen Anstieg des LI und einem darauffolgenden Abfall auf das 4,1- und 2,7-fache der Kontrollwerte. Unter Ethinylestradiol-Promotion erhöhte sich dagegen die Anzahl der BCF/cm² stetig, so daß nach 13 Wochen das 4,5-fache der Kontrollen erreicht war. Der LI fiel nach einer initialen 9,5-fachen Steigerung auf das 3,4-fache nach 4

Wochen und stieg nach 13 Wochen erneut auf das 4,3-fache der Kontrollen an. Eine Gemeinsamkeit in der Wirkung beider Substanzen auf das Zellproliferationsverhalten der BCF bestand insofern, als der Verlauf des LI während der Applikation in der Tendenz der Entwicklung des jeweiligen LI im extrafokalen Lebergewebe und in CCF entsprach. Wie auch die Hepatozyten der CCF reagierten die Hepatozyten der BCF auf die Wyeth-14,643-Applikation geringer, auf die Ethinylestradiol-Gabe stärker als die extrafokalen Hepatozyten (Verhältnis LI_{GES} zu LI_{BCF} in den Kontrollgruppen: zwischen 1:2,8 nach 1 Woche und 1:4,9 nach 13 Wochen; in den Wyeth-14,643-Gruppen: 1:1,8-2,2; in den Ethinylestradio-Gruppen: 1:5,3-7,4). BCF sollen ein höheres karzinogenes Potential besitzen als CCF (BANNASCH, 1986, MOORE et al. 1982, ENZMANN und BANNASCH, 1987; WEBER und BANNASCH, 1994). Ein Hinweis dafür könnte in dieser Studie in dem höheren LI in BCF als in CCF nach einwöchiger Verabreichung bestehen (Wyeth-14,643: 1,3-fach, Ethinylestradiol 1,7-fach). Nach 4 und 13 Wochen lagen die absoluten LI der BCF im Bereich der CCF. Dieses Verhalten war auch bei den BCF unter Chloroform-Applikation zu beobachten. Auch nach der Verabreichung von Chloroform steigerte sich die Anzahl an BCF/cm², der 1,9-fache Anstieg nach 13 Wochen war allerdings nicht von statistischer Signifikanz.

Die Inhibition der Apoptose schien bei der Promotion der BCF durch Wyeth-14,643, Ethinylestradiol und Chloroform keine Rolle zu spielen. Die Verabreichung von Wyeth-14,643 führte sogar zu einer - wenn auch statistisch nicht signifikanten - 4-fachen Erhöhung des Apoptose-Index nach 13 Wochen.

Unter Ethinylestradiol-Applikation wurde mit MCF noch ein weiterer FAH-Typ promoviert. Während der Applikation kam es zu einem stetigen Anstieg in der Anzahl/cm² (3,4- und 7,9-fach nach 4 und 13 Wochen). Das Zellproliferationsverhalten der MCF wich während der Ethinylestradiol-Behandlung mit einer kontinuierlichen Erhöhung des LI (23,17 %, 28,11 %, 36,06 %) von dem Verlauf des LI_{GES} und dem LI der anderen FAH mit einem Abfall nach einer initialen Anstieg und einem darauffolgenden wiederholten Anstieg ab. Diese Abweichung könnte als zunehmende Unabhängigkeit von Wachstumskontrollmechanismen interpretiert werden.

Für die Zellzahl/BCF- und MCF-Querschnitt konnten über die Zeit keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden, die durchschnittliche Größe der beiden FAH-Typen lag aber immer, wie auch bei den Kontrollen, über der der CCF.

CCF machten in allen Gruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten den größten Anteil der Gesamtheit der FAH aus. Keine Substanz schien aber CCF deutlich zu promovieren. Die Anzahl an CCF pro cm² Leberfläche lag in keiner Substanz-Gruppe statistisch signifikant über Kon-

trollwerten, der stetige Anstieg über den Zeitverlauf nach Chloroform- und Ethinylestradiol-Applikation ließ aber einen Substanzeffekt vermuten. Weiterhin konnte in keiner Gruppe ein Anstieg in der durchschnittlichen Zellzahl/CCF-Querschnitt ermittelt werden. Andererseits war der LI in CCF nach Chloroform-, Wyeth-14,643- und Ethinylestradiol-Behandlung dauerhaft über den LI der CCF der Kontrollen erhöht. Dabei wurde die höchste Steigerung nach Wyeth-14,643-Applikation beobachtet. Der LI in CCF überstieg in allen Gruppen den LI des extrafokalen Lebergewebes (LI_{GES}), wobei der Verlauf über die Zeit sich annäherungsweise parallel zeigte. In den Kontrollgruppen lag das Verhältnis LI_{GES} zu LI_{CCF} bei 1:3,3-3,9. Ein ähnliches Verhältnis fand sich nach Phenobarbital-Applikation, ein größeres Verhältnis nach Ethinylestradiol- (1:4,2-5,1), ein kleineres Verhältnis nach Chloroform- und Wyeth-14,643-Gabe (1:1,5-1,8 bzw. 1:1,8-2,2). Nach PCB 126-Applikation lag das Verhältnis LI_{GES} zu LI_{CCF} nach 13 Wochen über dem der Kontrollen (1:4,7). Es kann also nicht verallgemeinert werden, daß fokale Zellen stärker als extrafokale Hepatozyten auf die zellproliferationssteigernde Wirkung von Promotoren reagieren. Eine stärkere Reaktion wiesen die fokalen Hepatozyten der CCF nur nach Ethinylestradiol- und 13-wöchiger PCB 126-Gabe auf. Die Hemmung der Apoptose als promovierender Mechanismus konnte in keiner Gruppe beobachtet werden. Wyeth-14,643 war die einzige der untersuchten Substanzen, die sogar eine Steigerung des Apoptose-Index in CCF verursachte.

In allen Gruppen wurde ein FAH-Typ identifiziert, der eine GST-P-Expression aufwies, im HE-Schnitt aber aufgrund fehlender morphologischer und tinktorieller Abweichungen nicht vom Umgebungsgewebe abgegrenzt werden konnte (NAH = nicht abgrenzbare Herde). Der Anteil der NAH an der Gesamt-FAH-Anzahl lag zwischen 3 % und 10 %. Die in den Kontrollgruppen vorliegenden NAH zeichneten sich durch eine geringere Zellzahl als die CCF und eine geringe Zellumsatzrate, d. h. einen teilweise kleineren LI als der LI_{GES} (57 % bis 168 % des LI_{GES}) und einen AI von 0 %, aus. Auch nach Substanzapplikation (Chloroform-, Wyeth-14,643- und Ethinylestradiol) lag der LI_{NAH} immer unter dem LI_{CCF} . Diese Befunde sprechen für ein geringes karzinogenes Potential der NAH, so daß vermutet werden könnte, daß es sich bei den NAH um einen Vorläufer der glykogenspeichernden CCF und ECF handelt, die im Rahmen der Promotion sichtbar werden. Die gleichbleibende durchschnittliche Größe und Anzahl ließe sich durch die Neuentstehung von NAH bei gleichzeitiger Transformation schon bestehender NAH zu anderen FAH-Typen erklären. Andererseits wurden keine Übergangsformen beobachtet, so daß es wahrscheinlicher ist, daß NAH einen eigenständigen, stabilen FAH-Typ darstellen, der durch die Promotoren kaum beeinflusst wurde.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die promovierende Wirkung der 5 Substanzen während der 13-wöchigen Applikation nur bei der gesonderten Untersuchung der verschiedenen FAH-Typen festgestellt werden konnte. Dabei schien bei allen Substanzen bis auf PCB 126 die Steigerung der Zellproliferation am deutlichsten die promovierenden Effekte der Substanzen widerzuspiegeln.

5.10 Zonale Proliferationsmuster und der Einfluß der extrafokalen Zellproliferation auf die Promotion von FAH

Die 5 Promotoren verursachten im extrafokalen Lebergewebe verschiedene Proliferationsmuster, die sich aus der Lokalisation und der Stärke der Zellproliferationssteigerung sowie deren Veränderungen über die Zeit ergaben. Als Hauptproliferationszone konnte während der gesamten Phenobarbital-Verabreichung Zone 3 (6,8-, 3,4- und 3,1-faches der Kontrollen nach 1, 4 und 13 Wochen) bei gleichzeitiger Hemmung der Zellproliferation in Zone 1 ausgemacht werden. Die Verschiebung der Hauptproliferationszone von Zone 1 zu Zone 3 unter Chloroform-Behandlung war typisch für zytotoxische Substanzen (LEE et al., 1998). Während der Verabreichung von Wyeth-14,643, Ethinylestradiol und PCB 126 wurden die höchsten LI in Zone 1 gemessen, wobei sich die Substanz-Gruppen in der Höhe des LI_{Z1} und in dessen Verlauf unterschieden. Die drei Wyeth-14,643-Gruppen zeigten im Vergleich zu den beiden anderen Substanzen den höchsten LI_{Z1} . Nach einer initialen starken Erhöhung fiel der LI_{Z1} ab (41,42 %, 18,63 %, 15,95 %). Unter Ethinylestradiol-Applikation stieg der LI_{Z1} nach einer initialen Erhöhung und darauffolgendem Abfall nach 13 Wochen erneut an (9,26 %, 4,51 %, 8,18 %). Einen gänzlich anderen Verlauf zeigte mit einem stetigen Anstieg der LI_{Z1} während der PCB 126-Behandlung (1,81 %, 2,42 %, 3,13 %). In den meisten Fällen wies die Zone mit dem absolut höchsten LI auch die stärkste Steigerung über Kontrollwerte auf. Ausnahmen davon waren infolge sehr niedriger Kontrollwerte die höchsten Steigerungen in Zone 2 nach der 13-wöchigen Wyeth-14,643- und während der gesamten Ethinylestradiol-Applikation.

Es scheint ein Zusammenhang zwischen der Steigerung der Zellproliferation und der Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens zu existieren. Unter Phenobarbital-Gabe war die Zellproliferation im extrafokalen Lebergewebe zu jedem Untersuchungszeitpunkt in Zone 3 erhöht. Hauptlokalisationszone der FAH war wie bei den Kontrollen Zone 2, im Laufe der Verabreichung konnte aber eine Tendenz einer Verschiebung zu Zone 3 ausgemacht werden. Unterstützt wird diese Annahme durch die Erhöhung des Anteils der FAH in Zone 3 nach 13-wöchiger Verabreichung von Chloroform in Verbindung mit einer Verschiebung der Hauptproliferationszone von Zone 1 zu Zone 3. Nach der Behandlung mit Wyeth-14,643 ging

die dauerhaft starke Steigerung der Zellproliferation in Zone 1 mit einer Verschiebung der Hauptlokalisationszone der FAH von Zone 2 zu Zone 1 nach 4 Wochen einher. Nach der Verabreichung von Ethinylestradiol stellte Zone 1 die Hauptproliferationszone und Hauptlokalisationszone der FAH dar.

5.11 Bedeutung der GST-P-Expression

Die alleinige Verwendung von GST-P als Marker war nicht ausreichend, die bei alten Wistar Ratten spontan entstandenen FAH aufzudecken. Nur 22 % bis 28 % aller FAH der 3 Kontrollgruppen exprimierten GST-P. Auch nach Verabreichung der fünf Promotoren wurden maximal 44 % (nach 4-wöchiger Phenobarbital-Gabe) aller FAH durch GST-P aufgedeckt. Da GST-P-negative FAH den größten Anteil ausmachten, repräsentierten die Resultate der alleinigen Betrachtung der GST-P-positiven FAH nicht immer das Gesamtergebnis. Es konnte keine allgemeingültige Aussage über das Verhältnis der LI der GST-P-positiven zu den GST-P-negativen FAH getroffen werden. In manchen Fällen lag der LI in GST-P-positiven FAH höher (z. B. in CCF nach einwöchiger Phenobarbital-Applikation), in anderen Fällen niedriger (z. B. in ECF nach einwöchiger Phenobarbital-Verabreichung). Ebenso zeigten sich Unterschiede in der Entwicklung des LI während der Applikation. So fiel z. B. der LI in GST-P-positiven CCF nach der 13-wöchigen Gabe von Ethinylestradiol auf das 3,7-fache der Kontrollwerte, während der LI in GST-P-negativen CCF einen erneuten Anstieg auf das 6,5-fache der Kontrollwerte durchmachte. Die Erhöhung in der Anzahl der ECF/cm² nach Phenobarbital- und PCB 126-Behandlung beruhte auf der Promotion der GST-P-positiven ECF, die alleinige Betrachtung der GST-P-positiven FAH hätte aber nicht den promovierenden Effekt von Wyeth-14,643 auf BCF und Ethinylestradiol auf BCF und MCF aufgedeckt. Deutliche Unterschiede zwischen GST-P-positiven und -negativen CCF bestanden weiterhin in der Lokalisation innerhalb des Leberläppchens. Bei den Kontrolltieren lag ein höherer prozentualer Anteil der GST-P-positiven CCF in Zone 3 als in Zone 1 (32 % bis 38 % zu 4 % bis 8 %), für GST-P-negative CCF herrschten umgekehrte Verhältnisse (6 % bis 16 % zu 28 % bis 34 %). Durch die Substanzapplikation wurde diese Verteilung teilweise beeinflusst, deutliche Unterschiede zwischen GST-P-positiven und -negativen CCF blieben aber bestehen. Zu einer Umkehr der Verteilung kam es bei GST-P-negativen CCF nach 13-wöchiger Chloroform-Verabreichung (Zone 3: 32 %, Zone 1: 25 %) und bei GST-P-positiven CCF nach 13-wöchiger Wyeth-14,643-Applikation (Zone 1: 44 %, Zone 3: 9 %).

Es besteht kein Hinweis auf ein höheres Potential der GST-P-positiven FAH zur malignen Transformation. Da sie nicht immer das Gesamtergebnis repräsentierten, sollte sich die Ana-

lyse von FAH nicht auf die alleinige Untersuchung von GST-P-positiven FAH beschränken, sondern als Kombination immunhistochemischer Methoden mit der HE-Diagnostik erfolgen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Einfluß fünf verschiedener nicht-genotoxischer Karzinogene auf das Wachstum spontan entstandener präneoplastischer Herde (FAH = "foci of altered hepatocytes") in der Leber ca. 2 Jahre alter Wistar Ratten wurde untersucht. Die verwendeten nicht-genotoxischen Karzinogene stellen bekannte, über verschiedene Mechanismen wirkende Lebertumor-Promotoren dar: Phenobarbital, Chloroform, Wyeth-14,643, Ethinylestradiol und PCB 126. Die Lebertumor-Promotoren wurden in karzinogener Dosis über 1, 4 und 13 Wochen verabreicht. Daneben wurde die Auswirkung der Substanzapplikation auf die extrafokale Proliferation analysiert.

2. Als Meßparameter für die Quantifizierung des Wachstums der FAH dienten die Anzahl pro cm^2 Leberfläche, die durchschnittliche Größe (Zellzahl/FAH-Querschnitt), die Zellproliferationsrate (Labelling-Index) und der Apoptose-Index unter Berücksichtigung der verschiedenen FAH-Typen. Die Messung der extrafokalen Proliferation wurde nach der LZM („lobule dependent zonal measurement“)-Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) durchgeführt.

3. Die Identifizierung und Klassifizierung der FAH erfolgte anhand morphologischer Kriterien in der HE-Färbung in Kombination mit dem immunhistologischen Nachweis der GST-P-Expression. Der Labelling-Index wurde durch immunhistochemischen Nachweis von in die DNA der Leberzellkerne eingebauten BrdU ermittelt. BrdU wurde über eine subkutane Minipumpe 7 Tage lang appliziert. Der Apoptose-Index wurde durch Zählung der apoptotischen Körperchen in der HE-Färbung bestimmt.

4. Die Prävalenz von FAH lag in allen Gruppen bei 100 %. Bei den drei Kontrollgruppen waren 84 % bis 89 % der gefundenen FAH CCF. Der Anteil an BCF und NAH betrug 4 % bis 8 %.

5. Eine statistisch gesicherte Promotionswirkung der Substanzen in Form einer Steigerung der Gesamt-FAH-Anzahl/ cm^2 wurde nur für Ethinylestradiol deutlich. Bei differenzierter Betrachtung der verschiedenen FAH-Typen äußerten sich die promovierenden Eigenschaften in der Erhöhung der Anzahl bestimmter FAH-Typen pro cm^2 Leberfläche (Phenobarbital und PCB 126: ECF, Wyeth-14,643: BCF, Ethinylestradiol: BCF und MCF). Damit wurden in al-

ten Ratten durch Phenobarbital, Wyeth-14,643 und PCB 126 die auch in Initiations-Promotions-Protokollen beschriebenen FAH-Typen promoviert.

6. Den deutlichsten Hinweis auf die Promotionswirkung der Substanzen erbrachte im Vergleich zu den anderen Parametern die Steigerung des LI innerhalb der FAH. Alle Substanzen bis auf PCB 126 verursachten einen initialen transienten Anstieg des LI in CCF (Wyeth-14,643: 7,8-fach, Ethinylestradiol: 4,6-fach, Chloroform: 3-fach, Phenobarbital: 1,9-fach) mit nachfolgendem Abfall. Unter der Chloroform-, Wyeth-14,643- und Ethinylestradiol-Behandlung konnte eine dauerhafte Steigerung des LI in CCF ermittelt werden. BCF wiesen als FAH-Typ mit einem höheren Potential zur malignen Transformation nach der einwöchigen Verabreichung der Substanzen (bis auf Phenobarbital) einen höheren LI auf als CCF.

7. Der LI innerhalb von FAH (mit Ausnahme von NAH) lag immer über dem des extrafokalen Lebergewebes. Dabei zeigte der Verlauf des LI während der Applikation in CCF immer, in den anderen FAH-Typen meist in der Tendenz Parallelen zwischen FAH und dem extrafokalen Lebergewebe. Die fokalen Hepatozyten schienen nach Phenobarbital-Applikation in gleichem Maße, nach Ethinylestradiol- und 13wöchiger PCB-126-Verabreichung stärker, nach Chloroform und Wyeth-14,643-Gabe geringer als die extrafokalen Hepatozyten auf die zellproliferationssteigernden Eigenschaften der Substanzen zu reagieren.

8. Die Inhibition der Apoptose in FAH als Mechanismus der Promotion konnte in keiner Gruppe nachvollzogen werden.

9. Die fünf Substanzen riefen unterschiedliche Proliferationsmuster im extrafokalen Lebergewebe hervor. Der Zusammenhang zwischen Hauptproliferationszone des extrafokalen Lebergewebes und der Lokalisation der FAH innerhalb des Leberläppchens bei vier der fünf Substanzen spricht für einen Einfluß der extrafokalen Proliferation auf die Promotion von FAH.

7 SUMMARY

1. The aim of the investigation was the analysis of the impact of five different non-genotoxic carcinogens on the growth of spontaneously developed foci of altered hepatocytes (FAH) in the liver of old male Wistar rats (81-89 weeks). The chosen compounds represent well-known liver tumor promoters working through different mechanisms: phenobarbital, chloroform, Wyeth-14,643, ethinylestradiol and PCB 126. The rats were treated consecutively for 1, 4 and 13 weeks at doses which produce liver tumors after long term administration. Additionally, the effect of the substance application on cell proliferation in extrafocal rat liver tissue was analysed.
2. The number of FAH/cm², the average size of FAH (cell number/FAH-cross section), the labelling index (LI %) and the apoptotic index (AI %) were measured considering the different FAH-types for quantifying the growth of FAH. Cell proliferation in extrafocal hepatocytes was measured using the LZM-method (lobule zonal measurement) described by BAHNEMANN and MELLERT (1997).
3. FAH were identified and classified by histomorphological criteria (H&E) in combination with immunohistological detection of GST-P. The labelling index was determined in hepatocytes immunohistochemically by BrdU staining after implanting a 7-day osmotic minipump. The apoptotic index was established by counting the apoptotic bodies (H&E).
4. All animals investigated showed FAH. Clear cell foci (CCF) were the most frequent type of lesion (84-89 %) in the 3 control groups. Additionally, basophilic cell foci (BCF) and NAH were observed (4-8%). NAH are characterised by positive GST-P staining, but cannot be seen in H&E slides.
5. Only after application of ethinylestradiol a statistically significant promoting effect in form of an increase in the total number of FAH/cm² has been observed. On closer inspection of the different FAH-types a promoting effect was shown in an increase in the number of special FAH-types/cm² (phenobarbital and PCB 126: ECF (eosinophilic cell foci), Wyeth-14,643: BCF, ethinylestradiol: BCF and MCF (mixed cell foci)). Thus phenobarbital, Wyeth-14,643 and PCB 126 promoted in old rats the same FAH-types described in initiations-promotions-studies.

6. With regard to the evaluated parameters the increase in cell proliferation exhibited the strongest clue to the promoting activity of the compounds. With the exception of PCB 126 all substances caused a peak in cell proliferation in CCF (Wyeth-14,643: 7.8-fold, ethinylestradiol: 4.6-fold, chloroform: 3-fold, phenobarbital 1.9-fold) after 1 week followed by a decrease. The CCF in animals treated with chloroform, Wyeth-14,643 and ethinylestradiol showed a sustained increase in cell proliferation for 13 weeks. BCF, that represent advanced preneoplastic lesions in the carcinogenic process with a high potential for malignant transformation, exhibited a higher LI than CCF after 1 week of administration in all substance groups (except of the Phenobarbital group).
7. The LI in FAH (with exception of NAH) exceeded the extrafocal LI at all time points of investigation. The course of the LI during the application showed parallels in tendency between CCF and the extrafocal liver tissue generally and for the other FAH-types in most cases. The focal hepatocytes seemed to react to the same extent as the extrafocal hepatocytes to the cell proliferation increasing effects of phenobarbital-, disproportionally strong to ethinylestradiol- and PCB 126-administration (only after 13 week administration) and, to a somewhat lesser degree, to chloroform- and Wyeth-14,643-administration.
8. An inhibition of the apoptotic process in FAH as promoting mechanism has not been observed.
9. The five compounds caused different pattern of cell proliferation in extrafocal liver tissue. The association between zonal predominance of extrafocal cell proliferation and zonal localisation of FAH after treatment reflected the influence of extrafocal cell proliferation for the promotion of FAH by 4 of the 5 substances tested.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ABANOBI, S. E.; LOMBARDI, B.; SHINOZUKA, H. (1982):
Stimulation of DNA synthesis and cell proliferation in the liver of rats fed choline -devoid diet and their suppression by Phenobarbital.
Cancer Research 42: 412-415
- AMES, B. N.; SHIGENANA, M. K.; GOLD, L. S. (1993):
DNA-lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis.
Environmental Health Perspectives 101 (Suppl 5): 35 -44
- ALISON, M. R.; SARRAF, C. E. (1995):
Apoptosis: Regulation and relevance to toxicology.
Hum. Exp. Toxicol. 14: 234-247
- ALISON, M. R.; CHAUDRY, Z.; BAKER, J.; LAUDER, I.; PRINGLE, H. (1994):
Liver regeneration: a comparison of in situ hybridisation for histone mRNA with bromodeoxyuridine labelling for detection of S-phase cells.
J. Histochem. Cytochem. 42: 1603-1608
- ANDERSON, D.; STYLES, J. A. (1978):
The bacterial mutation test.
Br. J. Cancer 37: 924-930
- BAGER, Y.; KENNE, K.; KRUTOVSKIKH, V.; MESNIL, M.; TRAUB, O.; WÄRNGARD, L. (1994):
Alteration in expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumour promoter 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl.
Carcinogenesis 15: 2439-2443
- BAGER, Y.; KATO, Y.; KENNE, K.; WÄRNGARD, L. (1997):
The ability to alter the gap junction protein expression outside GST -P positive foci in liver of rats was associated to the tumour promotion potency of different polychlorinated biphenyls.
Chem. Biol. Interact. 103: 199-212
- BAHNEMANN, R.; MELLERT, W. (1997):
Lobule-dependent zonal measurement (LZM) method for the determination of cell proliferation in the liver.
Exp. Toxic. Pathol. 49: 189-196
- BAHNEMANN, R. (2000):
Cell proliferation in the liver: a malpractice not to measure it? Comparison of the lobule -dependent zonal measurement method with the common method of randomly distributed measurement fields.
Tox. Methods 10: 81-97
- BANDIERA, S.; SAFE, S.; OKEY, A. B. (1982):
Binding of polychlorinated biphenyls classified as either phenobarbitone -, 3-methylchloanthrene- or mixed-type inducers to cytosolic Ah receptor.
Chem. Biol. Interact. 39: 259-277

BANNASCH, P. (1968):

The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis: Light and electron microscopic investigations of the nitrosomorpholine-intoxicated rat liver.
Cancer Research 19: 1-100

BANNASCH, P. (1986):

Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia.
Carcinogenesis 7: 689-695

BANNASCH, P.; ENZMANN, H.; KLIMEK, F.; WEBER, E.; ZERBAN, H. (1989):

Significance of sequential cellular changes inside and outside foci of altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis.
Toxicologic Pathology 17: 617-628

BANNASCH, P.; ZERBAN, H. (1994):

Preneoplastic and neoplastic lesions of the rat liver.
In: BANNASCH, P.; GÖSSNER, W: Pathology of neoplasia and preneoplasia in rodents.
Schattauer, Stuttgart: 18-62

BARBASON, H.; RASSENFOSSE, D.; BETZ, E. H. (1983):

Promotion mechanism of phenobarbital and partial hepatectomy in DENA hepatocarcinogenesis cell kinetics effect.
Br. J. Cancer 47: 517-525

BAYLY, A. C.; ROBERTS, R. A.; DIVE, C. (1994):

Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator, nafenopin.
J. Cell Biol. 125: 197-203

BENET, L. Z.; SHEINER, L. B. (1985):

Design and optimization of dosage regimes: pharmacokinetic data.
Br. J. Clin. Pharmacol. 15: 71-76

BENTLEY, P.; CALDER, I.; ELCOMBE, E.; GRASSO, P.; STRINGER, D.; WIEGAND, H. J. (1993):

Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance to humans.
Food Chem. Toxicol. 31: 857-907

BERENBLUM, I.; SHUBIK, P. (1947):

A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin.
Br. J. Cancer 1: 383-391

BLAZEY, B. (2001):

Darstellung apoptotischer und nekrotischer Rattenhepatozyten im Gewebeschnitt nach verschiedenen Fixierungsverfahren mittels verschiedener Nachweismethoden.
Diss. Vet. med., Giessen

BRADLEY, M. O. (1985):

Measurement of DNA single-strand breaks by alkaline elution in rat hepatocytes.
Prog. Mutat. Research 5: 353-357

- BRALET, M. P.; BRANCHEREAU, L.; BRECHOT, C.; FERRY, N. (1994):
Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver.
Am. J. Pathol. 144: 896-905
- BRIDGES, B. A.; ZIEGER, E.; MCGREGOR, D. B. (1981):
Summary report on the performance of bacterial mutation assays.
Progr. Mutat. Research 1: 49-67
- BUCHMANN, A.; ZIEGLER, S.; WOLF, A.; ROBERTSON, L. W.; DURHAM, S. K.; SCHWARZ, M. (1991):
Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: Correlation between primary subcellular effects and promoting activity.
Toxicology and Applied Pharmacology 111: 454-468
- BULL, R. J. (1993):
Toxicology of disinfectants and disinfectant by-products.
In: CRAUN, G. F. (Hrsg.): Safety of Water Disinfection: Balancing Chemical and Microbial Risks.
ILSI Press, Washington, DC: 239-256
- BURKHARDT, S. (2001):
Untersuchung der zonalen Zellproliferation mittels BrdU in der Leber der B6C3F1 und C57BL Maus nach Verabreichung von drei nicht-genotoxischen Karzinogenen.
Diss. Vet. med., Giessen
- BUREK, J. D. (1978):
Pathology of aging rats. A morphological and experimental study of the age-associated lesions in aging BN/Bi, WA6/Rij and (WA6xBN) F1 rats.
CRC Press; West Palm Beach, Florida: 58-68
- BURSCH, B.; LAUER, B.; TIMMERMANN-TROSIENER, I.; BARTHEL, G.; SCHUPPLER, J.; SCHULTE-HERMANN, R. (1984):
Controlled death (apoptosis) of normal and preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters.
Carcinogenesis 5: 452-458
- BURSCH, B.; PAFPE, S.; BARTHEL, G.; SCHULTE-HERMANN, R. (1990):
Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats.
Carcinogenesis 11: 847-853
- BURSCH, B.; OBERHAMMER, F.; SCHULTE-HERMANN, R. (1992):
Cell death by apoptosis and its protective role against disease.
TIPS 13: 245-251
- BUTTERWORTH, B. E. (1990):
Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential.
Mutat. Research 239: 117-132

- BUTTERWORTH, B. E.; POPP, J. A.; CONOLLY, R. B.; GOLDSWORTHY, T. L. (1992):
Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis.
In: VAINIO, H.; MAGEE, P. N.; MCGREGOR, D. B.; MCMICHAEL, A. J.:
Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification.
Vol. 116, IARC Sci. Publ.; Lyon: 279-305
- BUTTERWORTH, B. E.; CONOLLY, R. B., MORGAN, K. T. (1995):
A strategy for establishing mode of action of chemical carcinogens as a guide for approaches to risk assessments.
Cancer Letters 93: 129-146
- CAMPBELL, H. A.; PITOT, H. C.; VAN POTTER, R.; LAISHES, B. A. (1982):
Application of quantitative stereology to the evaluation of enzyme -altered foci in rat liver.
Cancer Research 42: 465-472
- CARROLL, K. K. (1980):
Lipids and carcinogenesis.
J. Environ. Pathol. Toxicol. 3: 253-271
- CARTHEW, P.; EDWARDS, R. E.; NOLAN, B. N. (1998):
The quantitative distinction of hyperplasia of hypertrophy in hepatomegaly induced in the rat liver by phenobarbital.
Toxicological Sciences 44: 46-51
- CATTLEY; R. C.; MARSMAN, D. S.; POPP, J. A. (1989):
Failure of the peroxisome proliferator WY -14,643 to initiate growth-selectable foci in rat liver.
Toxicology 56: 1-7
- CATTLEY.; POPP, J. A. (1989):
Differences between the promoting activities of the peroxisome proliferator WY -14,643 and phenobarbital in rat liver.
Cancer Research 49: 3246-3251
- CATTLEY; R. C.; MARSMAN, D. S.; POPP, J. A. (1991):
Age-related susceptibility to the carcinogenic effect of the peroxisome proliferator WY -14,643 in rat liver.
Carcinogenesis 12: 469-473
- CATTLEY; R. C.; KATO, M.; POPP, J. A.; TEETS, L. J.; VOSS, K. S. (1994)
Initiator-specific promotion of hepatocarcinogenesis by WY -14,643 and clofibrate.
Carcinogenesis 15: 1763-1766
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. (1979):
Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.
Physiol. Rev. 59: 527-605
- CHEN, Z.-Y.; FARIN, F.; OMIECINSKI, C. J.; EATON, D. L. (1992):
Association between growth stimulation by phenobarbital and expression of cytochromes P450 1A1, 1A2, 2B1/2 and 3A1 in hepatic hyperplastic nodules in male F344 rats.
Carcinogenesis 13: 675-682
- CHEN, Z.-Y.; WHITE, C. C.; HE, C. Y.; LIU, Y. F.; EATON, D. L. (1995):
Zonal differences in DNA synthesis activity and cytochrome P450 gene expression in livers of male F344 rats treated with five nongenotoxic carcinogens.
J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 14: 83-99

- CHU, I.; VILLENEUVE, D. C. ; YAGMINIAS, A.; LECAVALIER, P.; POON, R.; FEELEY, M.; KENNEDY, S. W.; SEEGAL, R. F.; HÅKANSSON, H; AHLBORG, U. G.; VALLI, V. E. (1994):
Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat.
Fundamental and Applied Toxicology 22: 457-468
- COHEN, S. M.; ELLWEIN, L. B. (1990):
Cell proliferation in carcinogenesis.
Science 249: 1007-1011
- COHEN, S. M.; ELLWEIN, L. B. (1991):
Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis.
Cancer Research 51: 6493-6505
- COLUMBANO, A.; LEDDA-COLUMBANO, G. M.; LEE, G.; RAJALAKSHMI, S.; SARMA, D. S. (1987):
Inability of mitogen-induced liver hyperplasia to support the induction of enzyme-altered islands induced by liver carcinogens.
Cancer Research 47: 5557-559
- COLUMBANO, A.; LEDDA-COLUMBANO, G. M.; ENNAS, M. G.; CURTO, M.; CHELO, A.; PANI, P. (1990):
Cell proliferation and promotion of rat liver carcinogenesis: different effect of hepatic regeneration and mitogen induced hyperplasia on the development of enzyme-altered foci.
Carcinogenesis 11: 771-776
- CONWAY; J. G.; TOMASZEWSKY, K. E.; OLSON, M. J.; CATTLEY, R. C.; MARSMAN, D. S.; POPP, J. A.(1989):
Relationship of oxidative damage to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and Wy-14,643.
Carcinogenesis 10: 513-519
- DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; MOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANES, F. (1992):
Features of apoptotic cells measured by flow cytometry.
Cytometry 13: 795-808
- DEFACIO, A.; LEARY, J. A.; HEDLEY, D. W.; TATTERSALL, M. H. N. (1987):
Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo.
J. Histochem. Cytochem. 35: 571-577
- DEML, E; OESTERLE, D. (1982):
Sex-dependent effect of polychlorinated biphenyls on enzyme-altered islands induced by diethylnitrosamine in rat liver.
Carcinogenesis 3: 1449-1453
- DEML, E; OESTERLE, D. (1985):
Dose-dependant promoting activity of chloroform in rat liver foci bioassay.
Cancer Letters 29: 59-63
- DEML, E; OESTERLE, D. (1987):
Dose-response of promotion by polychlorinated biphenyls and chloroform in rat liver foci bioassay.
Arch. Toxicol. 60: 209-211

DIETRICH, D. R. (1993):

Toxicological and pathological applications of proliferation cell nuclear antigen (PCNA), a novel marker for cell proliferation.

Critical Reviews in Toxicology 23: 77-109

DIETRICH, D. R.; CANDRIAN, D. S.; POPP, J. A.; KAUFMANN, W. K.; SWENBERG, J. A. (1994):

Retrospective assessment of liver cell proliferation via PCNA: a comparison with tritiated thymidine.

Cancer Letters 79: 45-51

DRAGAN, Y. P.; TEEGUARDEN, J.; CAMPBELL, H.; HSIA, S.; PITOT, H. (1995):

The quantitation of altered hepatic foci during multistage hepatocarcinogenesis in the rat: transforming growth factor alpha expression as a marker for the stage of progression.

Cancer Letters 93: 73-83

DRAGAN, Y. P.; SINGH, J.; PITOT, H. C. (1996):

Effect of the separate and combined administration of mestranol and phenobarbital on the development of altered hepatic foci expressing placental form of glutathione S-transferase in the rat.

Carcinogenesis 17: 2043-2052

EACHO, P. I.; LANIER, T. L.; BRODHECKER, C. H. (1991):

Hepatocellular DNA synthesis in rats given peroxisome proliferation agents: comparison of WY-14,643 and clofibrac acid, nafenopin and LY171883.

Carcinogenesis 12: 1557-1561

ECKL, P. M.; MEYER, S. A.; WHITCOMBE, W. R.; JIRTLE, R. L. (1988):

Phenobarbital reduces EGF receptors and the ability of physiological concentrations of calcium to suppress hepatocyte proliferation.

Carcinogenesis 9: 479-483

EHEMANN, V.; MAYER, D.; HACKER, H. J.; BANNASCH, P. (1986):

Loss of adenylate cyclase activity in preneoplastic and neoplastic lesions induced in rat liver by N-nitrosomorpholine.

Carcinogenesis 7: 567-573

ELDRIDGE, S. R.; TILBURY, L. F.; GOLDWORTHY, T. L.; BUTTERWORTH, B. E. (1990):

Measurement of chemically induced cell proliferation in rodent liver and kidney: A comparison of 5-bromo-2'-deoxyuridine and [³H]thymidine administered by injection or osmotic pump.

Carcinogenesis 11: 2245-2251

ELDRIDGE, S. R.; GOLDSWORTHY, S. M. (1996):

Cell proliferation rates in common cancer target tissues of B6C3F1 mice and F344 rats: effects of age, gender, and choice of marker.

Fundamental and Applied Toxicology 32: 159-167

ENZMANN, H.; BANNASCH, P. (1987):

Potential significance of phenotypic heterogeneity of focal lesions at different stages in hepatocarcinogenesis.

Carcinogenesis 8: 1607-1612

ENZMANN, H.; OHLHAUSER, D.; ENZMANN, H.; DETTLER, T.; BENNER, U.; HACKER, J.; BANNASCH, P. (1989):

Unusual histochemical pattern in preneoplastic foci characterized in hyperactivity of several enzymes.

Virchows Archiv B Cell Pathol. 57: 99-108

- FARBER, E.; SARMA, D. S. (1987):
Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective
Lab. Invest. 56: 4-22
- FISCHER, B.; GUNDUZ, N.; SAFFER, E.; ZHENG, S. (1984):
Relation of estrogen and its receptor to rat liver growth and regeneration.
Cancer Research 44: 2410-2415
- FISCHER, G.; ULLRICH, D.; KATZ, N.; BOCK, W.; SCHAUER, A. (1983):
Immunohistochemical and biochemical detection of uridine -diphosphate-glucuronyl-transferase (UDP-GT) activity in putative preneoplastic liver foci.
Virchows Archiv B 42:193-200
- FISCHER, G.; DOMINGO, M.; LODDER, D.; KATZ, N.; REINACHER, M.; EIGENBRODT, E. (1987):
Immunohistochemical demonstration of decreased L-pyruvate kinase in enzyme altered rat liver lesions produced by different carcinogens.
Virchows Archiv B 53: 359-364
- FOSTER, J. R.; SMITH, L. L.; HEXT, P. M.; BRAMMER, A.; SOAMES, A. R.; WYATT, I. (1990):
Target cell toxicity of inhaled spermidine in rat lungs.
International Journal of Experimental Pathology 71: 617-630
- FOSTER, J. R. (1997):
The role of cell proliferation in chemically induced carcinogenesis.
J. Comp. Path. 116: 113-144
- GARCIA-ALLEN, C.; LOUGHLIN, J.; ORTON, T.; LORD, P. (1997):
Changes in protein and mRNA levels of growth factor/growth factor receptors in rat livers after a d-ministration of phenobarbitone or methylofenapate.
Arch. Toxicol. 71: 409-415
- GEMMA, S.; FACCIOLI, S.; CHIECO, P.; SBRACCIA, M.; TESTAI, E.; VITTOZZI, L. (1996):
In vivo CHCl₃ bioactivation, toxicokinetics, toxicity, and induced compensatory cell proliferation in B6C3F1 male mice.
Toxicology and Applied Pharmacology 141: 394-402
- GHIA, M.; MERETO, E. (1989):
Induction and promotion of γ -glutamyltranspeptidase-positive foci in the liver of female rats treated with ethinyl estradiol, clomiphene, tamoxifen and their associations.
Cancer Letters 46: 195-202
- GLAUERT, H. P.; REDDY, J. K.; KENNAN, W. S.; SATTLER, G. L.; RAO, V. S.; PITOT, H. C. (1984):
Effect of hypolipidemic peroxisome proliferators on unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes and on mutagenesis in Salmonella.
Cancer Letters 24: 147-156
- GLAUERT, H. P.; BEER, D.; RAO, M. S., SCHWARZ, M.; XU, Y. -D.; GOLDWORTHY; T. L.; COLOMA, J.; PITOT, H. C. (1986 a):
Induction of altered hepatic foci in rats by the administration of hypolipidemic peroxisome proliferators alone or following a single dose of diethylnitrosamine.
Cancer Research 46: 4601-4606

GLAUERT, H. P.; SCHWARZ, M.; PITOT, H. C. (1986 b):

The phenotypic stability of altered hepatic foci: effect of the short-term withdrawal of phenobarbital and of long-term feeding of purified diets after the withdrawal of phenobarbital.
Carcinogenesis 7: 117-121

GOEL, S. K.; LALWANI, N. D.; FAHL, W. E.; REDDY, J. K. (1985):

Lack of covalent binding of peroxisome proliferators nafenopin and WY -14,643 to DNA in vivo and in vitro.
Toxicol. Letters 24: 37-43

GÖTTEL, B. (1997):

Die Messung von Zellproliferation durch Bromodeoxyuridin (BrdU) Immunohistochemie: Studiendesign, Auswertestrategien und Kontrolldaten am Beispiel einer Phenacetin Applikation an Ratten.
Diss. Vet. med., Zürich

GOLD; L. D.; SLONE; T. H.; MANLEY, N. B., BERNSTEIN, L. (1991):

Target organs in chronic bioassays of 533 chemical carcinogens.
Environmental Health Perspectives 93: 233-246

GOLDSWORTHY, T. L.; CAMPBELL, H. A.; PITOT; H. C. (1984):

The natural history and dose-response characteristics of enzyme-altered foci in rat liver following phenobarbital and diethylnitrosamine administration.
Carcinogenesis 5: 67-71

GOLDSWORTHY, T. L.; PITOT, H. C. (1985):

The quantitative analysis and stability of histochemical markers of altered hepatic foci in rat liver following initiation by diethylnitrosamine administration and promotion with phenobarbital.
Carcinogenesis 6: 1261-1269

GOLDSWORTHY, T. L.; MORGAN, K. T.; POPP, H. A.; BUTTERWORTH, B. E. (1991):

Guidelines for measuring chemically induced cell proliferation in specific rodent target organs.
In: BUTTERWORTH, T. L.; SLAGA, T. J.; FARLAND, W.; MCCLAIN, M.:
Chemically induced cell proliferation. Implications for risk assessment.
Wiley-Liss; Inc.; New York: 253-284

GOLDSWORTHY, T. L.; BUTTERWORTH, B. E.; MARONPOT, R. R. (1993):

Concepts, labeling procedures and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis.
Environmental Health Perspectives 101 (Suppl. 5): 59-66

GOTTSCHLING, B. (1999):

Chemisch induzierte Zellproliferation und Karzinogenese: Retrospektive Untersuchung der Zellproliferation mittels PCNA-Nachweis in Niere und Harnblase von Ratten aus toxikologischen Studien.
Diss. Vet. med., Giessen

GRASL-KRAUPP, B.; HUBER, W.; TIMMERMANN-TROSIENER, I.; SCHULTE-HERMANN, R. (1993):

Peroxisomal enzyme induction uncoupled from enhanced DNA synthesis in putative preneoplastic liver foci of rats treated with a single dose of the peroxisome proliferator nafenopin.
Carcinogenesis 14: 2435-2437

HAAG-GRÖNLUND, M.; WÄRNGARD, L.; FLODSTRÖM, S.; SCHEU, G.; KRONEVI, T.; AHLBORG, U. G.; FRANSSON-STEEN, R. (1997):

Promotion of altered hepatic foci by 2,3',4,4'5-pentachlorobiphenyl in Sprague-Dawley female rats.
Fundamental and Applied Toxicology 35: 120-130

- HACKER, H. J.; MOORE, M. A.; MAYER, D. ; BANNASCH, P. (1982):
Correlative histochemistry of some enzymes of carbohydrase metabolism in preneoplastic and neoplastic lesions in the rat liver.
Carcinogenesis 3: 1265-1272
- HARADA, T.; MARONPOT, R. R.; MORRIS, R. W.; STITZEL, K. A.; BOORMAN, G. A. (1989):
Morphological and stereological characterization of hepatic foci of cellular alteration in control Fischer 344 rats.
Toxicologic Pathology 17: 579-583
- HASEGAWA, R.; TAKAHASHI, S.; IMAIDA, K.; YAMAGUCHI, S.; SHIRAI, T.; ITO, N. (1991):
Age-dependent induction of preneoplastic liver cell foci by 2-acetylaminofluorene, phenobarbital and acetaminophen in F344 rats initially treated with diethylnitrosamine.
Jpn. J. Cancer Res. 82: 293-397
- HASEGAWA, R.; YOSHIHDA, T.; MIZOOGUCHI, Y.; FUTAKUCHI, M.; KIM, D. J.; CUI, L.; ITO, N. (1994):
Phenotypic alteration of hepatocellular foci in rats treated with clofibrate and phenobarbital.
Cancer Letters 83: 89-95
- HAYASHI, F.; TAMURA, H.; WATANABE, T.; SUGA, T. (1995):
Enhancement by peroxisome proliferators of the susceptibility to DNA damage in the liver of male F344 rats.
Cancer Letters 92: 87-90
- HEMMING, H.; FLODSTROM, S.; WARNGARD, L.; BERGMANN, A.; KRONEVI, T.; NORDGREN, I.; AHLBORG, U. G. (1993):
Relative tumour promoting activity of three polychlorinated biphenyls in rat liver.
Eur. J. Pharmacol. 248: 163-174
- HEMMING, H.; BAGER, Y.; FLODSTROM, S.; NORDGREN, I.; KRONEVI, T.; AHLBORG, U. G.; WÄRNGARD, L. (1995):
Liver tumour promoting activity of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and its interaction with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.
European Journal of Pharmacology; Environmental Toxicology and Pharmacology 292: 241 -249
- HENDRICH, S.; GLAUERT, H. P.; PITOT, H. C. (1986):
The phenotypic stability of altered hepatic foci: Effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital.
Carcinogenesis 7: 2041-2045
- HENDRICH, S.; CAMPPELL, H. A.; PITOT, H. C. (1987):
Quantitative stereological evaluation of four histochemical markers of altered foci in multistage hepatocarcinogenesis.
Carcinogenesis 8: 1245-1250
- HENKES, W.; DOPPLER, C.; ECKERT, R.; HALBRITTER, H. -P.; RUSSMANN, E.; STIER, B. (1993):
Methoden zur Messung der Zellproliferation.
Boehringer Mannheim Biochemica: Sonderdrucke aus BioTec
Vogel-Verlag und Druck KG, Würzburg: 1-6
- HILDEBRAND, B.; GRASSO, P.; ASHBY, J.; CHAMBERLAIN, M.; JUNG, R.; KOLFSCHOTEN, A.; LOESER, E.; SMITH, E.; BONTINCK, W. J. (1991):
Validity of considering that early changes may act as indicators for non-genotoxic carcinogenesis.
Mutat. Research 248: 217-220

HITAKA, H.; VAUGHAN, J.; PITOT, H. C. (1997):

The effect of two periods of short-term fasting during the promotion stage of hepatocarcinogenesis in rats: the role of apoptosis and cellproliferation.
Carcinogenesis 18: 59-166

IARC (1987):

IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, Suppl. 7. Overall evaluations of carcinogenicity.

An updating of IARC monographs. Vol. 1-42, IARC, Lyon

ITO, N.; MOORE, M. A.; BANNASCH, P. (1984):

Modification of the development of N-nitrosomorpholine-induced hepatic lesions by 2-acetylaminofluorene, phenobarbital and 4,4'-diaminodiphenylmethane: a sequential histological and histochemical analysis.

Carcinogenesis 5: 335-342

ITO, N.; TATEMATSU, M.; HASEGAWA, R.; TSUDA, H. (1989):

Medium-term bioassay system for detection of carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis utilizing the GST-P positive liver cell focus as an endpoint marker.

Toxicologic Pathology 17: 630-641

ITO, N.; HASEGAWA, R.; IMAIDA, K.; MASUI, T.; TAKAHASHI, S.; SHIRAI, T. (1992):

Pathological markers for non-genotoxic agent-associated carcinogenesis.

Toxicology Letters 64/65: 613-620

JAMES, N. H.; ROBERTS, R. A. (1996):

Species differences in response to peroxisome proliferators correlate in vitro with induction of DNA synthesis rather than suppression of apoptosis.

Carcinogenesis 17: 1623-1643

JIRTLE, R. L.; MEYER, S. H.; BROCKENBROUGH, J. S. (1991):

Liver tumor promoter phenobarbital: A biphasic modulator of hepatocyte proliferation.

In: BUTTERWORTH, T. L.; SLAGA, T. J.; FARLAND, W.; MCCLAIN, M.:

Chemically induced cell proliferation. Implications for risk assessment.

Wiley-Liss; Inc.; New York: 209-216

JIRTLE, R. L.; HANKINS, G. R.; REISENBICHLER, H.; BOYER, I. V. (1994):

Regulation of mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptors and transforming growth factor beta during liver tumor promotion with phenobarbital.

Carcinogenesis 15: 1473-1478

JONES, H. B.; CLARKE, N. A. B.; BARRAS, N. C. (1993):

Phenobarbital-induced hepatocellular proliferation: Anti-bromodeoxyuridine and anti-proliferating cell nuclear antigen immunocytochemistry.

J. of Histochemistry and Cytochemistry 41: 21-27

JORGENSEN, T. A.; MEIERHENRY, E. F.; RUSTBROOK, C. J.; BULL, R. J.; ROBINSON, M. (1985):

Carcinogenicity of chloroform in drinking water to male Osborne-Mendel rats and female B6C3F1 mice.

Fundamental and Applied Toxicology 5: 760-769

JUNGERMANN, K.; KATZ, N. (1989):

Functional specialization of different hepatocyte populations.

Physiological Reviews 69: 708-764

- KENNEDY S.; RETTINGER, S.; FLYE, M. W.; PONDER, K. P. (1995):
Experiments in transgenic mice show that hepatocytes are the source for postnatal liver growth and do not stream.
Hepatology 22: 160-168
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. (1972):
Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer 26: 239-257
- KERR, J. F. R.; HARMON, B. V. (1991):
Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective.
In: Apoptosis: The molecular basis of cell death.
TOMEL, COPE (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York: 5 -29
- KERR, J. F. R.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. (1994):
Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy.
Cancer 73: 2013-2026
- KIMBROUGH, R. D.; SQUIRE, R. A.; LINDNER, R. E.; STRANDBERG, J. L.; MONTELLI, R. J.; BURSE, V. W. (1975):
Induction of liver tumors in Sherman strain female rats by PCB Aroclor 1260.
J. Natl. Cancer Inst. 55: 1453-1459
- KLAUNIG, J. E.; SIGLIN, J. C.; SCHAFFER, L. D.; HARTNETT, J. A.; WEGHORST, C. M.; OLSON, M. J.; HAMPTON, J. A. (1991):
Correlation between species and tissue sensitivity to chemical carcinogenesis in rodents and the induction of DNA synthesis.
In: BUTTERWORTH, T. L.; SLAGA, T. J.; FARLAND, W.; MCCLAIN, M.:
Chemically induced cell proliferation. Implications for risk assessment.
Wiley-Liss; Inc.; New York: 185-194
- KOLOJA, K. L.; STEVENSON, D. E.; JOHNSON, J. T.; WALBORG, F. E.; KLAUNIG, J. E. (1996 a):
Subchronic effects of Dieldrin and Phenobarbital on hepatic DNA synthesis in mice and rats.
Fundamental and Applied Toxicology 29: 219-228
- KOLOJA, K. L.; STEVENSON, D. E.; WALBORG, F. E.; KLAUNIG, J. E. (1996 b):
Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis.
Carcinogenesis 17: 947-954
- KONG, J.; RINGER, D. P. (1996):
Quantitative analysis of changes in cell proliferation and apoptosis during preneoplastic and neoplastic stages of hepatocarcinogenesis in rat.
Cancer Letters 105: 241-248
- KRAUPP-GRASL, B.; HUBER, B.; TAPER, H.; SCHULTE-HERMANN, R. (1991):
Increased susceptibility of aged rats to hepatocarcinogenesis by peroxisome proliferator nafenopin and the possible involvement of altered liver foci occurring spontaneously.
Cancer Research 51: 666-671
- KRISHNAN, V.; SAFE, S. (1993):
Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as anti-estrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 120: 55-61

- LAKE, B. G.; EVANS, J. G.; CUNNINGHAME, M. E.; PRICE, R. J. (1993):
Comparison of the hepatic effects of nafenopin and WY -14,643 on peroxisome proliferation and cell replication in the rat and syrian hamster.
Environmental Health Perspectives 101: 241 -248
- LANG, R.; REDMANN, U. (1979):
Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test.
Mutat. Research 67: 361-365
- LARSON, J. L.; WOLF, D. C.; BUTTERWORTH, B. E. (1993):
Acute hepatotoxic and nephrotoxic effects of chloroform in male F -344 rats and female B6C3F1 mice.
Fundamental and Applied Toxicology 20: 302 -315
- LARSON, J. L.; WOLF, D. C.; BUTTERWORTH, B. E. (1995 a):
Induced regenerative cell proliferation in livers and kidneys of male F -344 rats given chloroform in corn oil by gavage or ad libitum in drinking water.
Toxicology 95: 73-86
- LARSON, J. L.; WOLF, D. C.; MÈRY, S.; MORGAN, K. T.; BUTTERWORTH, B. E. (1995 b):
Toxicity and cell proliferation in the liver, kidneys and nasal passages of female F -344 rats, induced by chloroform administered by gavage.
Fd. Chem. Toxic. 33: 443-456
- LATT, S. A. (1977):
Fluometric detection of deoxyribonucleic acid synthesis; possibilities for interfacing bromodeoxyuridine dye techniques with flow cytometry.
J. of Histochemistry and Cytochemistry 25: 913 -926
- LEE, M. V.; CAMERON, G. R.; ARCHER, M. C. (1993):
The role of hepatocyte heterogeneity in the initiation of hepatocarcinogenesis.
Carcinogenesis 14: 1403-1408
- LEE, M. V.; CAMERON, G. R.; ARCHER, M. C. (1998):
Zonal location of compensatory hepatocyte proliferation following chemically induced hepatotoxicity in rats and humans.
Toxicologic Pathology 26: 621-627
- LEE, S. S.; PINEAU, T.; DRAGO, J.; LEE, E. J.; OWENS, J. W.; KROETZ, D. L.; FERNANDEZ - SALGUERO, P. M.; WESTPHAL, H.; GONZALES, F. J. (1995):
Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators.
Mol. Cell. Biol. 15: 3012-3022
- LOCK, E. A.; MITCHELL, A. M.; ELCOMBE, C. R. (1989):
Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29: 145-163
- LOURY, D. J., SMITH-OLIVER, T.; STROM, S.; JIRTLE, T.; MICHALOPOULOS, G.; BUTTERWORTH, B. E. (1986):
Assessment of unscheduled and replicative DNA synthesis in hepatocytes treated in vivo and in vitro with unleaded gasoline or 2,2,4-trimethylpentane.
Appl. Pharmacology 85:11

- MACLELLAN, K.; SINGH, A.; CHU, I.; POON, R.; VILLENEUVE, D. C. (1994):
Subchronic toxicity of pentachlorobiphenyl congeners n. 126 or 118 in the rat liver. An electron microscope study.
J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 26: 279-291
- MACHISHI, H.; HIGASHI, S.; HIBASAMI, H.; NAKASHIMA, K.; KAWARADA, Y.; MIZUMOTO, R. (1995):
Role of activation of ornithine decarboxylase and DNA synthesis on ethynylestradiol -induced hepatocarcinogenesis.
Carcinogenesis 16: 2965-2971
- MACHNIK, G.; CHEMNITIUS, L.-H.; NIEKRENZ, H. (1983):
Liver neoplasm after long-term steroid application in rats.
Exp. Pathology 24: 183-187
- MAEKAWA, A.; ONODERA, H.; OGASAWARA, H.; MATSUSHIMA, Y.; MITSUMORI, K.; HAYASHI, Y. (1992):
Threshold dose dependence in phenobarbital promotion of rat hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine.
Carcinogenesis 13: 501-503
- MAJINO, G.; JORIS, I. (1995):
Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death.
Am. J. Pathol. 146: 3-15
- MARSMAN, D. S.; CATTLEY, R. C.; CONWAY, J. G.; POPP, J. A. (1988):
Relationship of hepatic peroxisome proliferation on replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats.
Cancer Research 48: 6739-6744
- MARSMAN, D. S.; GOLDSWORTHY, T. L.; POPP, J. A. (1992):
Contrasting hepatocytic peroxisome proliferation, lipofuscin accumulation and cell turnover for the hepatocarcinogen Wy-14,643 and clofibrac acid.
Carcinogenesis 13: 1011-1017
- MARSMAN, D. S.; POPP, J. A. (1994):
Biological potential of basophilic hepatocellular foci and hepatic adenoma induced by the peroxisome proliferator, Wy-14,643
Carcinogenesis 15: 111-117
- MAYES, B. A.; McCONNEL, E. E.; NEAL, B. H.; BRUNNER, M. J.; HAMILTON, S. B.; SULLIVAN, T. M.; PETERS, A. C.; RYAN, M. J.; TOFT, J. D.; SINGER, A. W.; BROWN, J. F.; MENTON, R. G.; MOORE, J. A. (1998):
Comparative carcinogenicity in Sprague-Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures Aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260.
Toxicological Sciences 41: 62-76
- MAYOL, X.; PÉREZ-TOMÁS, R.; CULLERÉ, X.; ROMERO, A.; ESTELLA, M. D.; DOMINGO, J. (1991):
Cell proliferation and tumour promotion by ethinyl estradiol in rat hepatocarcinogenesis.
Carcinogenesis 12: 1133-1136

- MAYOL, X.; NEAL, G. E.; DAVIES, R.; ROMERO, A.; DOMINGO, J. (1992):
Ethinyl estradiol-induced cell proliferation in rat liver. Involvement of specific populations of hepatocytes.
Carcinogenesis 13: 2381-2388
- MICHALOPOULOS, G.; DeFRANCES, M. C. (1997):
Liver regeneration.
Science 276: 60-66
- MILLER, R. T.; CATTLEY, R. C.; MARSMAN, D. S.; LYGH, O.; POPP, J. A. (1995):
TGF α is differentially expressed in liver foci induced by diethylnitrosamine initiation and peroxisome proliferator promotion.
Carcinogenesis 16: 77-82
- MITAKA, T.; TSUKADA, H. (1987):
Sexual difference in the histochemical characteristics of "altered cell foci" in the liver of aged Fischer 344 rats.
Jpn. J. Cancer Research 78: 785-790
- MOHR, U. (1997):
Focus of cellular alteration.
In: International Classification of rodent tumors, Part I: The rat;
10. Digestive System; International Agency of Research on Cancer (WHO), Lyon
IARC Scientific Publications No. 22: 65-68
- MONTICELLO, T. M.; MORGAN, K. T.; HURTT, M. E. (1990):
Unit length as the denominator for quantitation of cell proliferation in nasal epithelia.
Toxicologic Pathology 18: 24-31
- MONTICELLO, T. M.; BARTON, D.; MA, X.; BABISH, J. G.; DURHAM, S. K. (1995):
Comparison of acute hepatocellular proliferating cell nuclear antigen labelling indices and growth fractions, p34cdc2 kinases, and serum enzymes in carbon tetrachloride treated rats.
Toxicologic Pathology 23: 439-446
- MOODY, D. E.; REDDY, J. K. (1978):
The hepatic effects of hypolipidemic drugs (clofibrate, nafenopin, tibrac acid, and WY-14,643) on hepatic peroxisomes and peroxisome-associated enzymes.
Am. J. Pathol 90: 435-446
- MOOLGAVKAR, S. H.; LUEBECK, E. G.; GUNST, M.; PORT, E. R.; SCHWARZ, M. (1990):
Quantitative analysis of enzyme-altered foci in rat hepatocarcinogenesis experiments - I: Single agent regime.
Carcinogenesis 11: 1271-1278
- MOORE, M. A.; MAYER, D.; BANNACH, P. (1982):
The dose dependence and sequential appearance of putative preneoplastic populations induced in the rat liver by stop experiments with N-nitrosomorpholine.
Carcinogenesis 3: 1429-1436
- MOORE, M. A.; HACKER, H.-J.; BANNACH, P. (1983 a):
Phenotypic instability in focal and nodular lesions induced in a short term system in the rat liver.
Carcinogenesis 4: 595-603

- MOORE, M. A.; HACKER, H.-J.; KUNZ, H. W.; BANNASCH, P. (1983 b):
Enhancement of NNM-induced carcinogenesis in the rat liver by phenobarbital: a combined morphological and enzyme histochemical approach.
Carcinogenesis 4: 473-479
- MOSER, G. J.; WOLF, D. C.; STANDEVEN, A. M.; MILLS, J.; JIRTLE, R. L.; GOLDSWORTHY, T. L. (1996):
Cell proliferation and regulation of negative growth factors in mouse liver foci.
Carcinogenesis 17: 1835-1840
- MOTOKI, Y.; TAMURA, H.; MORITA, R.; WATANABE, T.; SUGA, T. (1997):
Decreased hepatocyte growth factor level by Wy-14,643, non-genotoxic hepatocarcinogen in F-344 rats.
Carcinogenesis 18: 1303-1309
- National Cancer Institute (1976):
Carcinogenesis bioassay of Chloroform.
National Cancer Institute, Bethesda, Md Carcinogenesis Program: 1 -44
- NAKAMURA, T.; NAWA, K.; ICHIHARA, A. (1984):
Partial purification and characterization on hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 1450-1459
- NORBACK, D. H.; WELTMANN, R. H. (1985):
Polychlorinated biphenyl induction of hepatocellular carcinoma in the Sprague-Dawley rat.
Environmental Health Perspectives 60: 97-105
- OCHS, H.; DÜSTERBERG, B.; GÜNZEL, P.; SCHULTE-HERMANN, R. (1986):
Effect of tumor promoting contraceptive steroids on growth and drug metabolizing enzymes in rat liver.
Cancer Research 46: 1224-1232
- OGAWA, K.; ONOÉ, T.; TAKEUCHI, M. (1981):
Spontaneous occurrence of γ -glutamyl transpeptidase-positive hepatocytic foci in 105 week-old Wistar and 72-week old Fischer 344 male rats.
J. Natl. Cancer Inst. 67: 407-410
- OGAWA, T.; HIGASHI, S.; KAWARADA, Y.; MIZUMOTO, R. (1995):
Role of reactive oxygen in synthetic estrogen induction of hepatocellular carcinomas in rats and preventive effect of vitamins.
Carcinogenesis 16, no. 4: 831-836
- OGISO, T.; TATEMATSU, M.; TAMANO, S.; TSUDA, H.; ITO, N. (1985):
Comparative effects of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase-positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay.
Toxicologic Pathology 13: 257-265
- OKITA, K.; NODA, K.; FUKUMOTO, Y.; TAKEMATO, T. (1976):
Cytochrome P-450 in hyperplastic liver nodules during hepatocarcinogenesis with N-2-fluorenylacetamide in rats.
Gann 67: 899-902
- PALMER, W. K.; GOLDFARB, A. H.; IVY, I. L. (1979):
Circadian and ovarian influences on tissue glycogen in female rats.
Endocrinology 105: 1254-1261

- PERAINO, C.; FRY, R. J. M.; STAFFELDT, E. F.; KISIELESKI, W. E. (1973):
Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in rats.
Cancer Research 33: 2701-2705
- PERAINO, C.; FRY, R. J. M.; STAFFELDT, E. F.; CHRISTOPHER, J. P. (1975):
Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diepheylyhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene induced hepatic tumorigenesis in the rat.
Cancer Research 35: 2884-2890
- PERAINO, C.; FRY, R. J. M.; STAFFELDT, E. F.; CHRISTOPHER, J. P. (1977):
Enhancing effects of phenobarbitone and butylated hydroxytoluene on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat.
Fd. Cosmet. Toxicol. 15: 93-96
- PERAINO, C.; STAFFELDT, E. F.; CARNES, B. A.; LUDEMANN, V. A.; BLOMQUIST, J. A.; VESSELINOVITCH, S. D. (1984):
Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitrosamine or benzo[α]pyrene within one day after birth.
Cancer Research 44: 3340-3347
- PEREIRA, M. A.; LIN, L.-H. C.; LIPPITT, J. M.; HERREN, S. L. (1982):
Trihalomethanes as initiators and promoters of carcinogenesis.
Environmental Health Perspectives 46: 151-156
- PEREIRA, M. A. (1994):
Route of administration determines whether chloroform enhances or inhibits cell proliferation in the liver of B6C3F1 mice.
Fundamental and Applied Toxicology 23: 87-92
- PETERS, J. M.; CATTLEY, R. C.; GONZALES, F. J. (1997):
Role of PPAR α in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator WY-14,643.
Carcinogenesis 18: 2029-2033
- PITOT, H. C.; GOLDSWORTHY T.; MORAN, S. (1981):
The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer.
Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 17:133 -146
- PITOT, H. C.; SIRICA, A. E. (1980):
The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis.
Biochem. Biophys. Acta 605: 191-205
- PITOT, H. C.; GOLDSWORTHY, T. L.; MORAN, S.; KENNAN, W.; GLAUERT, H. P.; MARONPOT, R. R.; CAMPBELL, H. A. (1987):
A method to quantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose-response relationships to altered hepatic foci.
Carcinogenesis 8: 1491-1499
- PITOT, H. C. (1989):
Progression: the terminal stage in carcinogenesis.
Jap. J. Cancer Res. 80: 599-607

- PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P.; NEVEU, M. J.; RIZVI, T. A.; HULLY, J. R. ; CAMPBELL, H. A. (1991):
Chemicals, cell proliferation, risk estimation, and multistage carcinogenesis.
In: BUTTERWORTH, T. L.; SLAGA, T. J.; FARLAND, W.; MCCLAIN, M.:
Chemically induced cell proliferation. Implications for risk asses sment.
Wiley-Liss; Inc.; New York: 517-532
- POLAND, A.; GLOVER, E. (1977):
Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure a c-
tivity relationship.
Mol. Pharmacol. 13: 924-938
- PONDER, K. P. (1996):
Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies.
FASEB J 10 (7): 673-82
- POPP, J. A.; SCORTICHINI, B. H.; GARVEY, L. K. (1985):
Quantitative evaluation of hepatic foci of cellular alteration occurring spontaneously in Fischer -344
rats.
Fundamental and Applied Toxicology 5: 314-319
- POPP, J. A.; MARSMAN, D. S. (1991):
Chemically induced cell proliferation in liver carcinogenesis.
In: BUTTERWORTH, T. L.; SLAGA, T. J.; FARLAND, W.; MCCLAIN, M.:
Chemically induced cell proliferation. Implications for risk asses sment.
Wiley-Liss; Inc.; New York: 389-395
- PRESTON, B. D.; VAN MILLER, J. P.; MOORE, R. W.; ALLEN, J. R. (1981):
Promoting effect of polychlorinated Biphenyls (Aroclor 1254) and polychlorinated dibenzofuran-free
Aroclor 1254 on diethylnitrosamine-induced tumorigenesis in the rat.
J. Natl. Cancer Inst. 66: 509-515
- PROBST, G. S.; McMAHON, R. E.; HILL, L. E.; THOMPSON, C. Z.; EPP, J. K.; NEAL, S. B. (1981):
Chemically induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: a compar ison
with bacterial mutagenicity using 218 compounds.
Environ. Mutagen. 3: 11-32
- PUGH, T. D.; GOLDFARB, S. (1978):
Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepato carcinogenesis in rats fed 2-
acetylaminofluorene followed by phenobarbital.
Cancer Research 38: 4450-4457
- PUGH, T. D.; KING, J. H.; KOEN, H.; NYCHKA; D.; CHOVER, J.; WAHBA, G.; HE, Y. -H.;
GOLDFARB, S. (1983):
Reliable stereological method for estimating t he number of microscopic hepatocellular foci from their
transections.
Cancer Research 43: 1261-1268
- RABES, H. M.; WIRSCHING, R.; TUCZEK, H. V.; ISELER, G. (1976):
Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy.
Cell Tissue Kinet. 9: 517-532

- RAO, M. S.; LALWANI, M. D.; REDDY, J. K. (1984):
Sequential histologic study of rat liver during peroxisome proliferator [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (WY-14,7643)-induced hepatocarcinogenesis.
J. Natl. Cancer Inst. 73: 983-990
- RAO, M. S.; TATEMATSU, M.; SUBBARAO, V.; ITO, M.; REDDY, J. K. (1986):
Analysis of peroxisome proliferator-induced preneoplastic and neoplastic lesions of rat liver for placental form of glutathione S-transferase and γ -glutamyltranspeptidase.
Cancer Research 46: 5287-5290
- RAPPAPORT, A. M.; BOROWY, A. J.; LOUGHEDD, W. M.; LOTTO, W. N. (1954):
Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit.
Anat. Rec. 119: 11-33
- RAZVI, E. S.; WELSH, R. M. (1995):
Apoptosis in viral infections.
Adv. Virus Res. 49: 1-60
- REDDY, B. S.; NARISAWA, T.; MARONPOT, R.; WEISBURGER, J. H.; WYNDER, E. L. (1975):
Animal models for the study of dietary factors and cancer of the large bowel.
Cancer Research 35: 3421-3426
- REDDY, J. K.; RAO, M. S.; AZARNOFF, D. L.; SELL, S. (1979):
Mitogenic and carcinogenic effects of a hypolipidemic peroxisome proliferator, [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643), in rat and mouse liver.
Cancer Research 39: 152-161
- REDDY, J. K.; AZARNOFF, D. L.; HIGNITE, C. E. (1980):
Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens.
Nature 283: 397-398
- REDDY, J. K.; LALWANI, M. D. (1983):
Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans.
CRC Crit. Rev. Toxicol. 12: 1-58
- REDDY, T. V.; DANIEL, F. B.; LIN, E. L. C.; STOBBER, J. A.; OLSON, G. R. (1992):
Chloroform inhibits the development of diethylnitrosamine-initiated, phenobarbital-promoted γ -glutamyltranspeptidase and placental form glutathione S-transferase-positive foci in rat liver.
Carcinogenesis 13: 1325-1330
- REINACHER, M.; EIGENBRODT, E.; GERBRACHT, U.; ZENK, G.; TIMMERMANN-TROSIENER, I.; BENTLEY, P.; WAECHTER, F.; SCHULTE-HERMANN, R. (1986):
Pyruvate kinase isoenzymes in altered foci and carcinoma of rat liver.
Carcinogenesis 7: 1351-1357
- REISENBICHLER, H.; CHARI, R. S.; BOYER, I. J.; JIRTLE, R. L. (1994):
Transforming growth factor- β receptors type I, II, III in phenobarbital-promoted rat liver tumors.
Carcinogenesis 15: 2763-2767
- REITZ, R. H.; FOX, T. R.; QUAIST, J. F. (1982):
Mechanistic considerations for carcinogenic risk estimation: chloroform.
Environmental Health Perspectives 46: 163-168

- REN, P.; RUCH, R. J. (1990):
Inhibition of gap junctional intercellular communication by barbiturates in long-term primary cultured rat hepatocytes is correlated with liver tumour promoting activity.
Carcinogenesis 17: 2119-2125
- REUBER, M. (1979):
Carcinogenicity of chloroform.
Environmental Health Perspectives 31: 171-182
- ROBERTS, R. A.; SOAMES, A. R.; GILL, J. H.; JAMES, N. H.; WHEELDON, E. B. (1995):
Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations.
Carcinogenesis 16: 1693-1698
- ROBERTS, R. A.; JAMES, N. H.; WOODYATT, N. J.; MACDONALD, N.; TUGWOOD, J. D. (1998):
Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferation activated receptor α (PPAR α).
Carcinogenesis 19: 43-44
- ROEBUCK, B. C.; YAGER, J. D.; LONGNECKER, D. S.; WILPONE, S. A. (1981):
Promotion by unsaturated fat of azaserine-induced pancreatic carcinogenesis in the rat.
Cancer Research 41: 3961-3966
- ROLFE, M.; JAMES, N. H.; ROBERTS, R. A. (1997):
Tumor necrosis factor α (TNF α) suppresses apoptosis and induces DNA synthesis in rodent hepatocytes: a mediator of hepatocarcinogenicity of peroxisome proliferators?
Carcinogenesis 18: 2277-2280
- ROSE, M. L.; GERMOLEC, D. R.; SCHOONHOVEN, R.; THURMAN, R. G. (1997):
Kupffer cells are causally responsible for the mitogenic effect of peroxisome proliferators.
Carcinogenesis 18: 1453-1456
- ROSSI, L.; RAVERA, M.; REPETTI, G.; SANTI, L. (1977):
Long-term administration of DDT or phenobarbital-NA in Wistar rats.
J. Cancer 19: 179-185
- RUSYN, I.; TSUKAMOTO, H.; THURMAN, R. G. (1998):
WY-14 643 rapidly activates nuclear factor κ B in Kupffer cells before hepatocytes.
Carcinogenesis 19: 1217-1222
- SAFE, S. (1990):
Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs).
Toxicology 21: 51-87
- SALTIKOV, S. A. (1967):
The determination of the size distribution of particles in an opaque material from a measurement of the size distribution of their sections.
In: ELIAS, H. (Hrsg.): *Proceedings of the Second International Congress for Stereology*.
Springer-Verlag, Berlin: 163-173

- SARGENT, L.; ROLOFF, B.; MEISNER, L. (1989):
In vitro chromosome damage due to PCB interactions.
Mutat. Research 224: 79-88
- SATO, K.; KITAHARA, A.; SATOH, K.; ISHIKAWA, T.; TATEMATSU, M.; ITO, N. (1984):
The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat at chemical hepatocarcinogenesis.
Gann 75: 199-202
- SCHERER, E. (1984):
Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis.
Biochem. Biophys. Acta 738: 219-236
- SCHOENY, R.; SMITH, C. C.; LOPER, J. C. (1979):
Nonmutagenicity for Salmonella of the chlorinated hydrocarbons Aroclor 1254, 1,2,4-trichlorobenzene; Mirex, and Kepone.
Mutat. Research 68: 125-132
- SCHOENY, R. (1982):
Mutagenicity testing of chlorinated biphenyls and chlorinated dibenzofurans.
Mutat. Research 101: 45-56
- SCHRÖDER, B.; DIENER, M. (2000):
Regulation von Zellfunktionen.
In: v. ENGELHARDT, W.; BREVES, G. (Hrsg.): Physiologie der Haustiere
Enke im Hippokratis Verlag GmbH, Stuttgart: 16-20
- SCHULTE-HERMANN, R. (1977):
Two-stage control of cell proliferation induced in rat liver by α -hexachlorocyclohexane.
Cancer Research 37: 166
- SCHULTE-HERMANN, R.; TIMMERMANN-TROSIENER, J.; SCHUPPLER, J. (1982):
Response of liver foci in rats to hepatic tumor promoters.
Toxicologic Pathology 10: 63-68
- SCHULTE-HERMANN, R.; TIMMERMANN-TROSIENER, J.; SCHUPPLER, J. (1983 a):
Promotion of spontaneous preneoplastic cells in rat liver as a possible explanation of tumor production by nonmutagenic compounds.
Cancer Research 43: 839-844
- SCHULTE-HERMANN, R.; SCHUPPLER, J.; TIMMERMANN-TROSIENER, J.; OHDE, G.; BURSCH, W.; BERGER, H. (1983 b):
The role of growth of normal and preneoplastic cell populations for tumor promotion in rat liver.
Environmental Health Perspectives 50: 185-194
- SCHULTE-HERMANN, R. (1985):
Tumor promotion in the liver.
Archives of Toxicology 57:147-158
- SCHULTE-HERMANN, R.; TIMMERMANN-TROSIENER, J.; SCHUPPLER, J. (1986):
Facilitated expression of adaptive responses to phenobarbital in putative pre-stages of liver cancer.
Carcinogenesis 7:1651-1655

- SCHULTE-HERMANN, R.; TIMMERMANN-TROSIENER, J., BATHEL, G.; BURSCH, W. (1990): DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Research* 50: 5127-5135
- SCHULTE-HERMANN, R.; BURSCH, W.; KRAUPP-GRASL, B.; OBERHAMMER, F; WAGNER, A.; JIRTLE, R. (1993): Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci. *Environmental Health Perspectives* 101 (Suppl 5): 87-90
- SCHULTE-HERMANN, R.; MARIAN, B.; BURSCH, W. (1994): Tumorpromotion. In: MARQUARDT, H.; SCHÄFER, S., G. (Hrsg.): *Lehrbuch der Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim: 148-177
- SHI, Y. E.; YAGER, J. D. (1989): Enhancement in rats by the liver tumor promoter ethinyl estradiol of a serum factor(s) which is stimulatory for hepatocyte DNA synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 160: 154-161
- SHI, Y. E.; YAGER, J. D. (1990): Regulation of rat hepatocyte epidermal growth factor receptor by the liver tumor promoter ethinyl estradiol. *Carcinogenesis* 11: 1103-1109
- SHIMOMURA, M.; HIGASHI, S.; MIZUMOTO, R. (1992): ³²P-Postlabeling analysis of DNA adducts in rats during estrogen-induced hepatocarcinogenesis and effect of tamoxifen on DNA adduct level. *Jpn. J. Cancer Research* 83: 438-444
- SHIOTA, G.; RHOADS, D. B.; WANG, T. C.; NAKAMURA, T.; SCHMIDT E. V. (1992): Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 373-377
- SOLT, D.; FARBER, E. (1976): New principles for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 263: 701-703
- SOULEIL, C.; PANJIEL, J. (1973): Effects of antigen dose on the presence of a particular BrdU-labelled DNA fraction in lymph node cells. *Exp. Cell Res.* 78: 462-466
- STAATS, D. A.; KING, G. A.; CONOLLY, R. B. (1990): Effect of aging on chloroform metabolism and tissue solubility. In: KUTZMANN, R. S.; WALL, H. G.; VINEGAR, A. (Hrsg.), *Toxic Hazards Research Unit Annual Report* (1990); AAMRL-TR-90-051: 151-160
- STEVENSON, D. E. (1995): The potential role of oxidative stress in nongenotoxic hepatocarcinogenesis in the mouse liver. *Prog. Clin. Biol. Res.* 331: 367-381
- STINCHECOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCH, K.; SCHWARZ, M. (1995): Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumor promotion in rat liver. *Carcinogenesis* 16: 1271-1275

- STRÖBEL, P.; KLIMEK, F.; ZERBAN, H.; KOPP-SCHNEIDER, A.; BANNASCH, P. (1998):
Xenomorphic hepatocellular precursors and neoplastic progression of tigroid cell foci induced in rats with low doses of N-nitrosomorpholine.
Carcinogenesis 19: 2069-2080
- TATEMATSU, M.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; MASUI, T.; ITO, N. (1987):
Placental Glutathione S-Transferase (GST-P) as a new marker for hepatocarcinogenesis: In vivo short-term screening for hepatocarcinogens.
Toxicologic Pathology 15: 60-68
- TATEMATSU, M.; YUKINORI, M.; INOUE, T.; SATOH, K.; SATO, K.; ITO, N. (1988):
Stable phenotypic expression of glutathione S-transferase placental type and unstable phenotypic expression of γ -glutamyltransferase in rat liver preneoplastic and neoplastic lesions.
Carcinogenesis 9: 215-220
- TEMPLIN, M. V.; JAMISON, K. C.; WOLF, D. C.; MORGAN, K. T.; BUTTERWORTH, B. E. (1996):
Comparison of chloroform-induced toxicity in the kidneys, liver, and nasal passages of male Osborne-Mendel and F-344 rats.
Cancer Letters 104: 71-78
- TENNANT, R.W.; MARGOLN, B. H.; SHELBY, M. D.; ZEIGER, E.; HASMANN, J. K.; SPALDING, J.; CASPARY, W.; RESNICK, R.; STASIEWICZ, S.; ANDERSON, B.; MINOR, R. (1987):
Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in genetic toxicity assays.
Science 236: 933-941
- TETER, K. P.; HOLLOWAY, D C.; SANDUSKY, G. E. (1995):
Assessment of PCNA (19A2) and Ki-67 (MIB1) cell proliferation markers in formalin fixed tissues.
J. Histotech. 18:2-6
- TROSKO, J. E.; GOODMAN, J. I. (1994):
Intercellular communication may facilitate apoptosis: Implications for tumor promotion.
Mol. Carcinogenesis 11: 8-12
- TSUDA, H.; OZAKI, K.; UWAGAWA, S.; YAMAGUCHI, S.; HAKOI, K.; AOKI, T.; KATO, T.; SATO, K.; ITO, N. (1992):
Effects of modifying agents on conformity of enzyme phenotype and proliferative potential in focal preneoplastic and neoplastic liver cell lesions in rats.
Jpn. J. Cancer Research 83: 1154-1165
- TUMANOSIS, C. F.; McMARTIN, D. N.; BUSH, B. (1985):
Lifetime toxicity of chloroform and bromodichloromethane when administered over a lifetime in rats.
Ecotoxicology and Environmental Safety 9: 233 -240
- VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P. A; MATZE-COK, P; WISSE-BREKELMANN, E. C. M; VAN GELEN, C. M.; KURVER, P. H. J.; BELLOT, S. M.; FIJNHEER, J.; VAN GORP, L. H. M.; KWEE, W. S.; LOS, J.; PTERSE, J. L.; RUITENBERG, H. M.; SCHAPERS, R. F. M.; SCHIPPER, M. E. I.; SOMSEN, J. G.; WILLIG, A. W.; ARIENS, A. T. (1992):
Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens. Results from the multicentre morphometric mammary carcinoma project.
Human Pathol. 23: 603-611

- VICKERS, A. E. M.; NELSON, K.; McCOY, Z.; LUCIER, G. W. (1989):
Changes in estrogen receptor, DNA ploidy, and estrogen metabolism in rat hepatocytes during a two - stage model for hepatocarcinogenesis using 17 α -ethinylestradiol as the promoting agent.
Cancer Research 49: 6512-6520
- WADA, N.; MARSMAN, D. S.; POPP, J. A. (1992):
Dose-related effects of the hepatocarcinogen, Wy-14,643, on peroxisomes and cell replication.
Fundamental and Applied Toxicology 18: 149-154
- WAKEFIELD, L. M.; WINOKUR, T. S.; HOLLANDS, R. S.; CHRISTOPHERSON, K.; LEVINSON, A. D.; SPORN, M. B. (1990):
Recombinant latent transforming growth factor beta has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution.
J. Clin. Invest. 86: 1976-1984
- WARD, J. M. (1981):
Morphology of foci of altered hepatocytes and naturally-occurring hepatocellular tumours in F344 rats.
Virchows Archiv Path. Anat. 390: 339-345
- WARD, J. M. (1983):
Increased susceptibility of livers of aged F344/NCr rats to the effects of phenobarbital on the incidence, morphology, and histochemistry of hepatocellular foci and neoplasms.
J. Natl. Cancer Inst. 71: 815-823
- WARD, J. M. (1985):
Proliferative lesions of the glandular stomach and liver in F344 rats fed diets containing Aroclor 1254.
Environmental Health Perspectives 60: 89-95
- WARD, J. M.; OHSHIMA, M. (1985):
Evidence for lack of promotion of the growth of the common naturally occurring basophilic focal hepatocellular proliferative lesions in aged F344/NCr rats by phenobarbital.
Carcinogenesis 6: 1255-1259
- WARD, J. M.; HAGIWARA, A.; ANDERSON, L. M.; LINDSEY, K.; DIWAN, B. A. (1988):
The chronic hepatic or renal toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate, acetaminophen, sodium barbital, and phenobarbital in male B6C3F1 mice: Autoradiographic, immunohistochemical, and biochemical evidence for levels of DNA synthesis not associated with carcinogenesis or tumor promotion.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 96: 494-506
- WARD, J. M.; HENNEMANN, J. R. (1990):
Naturally-occurring age-dependent glutathione S-transferase π immunoreactive hepatocytes in aging female F344 rat liver as potential promotable targets for non-genotoxic carcinogens.
Cancer Letters 52: 187-195
- WATANABE, K.; WILLIAMS, G. M. (1978):
Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by the liver tumor promoter phenobarbital: evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promoter acts on carcinogen-induced lesions.
J. Natl. Cancer Inst. 61: 1311-1314
- WEBER, E.; BANNASCH, P. (1994):
Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia and neoplasia induced by single oral exposures to N-nitrosomorpholine.
Carcinogenesis 15: 1219-1226

- WERLICH, T.; STILLER, K. J.; MACHNIK, G. (1998):
Experimental studies on the stem cell concept of liver regeneration. I:
Exp. Toxicol. Pathol. 50 (1): 73-77
- WHYSNER, J.; MONTANDON, F.; McCLAIN, R. M.; DOWNING, J.; VERNA, L. K.; STEWARD, R. E.; WILLIAMS, G. M. (1998):
Absence of DNA adduct formation by phenobarbital, polychlorinated biphenyls, and chlordane in mouse liver using the ³²P-Postlabeling assay.
Toxicology and Applied Pharmacology 114: 14-32
- WILLIAMS, G. M. (1976):
Functional markers and growth behavior of preneoplastic hepatocytes.
Cancer Research 36: 2540-2543
- WILLIAMS, G. M. (1982):
Phenotypic properties of preneoplastic rat liver lesions and applications to detection of carcinogens and tumor promoters.
Toxicologic Pathology 10: 3-10
- WIJSMAN, J. H.; JONKER, R. R.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C. J.; CORNELISSE, C. J.; VAN DIERENDONCK, J. H. (1993):
A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labeling of fragmented DNA.
J. Histochem. Cytochem. 41: 7-12
- WONG, A.; BASRUR, P.; SAFE, S. (1979):
The metabolically mediated DNA damage and subsequent DNA repair by 4-chlorobiphenyl in Chinese hamster ovary cells.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 24: 543-550
- WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. (1980):
Cell death: The significance of apoptosis.
Int. Rev. Cytol. 68: 251-307
- WYLLIE, A. H. (1994):
Death gets a break.
Nature 369: 272-273
- XU, Y. H.; CAMPBELL, H. A.; SATTLER, G. L.; HENDRICH, S.; MARONPOT, R.; SATO, K.; PITOT, H. C. (1990):
Quantitative stereological analysis of the effects of age and sex on multistage hepatocarcinogenesis in the rat by use of four cytochemical markers.
Cancer Research 50: 472-479
- YAGER, J. D.; CAMPBELL, H. A.; LONGNECKER, D. S.; ROEBUCK, B. D.; BENOIT, M.C. (1984):
Enhancement of hepatocarcinogenesis in female rats by ethinyl estradiol and mest ranol but not estradiol.
Cancer Research 44: 3862-3869
- YAGER, J. D.; ROEBUCK, B. D.; PALUSZCYK, T. L.; MEMOLI, V. A. (1986):
Effects of ethinyl estradiol and tamoxifen on liver DNA turnover and new synthesis and appearance of gamma glutamyl transpeptidase-positive foci in female rats.
Carcinogenesis 7: 2007-2014

- YAGER, J. D.; ZURLO, J.; SEWALL, C. H.; LUCIER, G. W.; HE, H.(1994):
Growth stimulation followed by growth inhibition in livers of female rats treated with ethinyl estradiol.
Carcinogenesis 15: 2117-2123
- YAMASAKI, H. (1991):
Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis.
Environmental Health Perspectives 93: 191-197
- ZAJICEK, G.; OREN, R.; WEINREB M. Jr. (1985):
The streaming liver.
Liver 1985 Dec; 5 (6): 293-300
- ZERBAN, H.; PREUSSMANN, R.; BANNASCH, P. (1988):
Quantitative morphometric comparison between the expression of two different "marker enzymes" in preneoplastic liver lesions induced in rats with low doses of N-nitrosodiethanolamine.
Cancer Letters: 43: 99-104
- ZERBAN, H.; RADIG, S.; KOPP-SCHNEIDER, A.; BANNASCH, P. (1994):
Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability.
Carcinogenesis 15: 2467-2473

9 ANHANG

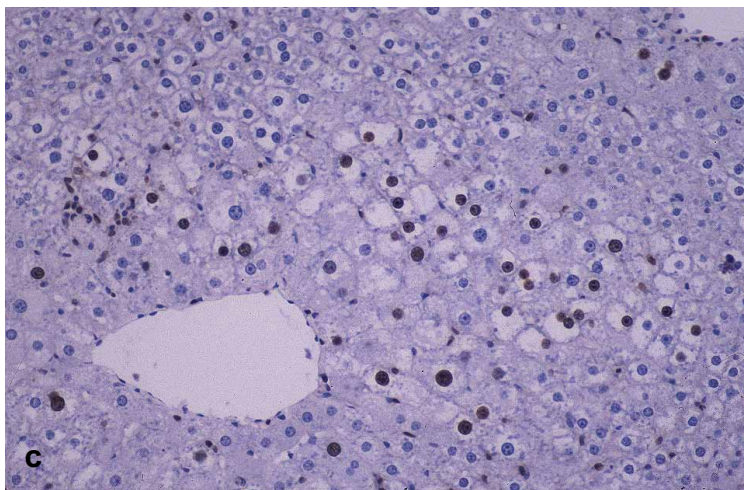
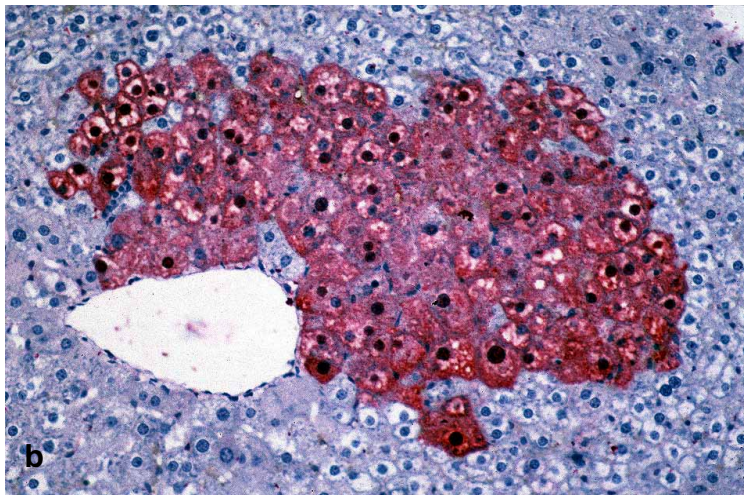
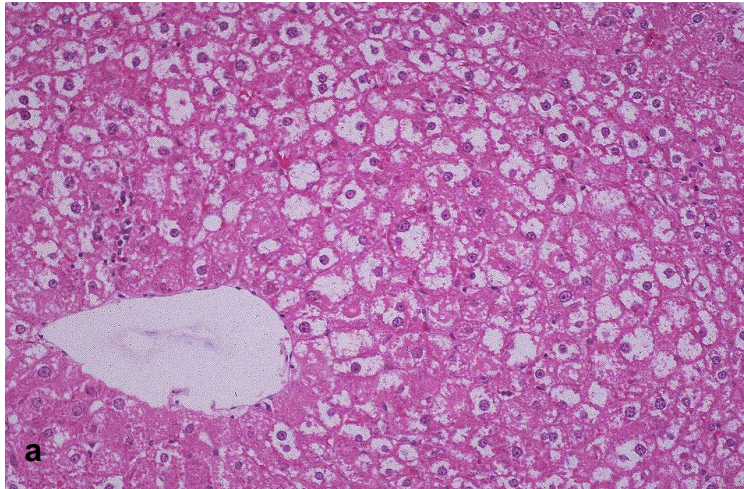


Abb. 33:
CCF (Phenobarbital 1 Woche)
a: HE-Färbung
b: Nachweis von GST-P,
LAB-Methode
c: Nachweis von BrdU,
LAB-Methode

Tab. 32: Einzeltierwerte: Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche bei Kontrolltieren

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 1 | 4,6 | 1,6 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,4 |
| 2 | 8,1 | 2,3 | 5,8 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 |
| 3 | 18,8 | 2,2 | 16,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 5,8 | 3,4 | 2,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 |
| 5 | 13,5 | 3,0 | 10,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 |
| 6 | 2,6 | 0,8 | 1,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 |
| 7 | 11,2 | 2,9 | 8,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 |
| 8 | 6,7 | 1,2 | 5,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 |
| 9 | 20,2 | 3,4 | 16,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,6 | 1,1 | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| geom. MW | 8,4 | 2,1 | 6,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,8 | 0,1 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 |
| SF | 2,0 | 1,7 | 2,3 | 1,4 | 1,4 | 1,0 | 2,6 | 2,2 | 2,4 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 2,2 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 61 | 8,9 | 3,7 | 5,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 |
| 62 | 21,5 | 4,1 | 17,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,1 | 0,2 | 1,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 |
| 63 | 5,2 | 1,7 | 3,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,2 | 0,0 | 2,2 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 1,2 |
| 64 | 3,5 | 1,8 | 1,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 65 | 8,4 | 2,7 | 5,7 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| 66 | 12,9 | 1,7 | 11,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 1,0 |
| 67 | 6,4 | 1,6 | 4,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,8 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,8 |
| 68 | 29,4 | 1,2 | 28,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 69 | 22,5 | 4,7 | 17,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,5 | 0,5 | 0,7 | 0,5 | 0,2 | 1,1 |
| 70 | 20,9 | 1,9 | 19,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| geom. MW | 11,3 | 2,3 | 8,3 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,6 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,6 |
| SF | 2,1 | 1,6 | 2,5 | 1,4 | 1,4 | 1,0 | 2,8 | 1,7 | 3,0 | 2,1 | 1,7 | 1,6 | 2,0 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 121 | 9,4 | 2,1 | 7,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,3 | 0,7 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 1,7 |
| 122 | 19,9 | 0,7 | 19,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,4 | 0,0 | 1,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 123 | 18,8 | 6,4 | 12,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 1,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 1,0 |
| 124 | 7,6 | 2,5 | 5,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 |
| 125 | 8,4 | 3,9 | 4,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| 126 | 6,5 | 1,3 | 5,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 |
| 127 | 6,1 | 0,9 | 5,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 |
| 129 | 5,1 | 1,0 | 4,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,9 |
| 130 | 16,7 | 3,6 | 13,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,3 | 0,6 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 1,5 |
| geom. MW | 9,7 | 1,9 | 7,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,7 |
| SF | 1,7 | 2,2 | 1,8 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 2,4 | 1,8 | 2,2 | 2,3 | 1,4 | 2,1 | 3,4 |

BCF = "basophilic cell focus; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 33: Einzeltierwerte: Zellzahl der FAH bei Kontrolltieren

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--------|-------|--------|-------|-------|------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 1 | 268,4 | 59,7 | 382,3 | * | * | * | 141,3 | * | 141,3 | * | * | * | 53,2 |
| 2 | 81,1 | 114,0 | 68,2 | 191,0 | 191,0 | * | 2013,0 | * | 2013,0 | * | * | * | 111,3 |
| 3 | 71,1 | 86,7 | 69,1 | * | * | * | 149,7 | * | 149,7 | * | * | * | * |
| 4 | 73,0 | 69,9 | 77,2 | * | * | * | 127,5 | * | 127,5 | * | * | * | 81,3 |
| 5 | 68,3 | 61,3 | 70,4 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 77,5 |
| 6 | 51,1 | 48,3 | 52,3 | * | * | * | 57,6 | * | 57,6 | * | * | * | 54,0 |
| 7 | 74,5 | 89,4 | 69,3 | * | * | * | 136,7 | * | 136,7 | * | * | * | 17,0 |
| 8 | 70,4 | 66,0 | 71,3 | * | * | * | 448,7 | * | 448,7 | * | * | * | 30,3 |
| 9 | 81,4 | 109,7 | 75,8 | * | * | * | 162,4 | 158,0 | 164,3 | * | * | * | 16,0 |
| geom. MW | 82,0 | 75,4 | 83,2 | 191,0 | 191,0 | * | 205,0 | 158,0 | 205,3 | * | * | * | 44,9 |
| SF | 1,6 | 1,3 | 1,8 | 1,0 | 1,0 | * | 2,9 | 1,0 | 2,9 | * | * | * | 2,1 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 61 | 114,5 | 119,6 | 110,8 | * | * | * | 120,0 | * | 120,0 | * | * | * | 75,3 |
| 62 | 86,6 | 80,3 | 88,1 | * | * | * | 281,2 | 27,0 | 313,0 | * | * | * | 64,5 |
| 63 | 65,6 | 76,3 | 60,2 | * | * | * | 607,9 | * | 607,9 | 182,5 | 258,0 | 107,0 | 48,6 |
| 64 | 106,6 | 102,4 | 110,8 | * | * | * | 209,3 | * | 209,3 | * | * | * | 29,0 |
| 65 | 59,7 | 48,0 | 65,3 | 95,0 | 95,0 | * | 92,0 | * | 92,0 | * | * | * | 76,0 |
| 66 | 73,4 | 79,3 | 72,6 | * | * | * | 102,0 | 102,0 | * | 382,0 | * | 382,0 | 41,8 |
| 67 | 61,6 | 42,8 | 67,8 | * | * | * | 55,0 | * | 55,0 | 92,0 | * | 92,0 | 34,0 |
| 68 | 67,3 | 64,0 | 67,4 | * | * | * | 443,8 | * | 443,8 | * | * | * | 16,0 |
| 69 | 81,1 | 77,4 | 82,1 | * | * | * | 214,3 | 118,5 | 310,0 | 491,0 | 127,5 | 1218,0 | 96,8 |
| 70 | 71,1 | 85,1 | 69,7 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 45,0 |
| geom. MW | 76,9 | 74,4 | 77,8 | 95,0 | 95,0 | * | 181,2 | 68,9 | 206,6 | 236,9 | 181,4 | 260,1 | 46,9 |
| SF | 1,3 | 1,4 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | * | 2,2 | 2,3 | 2,3 | 2,1 | 1,7 | 3,4 | 1,7 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 121 | 262,0 | 217,5 | 274,8 | * | * | * | 1908,0 | 305,0 | 2709,5 | 2143,5 | * | 2143,5 | 103,6 |
| 122 | 93,3 | 199,0 | 89,5 | * | * | * | 297,3 | * | 297,3 | * | * | * | * |
| 123 | 123,4 | 154,5 | 107,5 | * | * | * | 171,2 | 63,0 | 243,3 | 246,0 | * | 246,0 | 100,0 |
| 124 | 85,8 | 101,1 | 78,1 | * | * | * | 91,0 | * | 91,0 | 446,0 | * | 446,0 | * |
| 125 | 93,8 | 124,9 | 66,9 | * | * | * | 767,5 | * | 767,5 | * | * | * | 71,0 |
| 126 | 86,5 | 78,8 | 88,5 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 53,7 |
| 127 | 79,5 | 96,0 | 76,8 | * | * | * | 297,0 | * | 297,0 | * | * | * | 59,3 |
| 129 | 58,4 | 80,0 | 53,4 | * | * | * | 219,0 | * | 219,0 | * | * | * | 91,7 |
| 130 | 94,8 | 82,5 | 98,1 | * | * | * | 221,0 | 69,0 | 297,0 | 3377,5 | 56,0 | 5699,0 | 86,8 |
| geom. MW | 99,1 | 117,3 | 92,4 | * | * | * | 315,2 | 109,9 | 357,1 | 944,1 | 56,0 | 1076,0 | 78,7 |
| SF | 1,5 | 1,5 | 1,6 | * | * | * | 2,6 | 2,4 | 2,7 | 3,5 | 1,0 | 4,2 | 1,3 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 34: Einzeltierwerte: Labelling-Indizes (%) der FAH der Kontrolltiere

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 1 | 6,0 | 2,8 | 6,2 | * | * | * | 9,4 | * | 9,4 | * | * | * | 1,5 |
| 2 | 3,8 | 4,8 | 3,2 | 11,0 | 11,0 | * | 22,0 | * | 22,0 | * | * | * | 1,2 |
| 3 | 3,7 | 3,5 | 3,7 | * | * | * | 1,1 | * | 1,1 | * | * | * | * |
| 4 | 1,7 | 1,3 | 2,2 | * | * | * | 5,7 | * | 5,7 | * | * | * | 3,7 |
| 5 | 7,4 | 2,2 | 8,7 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 0,6 |
| 6 | 3,3 | 4,1 | 3,0 | * | * | * | 5,2 | * | 5,2 | * | * | * | 1,9 |
| 7 | 2,8 | 3,2 | 2,7 | * | * | * | 1,0 | * | 1,0 | * | * | * | 0,0 |
| 8 | 5,3 | 3,9 | 5,5 | * | * | * | 0,8 | * | 0,8 | * | * | * | 5,5 |
| 9 | 7,1 | 4,9 | 7,7 | * | * | * | 4,2 | 8,4 | 2,4 | * | * | * | 0,0 |
| geom. MW | 4,2 | 3,2 | 4,3 | 11,0 | 11,0 | * | 3,5 | 8,4 | 3,3 | * | * | * | 1,0 |
| SF | 1,6 | 1,5 | 1,6 | 1,0 | 1,0 | * | 3,3 | 1,0 | 3,3 | * | * | * | 3,8 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 61 | 2,9 | 1,1 | 4,4 | * | * | * | 0,8 | * | 0,8 | * | * | * | 0,4 |
| 62 | 4,6 | 6,6 | 4,2 | * | * | * | 15,4 | 14,8 | 15,5 | * | * | * | 3,9 |
| 63 | 5,1 | 6,4 | 4,3 | * | * | * | 6,3 | * | 6,3 | 14,0 | 17,1 | 17,1 | 7,8 |
| 64 | 3,8 | 2,9 | 4,5 | * | * | * | 7,8 | * | 7,8 | * | * | * | 0,0 |
| 65 | 3,2 | 1,3 | 3,9 | 0,0 | 0,0 | * | 5,4 | * | 5,4 | * | * | * | 0,0 |
| 66 | 1,7 | 0,4 | 2,0 | * | * | * | 7,8 | 7,8 | * | 18,3 | * | 18,3 | 1,8 |
| 67 | 4,2 | 3,1 | 4,4 | * | * | * | 0,6 | * | 0,6 | 5,4 | * | 5,4 | 0,0 |
| 68 | 7,3 | 1,9 | 7,5 | * | * | * | 9,5 | * | 9,5 | * | * | * | 0,0 |
| 69 | 7,1 | 4,8 | 7,6 | * | * | * | 9,8 | 13,1 | 8,5 | 10,3 | 7,1 | 11,0 | 1,7 |
| 70 | 4,4 | 2,7 | 4,7 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 0,0 |
| geom. MW | 4,1 | 2,3 | 4,5 | 0,0 | 0,0 | * | 4,9 | 11,5 | 4,5 | 11,0 | 11,0 | 11,7 | 0,6 |
| SF | 1,5 | 2,5 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | * | 3,0 | 1,4 | 3,3 | 1,7 | 1,9 | 1,8 | 4,8 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 121 | 11,8 | 4,4 | 13,5 | * | * | * | 27,5 | 4,3 | 28,8 | 13,0 | * | 13,0 | 2,1 |
| 122 | 4,9 | 4,0 | 5,0 | * | * | * | 7,1 | * | 7,1 | * | * | * | * |
| 123 | 5,1 | 4,5 | 5,6 | * | * | * | 5,8 | * | 5,8 | 14,2 | * | 14,2 | 0,7 |
| 124 | 1,8 | 2,7 | 1,3 | * | * | * | 3,3 | * | 3,3 | 0,0 | * | 0,0 | * |
| 125 | 2,4 | 2,0 | 3,0 | * | * | * | 5,1 | * | 5,1 | * | * | * | 4,2 |
| 126 | 6,3 | 6,9 | 6,2 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 3,1 |
| 127 | 2,8 | 3,8 | 2,6 | * | * | * | 5,1 | * | 5,1 | * | * | * | 1,3 |
| 129 | 4,3 | 0,0 | 5,8 | * | * | * | 5,5 | * | 5,5 | * | * | * | 0,6 |
| 130 | 3,1 | 2,9 | 3,1 | * | * | * | 3,2 | 4,3 | 3,0 | 9,7 | 3,6 | 9,8 | 5,3 |
| geom. MW | 4,1 | 2,6 | 4,2 | * | * | * | 6,0 | 4,3 | 6,0 | 5,7 | 3,6 | 4,1 | 1,9 |
| SF | 1,8 | 3,1 | 2,0 | * | * | * | 2,0 | 1,0 | 2,0 | 4,5 | 1,0 | 9,1 | 2,4 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 35: Apoptose-Indizes (%) der FAH der Kontrolltiere

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 1 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 2 | 0,039 | 0,097 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,025 | * | 0,025 | * | * | * | 0,000 |
| 3 | 0,018 | 0,000 | 0,021 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 4 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 5 | 0,028 | 0,000 | 0,035 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 6 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 7 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 8 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 9 | 0,085 | 0,152 | 0,066 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| geom. MW | 0,011 | 0,009 | 0,008 | 0,000 | 0,000 | * | 0,005 | 0,000 | 0,005 | * | * | * | 0,000 |
| SF | 3,400 | 4,520 | 3,130 | 1,000 | 1,000 | * | 1,910 | 1,000 | 1,910 | * | * | * | 1,000 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 61 | 0,023 | 0,052 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 62 | 0,037 | 0,000 | 0,045 | * | * | * | 0,198 | 0,000 | 0,200 | * | * | * | 0,000 |
| 63 | 0,073 | 0,000 | 0,119 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 64 | 0,059 | 0,122 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 65 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 66 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 67 | 0,068 | 0,000 | 0,082 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 68 | 0,013 | 0,000 | 0,013 | * | * | * | 0,056 | * | 0,056 | * | * | * | 0,000 |
| 69 | 0,037 | 0,000 | 0,046 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 70 | 0,018 | 0,000 | 0,021 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| geom. MW | 0,023 | 0,007 | 0,016 | 0,000 | 0,000 | * | 0,008 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SF | 2,920 | 3,590 | 3,900 | 1,000 | 1,000 | * | 4,380 | 1,000 | 4,730 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 121 | 0,099 | 0,153 | 0,087 | * | * | * | 0,018 | 0,328 | 0,000 | 0,070 | * | 0,070 | 0,000 |
| 122 | 0,019 | 0,000 | 0,020 | * | * | * | 0,168 | * | 0,168 | * | * | * | * |
| 123 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 124 | 0,049 | 0,124 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * |
| 125 | 0,038 | 0,062 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 126 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 127 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 129 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 130 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,035 | 0,000 | 0,035 | 0,000 |
| geom. MW | 0,012 | 0,012 | 0,007 | * | * | * | 0,008 | 0,036 | 0,006 | 0,014 | 0,000 | 0,014 | 0,000 |
| SF | 3,750 | 5,230 | 3,000 | * | * | * | 3,870 | 22,560 | 3,750 | 4,390 | 1,000 | 4,390 | 1,000 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 36: Einzeltierwerte: Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche nach Verabreichung von Phenobarbital

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 11 | 9,2 | 3,1 | 6,0 | 3,1 | 1,7 | 1,5 | 1,0 | 0,8 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 |
| 12 | 2,8 | 1,1 | 1,7 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 1,1 | 0,3 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 13 | 2,4 | 0,0 | 2,4 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 14 | 8,3 | 0,7 | 7,6 | 1,7 | 0,5 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,2 |
| 15 | 16,9 | 0,6 | 16,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 |
| 16 | 5,7 | 2,6 | 3,1 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 17 | 0,9 | 0,9 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 |
| 18 | 14,0 | 0,8 | 13,2 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| 19 | 8,2 | 2,1 | 6,2 | 2,1 | 1,5 | 0,6 | 1,8 | 0,9 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 |
| 20 | 13,1 | 1,6 | 11,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,6 |
| geom. MW | 6,1 | 1,0 | 3,9 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 |
| SF | 2,5 | 2,7 | 4,4 | 3,4 | 3,0 | 2,9 | 3,4 | 2,5 | 2,5 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 3,5 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 71 | 4,6 | 0,5 | 4,1 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 |
| 72 | 3,7 | 1,0 | 2,6 | 0,5 | 0,5 | 0,0 | 1,9 | 0,2 | 1,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 |
| 73 | 0,8 | 0,5 | 0,3 | 2,3 | 2,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 |
| 74 | 7,5 | 1,3 | 6,2 | 1,7 | 0,8 | 0,9 | 1,1 | 0,4 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 |
| 75 | 5,0 | 1,5 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 76 | 4,0 | 2,0 | 2,0 | 1,3 | 1,3 | 0,0 | 1,5 | 1,0 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,8 |
| 77 | 4,7 | 1,4 | 3,3 | 1,9 | 1,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,4 |
| 78 | 4,7 | 1,7 | 3,0 | 1,4 | 0,8 | 0,6 | 1,1 | 0,0 | 1,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,1 |
| 79 | 5,5 | 0,5 | 5,0 | 3,2 | 2,0 | 1,2 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 80 | 3,4 | 2,0 | 1,4 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 |
| geom. MW | 3,9 | 1,1 | 2,5 | 1,0 | 0,9 | 0,2 | 0,5 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,6 |
| SF | 1,8 | 1,8 | 2,5 | 2,5 | 2,3 | 2,9 | 3,2 | 2,2 | 2,9 | 1,3 | 1,3 | 1,0 | 2,3 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 131 | 10,7 | 0,9 | 9,9 | 1,7 | 1,5 | 0,3 | 1,2 | 0,9 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 |
| 132 | 2,1 | 0,8 | 1,3 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 |
| 133 | 12,5 | 2,9 | 9,6 | 4,9 | 3,8 | 1,2 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 134 | 1,1 | 0,0 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 0,2 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 135 | 3,3 | 0,7 | 2,6 | 5,2 | 2,2 | 3,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 |
| 136 | 2,2 | 1,7 | 0,5 | 4,7 | 4,7 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 |
| 137 | 9,1 | 0,3 | 8,8 | 1,0 | 0,8 | 0,3 | 1,3 | 0,0 | 1,3 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,0 |
| 138 | 12,1 | 1,2 | 10,8 | 3,0 | 2,7 | 0,2 | 1,2 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 139 | 1,3 | 0,3 | 0,9 | 2,2 | 1,3 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 |
| 140 | 9,6 | 3,0 | 4,4 | 2,2 | 1,5 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| geom. MW | 4,5 | 0,8 | 3,1 | 2,2 | 1,5 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,2 |
| SF | 2,7 | 3,0 | 3,2 | 2,1 | 2,3 | 2,7 | 2,9 | 2,0 | 2,8 | 1,8 | 1,0 | 1,8 | 3,0 |

BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 37: Einzeltierwerte: Zellzahl pro FAH-Querschnitt nach Verabreichung von Phenobarbital

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 11 | 101,3 | 122,3 | 90,5 | 151,9 | 104,0 | 206,6 | 112,8 | 106,3 | 139,0 | * | * | * | 60,7 |
| 12 | 64,1 | 94,0 | 44,2 | 1043,0 | * | 1043,0 | 70,8 | 98,0 | 61,7 | * | * | * | * |
| 13 | 73,3 | * | 73,3 | 139,0 | * | 139,0 | * | * | * | * | * | * | * |
| 14 | 63,2 | 66,0 | 62,9 | 58,0 | 60,5 | 57,0 | * | * | * | * | * | * | 75,5 |
| 15 | 73,1 | 109,0 | 71,8 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 60,6 |
| 16 | 60,4 | 50,0 | 69,2 | 413,0 | 413,0 | * | * | * | * | * | * | * | 35,0 |
| 17 | 79,5 | 79,5 | * | 167,0 | 167,0 | * | * | * | * | * | * | * | 68,6 |
| 18 | 135,6 | 52,3 | 140,4 | 94,0 | 59,0 | 129,0 | * | * | * | * | * | * | 58,0 |
| 19 | 90,7 | 167,9 | 65,0 | 211,3 | 175,4 | 301,0 | 153,5 | 173,0 | 134,0 | * | * | * | 140,3 |
| 20 | 68,7 | 63,5 | 69,5 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 59,7 |
| geom. MW | 78,5 | 82,8 | 72,9 | 190,7 | 128,4 | 201,2 | 107,0 | 121,7 | 104,7 | * | * | * | 65,1 |
| SF | 1,3 | 1,5 | 1,4 | 2,4 | 2,1 | 2,7 | 1,5 | 1,4 | 1,6 | * | * | * | 1,5 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 71 | 54,1 | 53,5 | 54,2 | 125,0 | 125,0 | * | 296,3 | * | 296,3 | * | * | * | 43,7 |
| 72 | 124,4 | 156,7 | 111,5 | 128,3 | 128,3 | * | 99,6 | 21,0 | 107,5 | * | * | * | 50,7 |
| 73 | 81,0 | 80,0 | 83,0 | 185,8 | 185,8 | * | * | * | * | * | * | * | 78,3 |
| 74 | 119,2 | 113,7 | 120,3 | 231,4 | 256,8 | 211,2 | 115,8 | 67,5 | 140,0 | * | * | * | 24,7 |
| 75 | 76,4 | 47,8 | 88,6 | 46,0 | 46,0 | * | 113,7 | * | 113,7 | * | * | * | 32,0 |
| 76 | 67,0 | 52,0 | 82,0 | 86,4 | 86,4 | * | 116,5 | 86,0 | 177,5 | 1120,0 | 1120,0 | * | 68,3 |
| 77 | 62,0 | 92,4 | 48,6 | 60,6 | 60,6 | * | * | * | * | * | * | * | 36,5 |
| 78 | 56,8 | 98,0 | 34,3 | 81,4 | 60,3 | 113,0 | 98,5 | * | 98,5 | * | * | * | 58,5 |
| 79 | 53,5 | 50,5 | 53,8 | 106,7 | 64,4 | 174,4 | 317,0 | * | 317,0 | * | * | * | * |
| 80 | 68,6 | 86,1 | 42,3 | 120,0 | 120,0 | * | * | * | * | * | * | * | 69,0 |
| geom. MW | 73,0 | 77,1 | 66,4 | 105,6 | 98,2 | 160,8 | 146,0 | 49,6 | 161,1 | 1120,0 | 1120,0 | * | 48,1 |
| SF | 1,4 | 1,5 | 4,5 | 1,6 | 1,7 | 1,4 | 1,7 | 2,1 | 1,6 | 1,0 | 1,0 | * | 1,5 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 131 | 86,2 | 81,3 | 86,6 | 126,7 | 92,0 | 300,0 | 66,3 | 70,7 | 53,0 | * | * | * | 116,5 |
| 132 | 129,1 | 179,0 | 99,2 | 157,0 | 10,0 | 304,0 | * | * | * | 1638,0 | * | 1638,0 | * |
| 133 | 79,4 | 109,3 | 70,4 | 146,4 | 147,2 | 143,8 | 104,0 | * | 104,0 | * | * | * | * |
| 134 | 59,6 | * | 59,6 | 65,2 | 71,8 | 32,0 | 38,0 | * | 48,0 | * | * | * | * |
| 135 | 77,6 | 59,5 | 82,7 | 182,7 | 135,0 | 218,5 | 116,0 | * | 116,0 | * | * | * | 31,0 |
| 136 | 92,1 | 85,6 | 115,0 | 65,3 | 65,3 | * | 901,0 | * | 901,0 | * | * | * | 53,0 |
| 137 | 101,5 | 94,0 | 101,8 | 173,3 | 57,0 | 522,0 | 652,8 | * | 652,8 | 605,0 | * | 605,0 | * |
| 138 | 109,0 | 102,8 | 109,7 | 157,4 | 141,8 | 329,0 | 339,2 | * | 339,2 | * | * | * | * |
| 139 | 87,8 | 52,0 | 99,7 | 407,6 | 52,5 | 881,0 | * | * | * | * | * | * | 25,0 |
| 140 | 77,4 | 101,8 | 61,1 | 76,8 | 94,3 | 41,7 | * | * | * | * | * | * | * |
| geom. MW | 88,1 | 90,7 | 86,4 | 134,5 | 71,4 | 202,7 | 179,7 | 70,7 | 180,0 | 995,4 | * | 995,4 | 46,8 |
| SF | 1,2 | 1,4 | 1,3 | 1,8 | 2,2 | 3,0 | 3,3 | 1,0 | 3,3 | 2,0 | * | 2,0 | 2,0 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 38: Einzeltierwerte: Labelling-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von Phenobarbital

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 11 | 11,4 | 13,7 | 9,8 | 17,3 | 19,4 | 16,2 | 12,2 | 14,1 | 6,5 | * | * | * | 11,5 |
| 12 | 12,0 | 17,6 | 4,2 | 11,8 | * | 11,8 | 2,1 | 3,1 | 1,6 | * | * | * | * |
| 13 | 7,3 | * | 7,3 | 18,7 | * | 18,7 | * | * | * | * | * | * | * |
| 14 | 7,7 | 20,2 | 6,4 | 6,4 | 6,6 | 6,3 | * | * | * | * | * | * | 7,4 |
| 15 | 3,1 | 1,4 | 3,2 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 1,3 |
| 16 | 23,7 | 31,6 | 18,8 | 29,3 | 29,3 | * | * | * | * | * | * | * | 8,6 |
| 17 | 4,1 | 4,1 | * | 3,6 | 3,6 | * | * | * | * | * | * | * | 8,8 |
| 18 | 11,4 | 19,7 | 11,2 | 27,1 | 16,9 | 31,8 | * | * | * | * | * | * | 0,0 |
| 19 | 7,6 | 6,7 | 8,4 | 18,2 | 8,9 | 31,7 | 15,1 | 15,2 | 14,9 | * | * | * | 6,4 |
| 20 | 5,8 | 9,7 | 5,3 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 2,8 |
| geom. MW | 8,1 | 10,1 | 7,3 | 13,7 | 11,3 | 16,8 | 7,3 | 8,7 | 5,,39 | * | * | * | 3,5 |
| SF | 1,8 | 2,7 | 1,7 | 2,1 | 2,2 | 1,9 | 2,9 | 2,5 | 3,1 | * | * | * | 4,3 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 71 | 1,8 | 2,8 | 1,7 | 12,0 | 12,0 | * | 11,9 | * | 11,9 | * | * | * | 1,5 |
| 72 | 8,4 | 12,8 | 6,0 | 12,7 | 12,7 | * | 6,8 | 0,0 | 6,9 | * | * | * | 6,6 |
| 73 | 6,6 | 6,3 | 7,2 | 5,3 | 5,3 | * | * | * | * | * | * | * | 6,4 |
| 74 | 15,0 | 12,4 | 15,5 | 32,1 | 34,3 | 29,9 | 20,6 | 43,7 | 15,0 | * | * | * | 16,2 |
| 75 | 13,6 | 6,3 | 15,3 | 10,0 | 10,0 | * | 8,8 | * | 8,8 | * | * | * | 21,9 |
| 76 | 6,3 | 4,6 | 7,3 | 5,1 | 5,1 | * | 13,2 | 9,3 | 16,9 | 5,5 | 5,5 | * | 4,9 |
| 77 | 4,7 | 5,9 | 3,7 | 1,7 | 1,7 | * | * | * | * | * | * | * | 5,5 |
| 78 | 4,6 | 3,6 | 6,1 | 10,3 | 6,6 | 13,3 | 7,6 | * | 7,6 | * | * | * | 2,6 |
| 79 | 6,1 | 1,0 | 6,6 | 6,6 | 4,3 | 7,9 | 3,6 | * | 3,6 | * | * | * | * |
| 80 | 3,2 | 2,7 | 4,7 | 2,5 | 2,5 | * | * | * | * | * | * | * | 1,4 |
| geom. MW | 6,0 | 4,6 | 6,3 | 7,2 | 6,6 | 14,7 | 9,1 | 3,9 | 9,1 | 5,5 | 5,5 | * | 5,1 |
| SF | 1,9 | 2,1 | 1,9 | 2,4 | 2,4 | 2,0 | 1,7 | 18,8 | 1,7 | 1,0 | 1,0 | * | 2,6 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 131 | 8,0 | 1,2 | 8,5 | 6,2 | 4,8 | 8,3 | 8,3 | 9,9 | 53,0 | * | * | * | 1,3 |
| 132 | 2,7 | 3,2 | 2,2 | 34,7 | 0,0 | 35,9 | * | * | * | 14,0 | * | 14,0 | * |
| 133 | 14,8 | 15,9 | 14,3 | 20,8 | 23,1 | 13,4 | 8,7 | * | 8,7 | * | * | * | * |
| 134 | 0,7 | * | 0,7 | 1,0 | 1,1 | 0,0 | 2,1 | * | 2,1 | * | * | * | * |
| 135 | 7,2 | 4,2 | 7,8 | 6,6 | 1,9 | 8,8 | 0,4 | * | 0,4 | * | * | * | 4,8 |
| 136 | 7,5 | 8,7 | 4,3 | 5,2 | 5,2 | * | 7,0 | * | 7,0 | * | * | * | 4,6 |
| 137 | 4,2 | 6,4 | 4,2 | 13,7 | 9,9 | 14,9 | 4,4 | * | 4,4 | 4,8 | * | 4,8 | * |
| 138 | 5,2 | 3,3 | 5,5 | 5,6 | 5,7 | 5,2 | 6,0 | * | 6,0 | * | * | * | * |
| 139 | 2,6 | 0,0 | 3,0 | 6,1 | 1,4 | 6,5 | * | * | * | * | * | * | 0,0 |
| 140 | 5,8 | 6,7 | 4,7 | 8,7 | 7,1 | 16,0 | * | * | * | * | * | * | * |
| geom. MW | 4,6 | 3,3 | 4,3 | 7,6 | 3,2 | 7,0 | 3,8 | 9,9 | 5,0 | 8,2 | * | 8,2 | 1,4 |
| SF | 2,3 | 3,9 | 2,3 | 2,6 | 4,1 | 4,7 | 2,9 | 1,0 | 4,3 | 2,1 | * | 2,1 | 5,1 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab.39: Einzeltierwerte: Apoptose-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von Phenobarbital

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 11 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,132 | 0,120 | 0,138 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 12 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * |
| 13 | 0,303 | * | 0,303 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * |
| 14 | 0,140 | 0,000 | 0,154 | 0,246 | 0,000 | 0,351 | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 15 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 16 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,242 | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 17 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 18 | 0,054 | 0,637 | 0,041 | 0,532 | 1,695 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 19 | 0,118 | 0,085 | 0,147 | 0,203 | 0,000 | 0,498 | 0,109 | 0,000 | 0,249 | * | * | * | 0,000 |
| 20 | 0,029 | 0,000 | 0,033 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 0,279 |
| geom. MW | 0,020 | 0,010 | 0,024 | 0,031 | 0,038 | 0,034 | 0,012 | 0,000 | 0,016 | * | * | * | 0,007 |
| SF | 5,910 | 6,430 | 6,150 | 9,300 | 13,770 | 10,820 | 6,740 | 1,000 | 10,860 | * | * | * | 4,490 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 71 | 0,092 | 0,000 | 0,103 | 1,600 | 1,600 | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 72 | 0,115 | 0,319 | 0,000 | 0,260 | 0,260 | * | 0,091 | 0,000 | 0,093 | * | * | * | 0,000 |
| 73 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 74 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 75 | 0,065 | 0,348 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 76 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 |
| 77 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 78 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 79 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,288 | 0,000 | 0,459 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 80 | 0,097 | 0,129 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| geom. MW | 0,014 | 0,014 | 0,006 | 0,017 | 0,011 | 0,019 | 0,006 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 |
| SF | 5,030 | 7,390 | 2,790 | 10,750 | 8,900 | 15,460 | 3,240 | 1,000 | 3,280 | 1,000 | 1,000 | * | 1,000 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 131 | 0,031 | 0,000 | 0,034 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,377 | 0,000 | 1,887 | * | * | * | 0,000 |
| 132 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * |
| 133 | 0,029 | 0,091 | 0,000 | 0,121 | 0,157 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 134 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 135 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,039 | 0,000 | 0,057 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 136 | 0,121 | 0,167 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 137 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * |
| 138 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,053 | 0,064 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 139 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,035 | 0,000 | 0,038 | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 140 | 0,086 | 0,164 | 0,000 | 0,145 | 0,000 | 0,800 | * | * | * | * | * | * | * |
| geom. MW | 0,011 | 0,013 | 0,005 | 0,016 | 0,008 | 0,012 | 0,008 | 0,000 | 0,010 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| SF | 4,130 | 5,870 | 1,970 | 1,670 | 3,950 | 6,630 | 5,580 | 1,000 | 10,250 | 1,000 | * | 1,000 | 1,000 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 40: Einzeltierwerte: Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche nach Verabreichung von Chloroform

| 1 Woche | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 21 | 5,7 | 3,1 | 2,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | |
| 22 | 4,0 | 1,5 | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,3 | 1,3 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | |
| 24 | 25,1 | 5,9 | 19,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | |
| 25 | 3,7 | 0,9 | 2,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 0,0 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | |
| 26 | 7,8 | 2,5 | 5,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | |
| 27 | 6,1 | 1,9 | 4,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,8 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | |
| 28 | 6,6 | 3,2 | 3,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,7 | |
| 29 | 12,0 | 2,9 | 9,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,9 | 0,3 | 2,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | |
| 30 | 8,9 | 2,2 | 6,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,9 | 0,0 | 1,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | |
| geom. MW | 7,5 | 2,4 | 4,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,2 | 0,8 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,4 | |
| SF | 1,8 | 1,7 | 2,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 3,2 | 2,4 | 3,0 | 2,1 | 1,0 | 2,1 | 2,0 | |

| 4 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 82 | 6,0 | 1,1 | 4,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 21,0 | 0,6 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 1,1 | |
| 83 | 13,4 | 1,6 | 11,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | * | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | |
| 86 | 9,6 | 1,0 | 8,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | |
| 89 | 31,0 | 1,3 | 29,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | |
| 90 | 9,0 | 0,8 | 8,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 1,3 | |
| geom. MW | 11,6 | 1,1 | 10,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,4 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,9 | |
| SF | 1,9 | 1,3 | 2,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 2,1 | 14,5 | 2,0 | 1,6 | 1,0 | 1,6 | 2,3 | |

| 13 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 141 | 5,7 | 1,8 | 3,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 0,0 | 1,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | |
| 142 | 27,6 | 4,0 | 23,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,6 | 0,3 | 1,2 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,6 | |
| 145 | 20,9 | 3,6 | 17,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | |
| 146 | 13,5 | 1,9 | 11,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | |
| 147 | 12,5 | 1,9 | 10,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 1,7 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 1,9 | |
| 149 | 8,3 | 1,5 | 6,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 0,3 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | |
| 150 | 15,4 | 1,9 | 13,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,5 | |
| geom. MW | 13,2 | 2,2 | 10,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,1 | 0,1 | 1,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,8 | |
| SF | 1,7 | 1,5 | 1,8 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 1,7 | 1,9 | 2,1 | 1,0 | 2,1 | 2,3 | |

BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 41: Einzeltierwerte: Zellzahlen pro FAH/Querschnitt nach Verabreichung von Chloroform

| 1 Woche | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 21 | 62,6 | 65,7 | 58,9 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 18,0 | |
| 22 | 70,7 | 67,5 | 72,6 | * | * | * | 115,6 | 135,6 | 90,5 | * | * | * | 59,5 | |
| 24 | 105,6 | 105,9 | 105,6 | * | * | * | 3215,5 | * | 3215,5 | * | * | * | 67,0 | |
| 25 | 129,8 | 116,8 | 134,2 | * | * | * | 67,4 | * | 67,4 | * | * | * | 52,0 | |
| 26 | 69,0 | 56,9 | 74,8 | * | * | * | 67,7 | * | 67,7 | * | * | * | 21,0 | |
| 27 | 57,5 | 46,9 | 62,4 | * | * | * | 45,0 | * | 45,0 | 193,5 | * | 193,5 | * | |
| 28 | 109,3 | 142,1 | 78,9 | * | * | * | 103,0 | * | 103,0 | 128,0 | * | 128,0 | 27,0 | |
| 29 | 114,7 | 113,5 | 115,1 | * | * | * | 395,9 | 141,0 | 421,4 | * | * | * | 31,0 | |
| 30 | 75,7 | 80,7 | 74,1 | * | * | * | 98,1 | * | 98,1 | * | * | * | 62,0 | |
| geom. MW | 84,9 | 83,2 | 83,2 | * | * | * | 153,3 | 138,3 | 149,9 | 157,4 | * | 157,4 | 37,7 | |
| SF | 1,4 | 1,5 | 1,3 | * | * | * | 4,0 | 1,0 | 4,1 | 1,3 | * | 1,3 | 1,7 | |

| 4 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 82 | 54,0 | 83,6 | 47,6 | * | * | * | 69,5 | 67,0 | 70,3 | 344,0 | * | 344,0 | 63,0 | |
| 83 | 93,4 | 113,1 | 90,7 | * | * | * | 2732,0 | * | 2732,0 | 364,0 | * | 364,0 | 56,0 | |
| 86 | 99,9 | 322,0 | 74,0 | * | * | * | 539,5 | * | 539,5 | * | * | * | 49,8 | |
| 89 | 97,0 | 138,8 | 95,2 | * | * | * | 410,0 | * | 410,0 | * | * | * | 108,8 | |
| 90 | 77,6 | 66,0 | 78,7 | * | * | * | 67,5 | * | 67,5 | 141,0 | * | 141,0 | 64,0 | |
| geom. MW | 82,4 | 122,8 | 75,1 | * | * | * | 309,4 | 67,0 | 310,1 | 260,4 | * | 260,4 | 65,7 | |
| SF | 1,3 | 1,8 | 1,3 | * | * | * | 4,7 | 1,0 | 4,7 | 1,7 | * | 1,7 | 1,4 | |

| 13 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 141 | 65,4 | 70,2 | 63,2 | * | * | * | 136,6 | * | 136,6 | * | * | * | 93,0 | |
| 142 | 102,0 | 139,7 | 95,6 | * | * | * | 161,2 | 52,0 | 188,5 | 204,5 | * | 204,5 | 35,0 | |
| 145 | 106,6 | 96,8 | 108,7 | * | * | * | 109,8 | * | 109,8 | * | * | * | 95,3 | |
| 146 | 101,8 | 66,0 | 107,7 | * | * | * | 217,0 | * | 217,0 | * | * | * | 67,3 | |
| 147 | 99,0 | 127,9 | 93,7 | * | * | * | 128,3 | * | 128,3 | 139,0 | * | 139,0 | 145,4 | |
| 149 | 84,4 | 71,2 | 87,3 | * | * | * | 656,6 | 2589,0 | 173,5 | * | * | * | 52,0 | |
| 150 | 87,7 | 135,8 | 80,9 | * | * | * | 172,3 | * | 172,3 | * | * | * | 64,8 | |
| geom. MW | 91,4 | 96,4 | 89,7 | * | * | * | 185,7 | 366,9 | 157,0 | 168,6 | * | 168,6 | 72,2 | |
| SF | 1,2 | 1,4 | 1,2 | * | * | * | 1,8 | 15,9 | 1,3 | 1,3 | * | 1,3 | 1,6 | |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 42: Einzeltierwerte: Labelling-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von Chloroform

| 1 Woche | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 21 | 10,3 | 9,3 | 11,7 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 5,6 | |
| 22 | 21,9 | 15,6 | 25,5 | * | * | * | 19,1 | 19,0 | 19,3 | * | * | * | 9,2 | |
| 24 | 16,9 | 8,5 | 19,4 | * | * | * | 7,0 | * | 7,0 | * | * | * | 4,5 | |
| 25 | 19,3 | 22,5 | 18,3 | * | * | * | 25,5 | * | 25,5 | * | * | * | 31,7 | |
| 26 | 6,6 | 4,8 | 7,3 | * | * | * | 7,4 | * | 7,4 | * | * | * | 4,8 | |
| 27 | 9,4 | 7,9 | 9,9 | * | * | * | 31,1 | * | 31,1 | 24,3 | * | 24,3 | * | |
| 28 | 20,1 | 23,1 | 15,1 | * | * | * | 33,0 | * | 33,0 | 40,2 | * | 40,2 | 21,0 | |
| 29 | 9,0 | 9,0 | 9,0 | * | * | * | 31,8 | 16,3 | 32,3 | * | * | * | 0,0 | |
| 30 | 8,6 | 8,5 | 8,6 | * | * | * | 19,2 | * | 19,2 | * | * | * | 15,3 | |
| geom. MW | 12,4 | 10,7 | 12,8 | * | * | * | 18,8 | 17,6 | 18,9 | 31,3 | * | 31,3 | 6,0 | |
| SF | 1,6 | 1,7 | 1,5 | * | * | * | 1,9 | 1,1 | 1,9 | 1,4 | * | 1,4 | 5,2 | |

| 4 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 82 | 9,9 | 5,5 | 11,6 | * | * | * | 7,9 | 6,0 | 8,5 | 17,7 | * | 17,7 | 11,4 | |
| 83 | 4,1 | 3,2 | 4,2 | * | * | * | 1,4 | * | 1,4 | 19,8 | * | 19,8 | 1,8 | |
| 86 | 17,7 | 17,7 | 17,7 | * | * | * | 17,1 | * | 17,1 | * | * | * | 9,5 | |
| 89 | 6,6 | 3,3 | 6,8 | * | * | * | 1,2 | * | 1,2 | * | * | * | 1,7 | |
| 90 | 8,0 | 4,5 | 8,3 | * | * | * | 8,1 | * | 8,1 | 9,9 | * | 9,9 | 4,4 | |
| geom. MW | 8,2 | 5,4 | 8,7 | * | * | * | 4,5 | 6,0 | 4,6 | 15,2 | * | 15,2 | 4,3 | |
| SF | 1,7 | 2,0 | 1,7 | * | * | * | 3,2 | 1,0 | 3,3 | 1,5 | * | 1,5 | 2,5 | |

| 13 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 141 | 11,0 | 7,6 | 12,7 | * | * | * | 25,8 | * | 25,8 | * | * | * | 15,1 | |
| 142 | 8,3 | 6,1 | 8,8 | * | * | * | 14,6 | 13,5 | 14,7 | 21,3 | * | 21,3 | 11,4 | |
| 145 | 11,4 | 15,4 | 10,6 | * | * | * | 13,4 | * | 13,4 | * | * | * | 17,1 | |
| 146 | 9,5 | 18,4 | 8,7 | * | * | * | 0,5 | * | 0,5 | * | * | * | 11,9 | |
| 147 | 4,5 | 5,3 | 4,3 | * | * | * | 4,7 | * | 4,7 | 13,7 | * | 13,7 | 2,8 | |
| 149 | 9,2 | 11,2 | 8,9 | * | * | * | 20,9 | 23,9 | 9,7 | * | * | * | 19,2 | |
| 150 | 3,8 | 4,9 | 3,6 | * | * | * | 10,3 | * | 10,3 | * | * | * | 1,2 | |
| geom. MW | 7,7 | 8,7 | 7,5 | * | * | * | 8,1 | 17,9 | 7,3 | 17,1 | * | 17,1 | 8,1 | |
| SF | 1,6 | 1,7 | 1,6 | * | * | * | 4,0 | 1,5 | 3,8 | 1,4 | * | 1,4 | 2,9 | |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 43: Einzeltierwerte: Apoptose-Indizes (%) der FAH nach der Verabreichung von Chloroform

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 21 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 22 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 24 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,031 | * | 0,031 | * | * | * | 0,000 |
| 25 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 26 | 0,043 | 0,000 | 0,058 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 27 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * |
| 28 | 0,000 | 0,054 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 29 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 30 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,403 |
| geom. MW | 0,005 | 0,005 | 0,006 | * | * | * | 0,005 | 0,000 | 0,005 | 0,000 | * | 0,000 | 0,007 |
| SF | 2,210 | 2,380 | 2,570 | * | * | * | 2,060 | 1,000 | 2,060 | 1,000 | * | 1,000 | 5,110 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 82 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 83 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,275 | * | 0,275 | 0,000 |
| 86 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 89 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 90 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| geom. MW | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,016 | * | 0,016 | 0,000 |
| SF | 1,000 | 1,000 | 1,000 | * | * | * | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 11,500 | * | 11,500 | 1,000 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 141 | 0,081 | 0,238 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 142 | 0,011 | 0,000 | 0,014 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,244 | * | 0,244 | 0,000 |
| 145 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 146 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 147 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 149 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,457 | 0,579 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 150 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| geom. MW | 0,007 | 0,007 | 0,005 | * | * | * | 0,008 | 0,048 | 0,000 | 0,031 | * | 0,031 | 0,000 |
| SF | 3,120 | 4,680 | 1,610 | * | * | * | 6,000 | 33,710 | 1,000 | 18,300 | * | 18,300 | 1,000 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 44: Einzeltierwerte: Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche nach Verabreichung von Wy-eth-14,643

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 31 | 10,3 | 1,3 | 9,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,2 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 |
| 32 | 13,5 | 0,2 | 13,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,7 | 0,0 | 2,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 33 | 10,1 | 1,0 | 9,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 0,0 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 |
| 34 | 8,6 | 0,5 | 8,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,4 |
| 35 | 16,8 | 0,7 | 16,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 |
| 36 | 17,5 | 1,7 | 15,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,1 |
| 37 | 28,7 | 3,0 | 25,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,2 | 0,0 | 2,2 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 1,6 |
| 38 | 81,7 | 0,5 | 81,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,4 | 0,0 | 1,4 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 2,1 |
| 39 | 17,9 | 0,2 | 17,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 3,2 |
| 40 | 12,5 | 0,0 | 12,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| geom. MW | 16,9 | 0,6 | 15,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,1 | 1,0 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 1,0 |
| SF | 1,9 | 2,8 | 2,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 2,2 | 1,3 | 2,3 | 1,5 | 1,0 | 1,5 | 3,1 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 91 | 10,1 | 0,2 | 9,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 |
| 92 | 15,8 | 0,7 | 15,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,4 | 0,2 | 3,2 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,2 |
| 93 | 17,8 | 6,7 | 11,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 0,0 | 3,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 1,8 |
| 94 | 4,4 | 0,8 | 3,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,9 | 0,0 | 1,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 |
| 95 | 12,3 | 1,8 | 10,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,8 | 0,0 | 1,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 96 | 25,5 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 1,5 | 0,0 | 1,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 97 | 14,1 | 11,2 | 2,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,8 | 0,4 | 0,0 | 0,4 | 1,3 |
| 98 | 3,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,8 | 0,0 | 1,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 99 | 11,6 | 3,8 | 7,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,8 | 0,2 | 1,6 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 1,6 |
| 100 | 8,8 | 2,1 | 6,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,9 | 0,0 | 1,9 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,2 |
| geom. MW | 10,7 | 1,0 | 7,8 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 1,8 | 0,1 | 1,7 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,5 |
| SF | 1,9 | 5,3 | 2,0 | 1,3 | 1,0 | 1,3 | 1,5 | 1,4 | 1,5 | 2,1 | 1,6 | 1,8 | 3,2 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 151 | 15,9 | 2,3 | 13,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 |
| 152 | 13,8 | 5,5 | 8,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,6 |
| 153 | 9,4 | 0,9 | 8,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 154 | 19,7 | 7,7 | 12,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,4 |
| 155 | 19,6 | 8,2 | 11,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,6 |
| 156 | 25,4 | 12,7 | 12,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,6 | 0,0 | 2,6 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 2,9 |
| 157 | 30,0 | 10,3 | 19,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,5 | 0,3 | 2,3 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 1,3 |
| 158 | 8,5 | 0,3 | 8,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 6,0 | 0,5 | 5,5 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 2,5 |
| 159 | 5,6 | 0,7 | 4,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 4,8 |
| 160 | 13,4 | 1,0 | 12,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,3 | 0,0 | 2,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 |
| geom. MW | 14,4 | 2,7 | 10,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,8 | 0,1 | 1,7 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 1,6 |
| SF | 1,7 | 3,8 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 2,0 | 1,0 | 2,0 | 2,4 |

BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 45: Einzeltierwerte: Zellzahl pro FAH-Querschnitt nach Verabreichung von Wyeth-14,643

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 31 | 79,8 | 111,5 | 75,1 | * | * | * | 175,7 | 79,0 | 224,0 | * | * | * | 97,6 |
| 32 | 75,3 | 217,0 | 72,7 | * | * | * | 284,3 | * | 284,3 | * | * | * | 75,0 |
| 33 | 60,9 | 61,8 | 60,8 | * | * | * | 90,7 | * | 90,7 | * | * | * | 46,0 |
| 34 | 62,4 | 92,0 | 60,6 | * | * | * | 814,5 | * | 814,5 | * | * | * | 97,5 |
| 35 | 98,2 | 141,3 | 96,3 | * | * | * | 156,0 | * | 156,0 | * | * | * | 52,7 |
| 36 | 77,1 | 140,9 | 70,4 | * | * | * | 132,7 | * | 132,7 | * | * | * | 104,3 |
| 37 | 93,5 | 146,9 | 87,1 | * | * | * | 177,8 | * | 177,8 | 313,0 | * | 313,0 | 55,1 |
| 38 | 18,4 | 93,0 | 18,0 | * | * | * | 309,5 | * | 309,5 | 241,0 | * | 241,0 | 99,1 |
| 39 | 64,2 | 25,0 | 64,7 | * | * | * | 133,3 | * | 133,3 | 135,0 | * | 135,0 | 59,0 |
| 40 | 80,4 | * | 80,4 | * | * | * | 638,0 | * | 638,0 | * | * | * | * |
| geom. MW | 65,9 | 99,2 | 64,8 | * | * | * | 226,6 | 79,0 | 232,2 | 216,8 | * | 216,8 | 72,9 |
| SF | 1,6 | 1,9 | 1,6 | * | * | * | 2,0 | 1,0 | 2,0 | 1,5 | * | 1,5 | 1,4 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 91 | 66,3 | 55,0 | 66,6 | * | * | * | 123,2 | * | 123,2 | * | * | * | 88,0 |
| 92 | 73,8 | 39,7 | 75,4 | * | * | * | 705,9 | 55,0 | 752,4 | 412,0 | * | 412,0 | 36,0 |
| 93 | 79,7 | 75,2 | 82,3 | * | * | * | 252,7 | * | 252,7 | 112,0 | * | 112,0 | 61,7 |
| 94 | 83,9 | 71,0 | 86,6 | * | * | * | 154,9 | * | 154,9 | * | * | * | 46,4 |
| 95 | 62,0 | 73,0 | 60,1 | * | * | * | 110,6 | * | 110,6 | * | * | * | 43,0 |
| 96 | 103,7 | * | 103,7 | 159,0 | * | 159,0 | 398,4 | * | 398,4 | * | * | * | * |
| 97 | 110,0 | 112,5 | 100,2 | * | * | * | 1240,5 | * | 1240,5 | 367,0 | * | 367,0 | 36,4 |
| 98 | 89,8 | * | 89,8 | * | * | * | 1218,9 | * | 1218,9 | * | * | * | * |
| 99 | 129,2 | 89,5 | 148,4 | * | * | * | 260,6 | 80,0 | 286,4 | 115,0 | * | 115,0 | 115,4 |
| 100 | 76,2 | 67,3 | 79,0 | * | * | * | 130,1 | * | 130,1 | 130,5 | 44,0 | 130,5 | 51,0 |
| geom. MW | 85,3 | 70,0 | 86,5 | 159,0 | * | 159,0 | 308,0 | 66,3 | 313,0 | 191,0 | 44,0 | 191,0 | 55,0 |
| SF | 1,3 | 1,4 | 1,3 | 1,0 | * | 1,0 | 2,5 | 1,3 | 2,5 | 1,9 | 1,0 | 1,9 | 1,5 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 151 | 123,1 | 158,5 | 117,1 | * | * | * | 481,5 | * | 481,5 | * | * | * | 123,0 |
| 152 | 119,5 | 101,2 | 131,6 | * | * | * | 104,3 | * | 104,3 | * | * | * | 105,8 |
| 153 | 140,5 | 114,5 | 143,3 | * | * | * | 519,5 | * | 519,5 | * | * | * | 63,0 |
| 154 | 124,1 | 126,6 | 122,5 | * | * | * | 427,6 | * | 427,6 | * | * | * | 62,4 |
| 155 | 88,3 | 108,2 | 74,0 | * | * | * | 144,7 | * | 144,7 | * | * | * | 48,7 |
| 156 | 93,2 | 90,6 | 95,8 | * | * | * | 502,8 | * | 502,8 | 114,5 | * | 114,5 | 53,8 |
| 157 | 87,5 | 98,0 | 82,0 | * | * | * | 321,6 | 65,0 | 350,1 | 1105,0 | * | 1105,0 | 146,6 |
| 158 | 137,8 | 111,0 | 138,7 | * | * | * | 261,5 | 110,0 | 276,6 | 207,0 | * | 207,0 | 112,8 |
| 159 | 109,4 | 167,0 | 100,8 | * | * | * | 127,9 | * | 127,9 | * | * | * | 107,1 |
| 160 | 141,7 | 100,5 | 145,1 | * | * | * | 317,2 | * | 317,2 | * | * | * | 77,7 |
| geom. MW | 114,7 | 115,3 | 112,3 | * | * | * | 185,7 | 84,6 | 282,1 | 297,0 | * | 297,0 | 84,4 |
| SF | 1,2 | 1,2 | 1,3 | * | * | * | 1,8 | 1,5 | 1,8 | 3,2 | * | 3,2 | 1,5 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 46: Einzeltierwerte: Labelling-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von Wyeth-14,643

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 31 | 31,6 | 18,5 | 34,4 | * | * | * | 52,2 | 39,2 | 54,5 | * | * | * | 17,0 |
| 32 | 22,3 | 6,9 | 23,1 | * | * | * | 31,5 | * | 31,5 | * | * | * | 2,7 |
| 33 | 36,1 | 24,3 | 37,4 | * | * | * | 45,2 | * | 45,2 | * | * | * | 22,8 |
| 34 | 28,7 | 31,5 | 28,5 | * | * | * | 37,4 | * | 37,4 | * | * | * | 8,2 |
| 35 | 33,0 | 3,5 | 34,9 | * | * | * | 50,6 | * | 50,6 | * | * | * | 6,0 |
| 36 | 29,1 | 18,1 | 31,5 | * | * | * | 64,6 | * | 64,6 | * | * | * | 9,9 |
| 37 | 26,0 | 13,7 | 28,4 | * | * | * | 31,4 | * | 31,4 | 46,3 | * | 46,3 | 14,3 |
| 38 | 30,5 | 8,1 | 31,2 | * | * | * | 32,2 | * | 32,2 | 63,1 | * | 63,1 | 15,2 |
| 39 | 52,2 | 4,0 | 52,4 | * | * | * | 54,0 | * | 54,0 | 4,4 | * | 4,4 | 16,3 |
| 40 | 47,1 | * | 47,1 | * | * | * | 35,5 | * | 35,5 | * | * | * | * |
| geom. MW | 32,6 | 11,2 | 34,0 | * | * | * | 42,1 | 39,2 | 42,3 | 23,5 | * | 23,5 | 10,7 |
| SF | 1,3 | 2,2 | 1,3 | * | * | * | 1,3 | 1,0 | 1,3 | 4,3 | * | 4,3 | 1,9 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 91 | 14,8 | 1,8 | 15,1 | * | * | * | 18,5 | * | 18,5 | * | * | * | 2,8 |
| 92 | 12,3 | 9,2 | 12,4 | * | * | * | 20,5 | 7,3 | 20,6 | 1,2 | * | 1,2 | 33,3 |
| 93 | 20,1 | 25,1 | 17,4 | * | * | * | 16,0 | * | 16,0 | 38,4 | * | 38,4 | 17,7 |
| 94 | 13,8 | 13,7 | 13,8 | * | * | * | 23,6 | * | 23,6 | * | * | * | 16,4 |
| 95 | 12,0 | 5,7 | 13,2 | * | * | * | 20,3 | * | 20,3 | * | * | * | 16,3 |
| 96 | 24,5 | * | 24,5 | 8,8 | * | 8,8 | 24,7 | * | 24,7 | * | * | * | * |
| 97 | 30,0 | 31,0 | 25,9 | * | * | * | 29,1 | * | 29,1 | 35,4 | * | 35,4 | 16,1 |
| 98 | 29,3 | * | 29,3 | * | * | * | 19,3 | * | 19,3 | * | * | * | * |
| 99 | 13,9 | 11,8 | 14,5 | * | * | * | 15,9 | 5,0 | 16,3 | 4,3 | * | 4,3 | 8,3 |
| 100 | 25,9 | 19,1 | 27,8 | * | * | * | 16,7 | * | 16,7 | 39,1 | 45,5 | 39,1 | 43,1 |
| geom. MW | 18,5 | 11,1 | 18,4 | 8,8 | * | 8,8 | 20,1 | 6,0 | 20,2 | 12,3 | 45,5 | 12,3 | 15,0 |
| SF | 1,4 | 2,5 | 1,4 | 1,0 | * | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 4,9 | 1,0 | 4,9 | 2,3 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 151 | 27,3 | 25,0 | 27,9 | * | * | * | 23,8 | * | 23,8 | * | * | * | 22,0 |
| 152 | 15,2 | 13,2 | 16,2 | * | * | * | 22,2 | * | 22,2 | * | * | * | 13,2 |
| 153 | 23,2 | 15,5 | 23,8 | * | * | * | 26,9 | * | 26,9 | * | * | * | 36,5 |
| 154 | 17,5 | 18,8 | 16,6 | * | * | * | 15,7 | * | 15,7 | * | * | * | 12,4 |
| 155 | 15,1 | 16,0 | 14,2 | * | * | * | 8,1 | * | 8,1 | * | * | * | 25,0 |
| 156 | 16,5 | 17,9 | 15,2 | * | * | * | 6,4 | * | 6,4 | 8,7 | * | 8,7 | 9,6 |
| 157 | 20,5 | 23,8 | 18,4 | * | * | * | 45,9 | 21,5 | 46,4 | 22,4 | * | 22,4 | 16,5 |
| 158 | 15,2 | 10,8 | 15,3 | * | * | * | 12,7 | 6,8 | 12,9 | 17,9 | * | 17,9 | 4,6 |
| 159 | 22,7 | 18,4 | 23,8 | * | * | * | 11,3 | * | 11,3 | * | * | * | 20,5 |
| 160 | 26,5 | 27,1 | 26,4 | * | * | * | 18,1 | * | 18,1 | * | * | * | 26,2 |
| geom. MW | 19,5 | 18,0 | 19,2 | * | * | * | 16,3 | 12,1 | 16,4 | 15,2 | * | 15,2 | 16,3 |
| SF | 1,3 | 1,3 | 1,3 | * | * | * | 1,8 | 2,3 | 1,8 | 1,6 | * | 1,6 | 1,8 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 47: Einzeltierwerte: Apoptose-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von Wyeth-14,643

| 1 Woche | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 31 | 0,053 | 0,000 | 0,065 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 32 | 0,095 | 0,000 | 0,100 | * | * | * | 0,032 | * | 0,032 | * | * | * | 0,000 | |
| 33 | 0,123 | 0,000 | 0,137 | * | * | * | 0,092 | * | 0,092 | * | * | * | 0,000 | |
| 34 | 0,401 | 0,000 | 0,437 | * | * | * | 0,184 | * | 0,184 | * | * | * | 0,171 | |
| 35 | 0,201 | 0,000 | 0,214 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 36 | 0,185 | 0,000 | 0,224 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 37 | 0,136 | 0,045 | 0,154 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 38 | 0,016 | 0,000 | 0,016 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 39 | 0,389 | 0,000 | 0,391 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 40 | 0,976 | * | 0,146 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * | |
| geom. MW | 0,154 | 0,005 | 0,139 | * | * | * | 0,010 | 0,000 | 0,010 | 0,000 | * | 0,000 | 0,006 | |
| SF | 3,150 | 2,240 | 2,590 | * | * | * | 4,550 | 1,000 | 4,550 | 1,000 | * | 1,000 | 3,500 | |

| 4 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 91 | 0,036 | 0,000 | 0,037 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 92 | 0,118 | 0,000 | 0,121 | * | * | * | 0,094 | 0,000 | 0,095 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 93 | 0,086 | 0,201 | 0,022 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,180 | |
| 94 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,065 | * | 0,065 | * | * | * | 0,000 | |
| 95 | 0,029 | 0,000 | 0,035 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 96 | 0,040 | * | 0,040 | 0,000 | * | 0,000 | 0,072 | * | 0,072 | * | * | * | * | |
| 97 | 0,135 | 0,151 | 0,067 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 98 | 0,148 | * | 0,148 | * | * | * | 0,062 | * | 0,062 | * | * | * | * | |
| 99 | 0,045 | 0,066 | 0,038 | * | * | * | 0,528 | 0,000 | 0,549 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 100 | 0,284 | 0,165 | 0,316 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,860 | 1,136 | 0,766 | 0,000 | |
| geom. MW | 0,058 | 0,023 | 0,048 | 0,000 | * | 0,000 | 0,021 | 0,000 | 0,021 | 0,012 | 1,136 | 0,011 | 0,006 | |
| SF | 3,300 | 6,740 | 3,300 | 1,000 | * | 1,000 | 6,280 | 1,000 | 6,330 | 11,040 | 1,000 | 10,490 | 3,840 | |

| 13 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 151 | 0,177 | 0,158 | 0,182 | * | * | * | 0,312 | * | 0,312 | * | * | * | 0,407 | |
| 152 | 0,199 | 0,237 | 0,180 | * | * | * | 0,319 | * | 0,319 | * | * | * | 0,079 | |
| 153 | 0,122 | 0,218 | 0,113 | * | * | * | 0,096 | * | 0,096 | * | * | * | 0,000 | |
| 154 | 0,035 | 0,044 | 0,029 | * | * | * | 0,088 | * | 0,088 | * | * | * | 0,000 | |
| 155 | 0,046 | 0,060 | 0,031 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 156 | 0,134 | 0,184 | 0,087 | * | * | * | 0,080 | * | 0,080 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 157 | 0,048 | 0,050 | 0,047 | * | * | * | 0,093 | 1,538 | 0,063 | 0,090 | * | 0,090 | 0,000 | |
| 158 | 0,047 | 0,000 | 0,048 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 159 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,093 | |
| 160 | 0,231 | 0,000 | 0,244 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,858 | |
| geom. MW | 0,067 | 0,041 | 0,060 | * | * | * | 0,033 | 0,078 | 0,032 | 0,011 | * | 0,011 | 0,020 | |
| SF | 3,360 | 5,540 | 3,380 | * | * | * | 6,590 | 67,270 | 6,460 | 60,400 | * | 6,040 | 8,900 | |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 48: Einzeltierwerte: Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche nach Verabreichung von Ethinylestradiol

| 1 Woche | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 41 | 1,9 | 0,8 | 1,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| 42 | 16,2 | 1,2 | 16,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| 43 | 5,5 | 1,8 | 3,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | |
| 44 | 9,2 | 4,5 | 4,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | |
| 45 | 13,0 | 2,9 | 10,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | |
| 46 | 14,4 | 1,9 | 12,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | |
| 47 | 16,6 | 4,4 | 12,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 1,2 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 1,8 | |
| 48 | 6,1 | 0,6 | 5,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,3 | |
| 49 | 5,8 | 3,4 | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 1,5 | |
| 50 | 7,2 | 1,0 | 6,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,6 | 0,0 | 1,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| geom. MW | 8,1 | 1,8 | 5,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,5 | |
| SF | 1,9 | 2,0 | 2,3 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 2,3 | 1,0 | 2,3 | 1,7 | 1,0 | 1,7 | 3,5 | |

| 4 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 101 | 11,3 | 2,9 | 8,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,0 | 1,29 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | |
| 102 | 8,2 | 1,2 | 7,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 1,24 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | |
| 103 | 10,9 | 4,0 | 7,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,2 | 0,2 | 1,99 | 1,7 | 0,0 | 1,7 | 0,7 | |
| 104 | 20,6 | 4,6 | 15,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,29 | 0,9 | 0,0 | 0,9 | 2,9 | |
| 105 | 10,7 | 1,4 | 9,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,1 | 0,0 | 2,08 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,4 | |
| 106 | 13,1 | 3,8 | 9,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 1,19 | 1,0 | 0,0 | 1,0 | 0,2 | |
| 107 | 7,4 | 0,6 | 6,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 4,6 | 0,3 | 4,27 | 2,3 | 0,0 | 2,3 | 0,3 | |
| 108 | 11,2 | 3,9 | 7,3 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,6 | 0,0 | 0,61 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,6 | |
| 109 | 14,6 | 6,6 | 8,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,5 | 0,3 | 2,20 | 1,1 | 0,0 | 1,1 | 0,6 | |
| 110 | 14,7 | 3,2 | 11,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,69 | 2,1 | 0,0 | 2,1 | 2,1 | |
| geom. MW | 11,8 | 1,8 | 8,7 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 1,3 | 0,1 | 1,3 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,7 | |
| SF | 1,3 | 2,0 | 1,3 | 1,3 | 1,0 | 1,3 | 2,2 | 1,6 | 2,2 | 3,4 | 1,0 | 3,4 | 2,4 | |

| 13 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 161 | 6,1 | 1,7 | 4,5 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 1,4 | 0,0 | 1,4 | 1,1 | 0,0 | 1,1 | 1,4 | |
| 162 | 14,9 | 3,7 | 11,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,1 | 0,3 | 1,8 | 1,8 | 0,3 | 1,5 | 1,8 | |
| 163 | 20,6 | 1,7 | 18,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,1 | 0,0 | 2,1 | 2,1 | 0,0 | 2,1 | 0,0 | |
| 164 | 13,0 | 2,7 | 10,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,4 | 0,0 | 3,4 | 1,1 | 0,0 | 1,1 | 2,5 | |
| 165 | 20,6 | 2,3 | 18,4 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 3,5 | 0,3 | 3,3 | 1,5 | 0,0 | 1,5 | 0,8 | |
| 166 | 16,5 | 4,1 | 12,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,9 | 0,3 | 1,6 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,8 | |
| 167 | 34,0 | 2,8 | 31,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 4,6 | 0,0 | 4,6 | 5,0 | 0,6 | 4,3 | 0,3 | |
| 168 | 20,1 | 1,8 | 18,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 5,0 | 0,0 | 5,0 | 2,6 | 0,3 | 2,3 | 0,8 | |
| 169 | 16,7 | 2,4 | 14,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,1 | 0,0 | 2,1 | 2,4 | 0,0 | 2,4 | 1,5 | |
| geom. MW | 16,6 | 2,5 | 13,8 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 2,7 | 0,1 | 2,6 | 1,6 | 0,2 | 1,5 | 0,8 | |
| SF | 1,6 | 1,4 | 1,7 | 1,5 | 1,4 | 1,4 | 1,6 | 1,7 | 1,6 | 2,2 | 2,0 | 2,2 | 2,7 | |

BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 49: Einzeltierwerte: Zellzahl pro FAH nach Verabreichung von Ethinylestradiol

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH | |
|----------|----------|-------|-------|-------|-------|------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|------|-------|
| | Tier-Nr. | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | total |
| | | total | pos. | | neg. | pos. | | neg. | pos. | | neg. | pos. | | |
| 41 | 38,7 | 38,7 | 38,8 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | |
| 42 | 116,1 | 118,3 | 115,9 | * | * | * | 1990,0 | * | 1990,0 | * | * | * | * | |
| 43 | 73,4 | 77,1 | 71,5 | * | * | * | 314,4 | * | 314,4 | * | * | * | 68,0 | |
| 44 | 69,9 | 48,7 | 90,0 | * | * | * | 128,0 | * | 128,0 | * | * | * | 42,3 | |
| 45 | 71,5 | 64,1 | 73,6 | * | * | * | 296,0 | * | 296,0 | 133,0 | * | 133,0 | 65,0 | |
| 46 | 85,3 | 92,6 | 84,2 | * | * | * | 167,0 | * | 167,0 | * | * | * | 30,3 | |
| 47 | 97,1 | 111,7 | 91,7 | * | * | * | 173,0 | * | 173,0 | 114,0 | * | 114,0 | 51,3 | |
| 48 | 45,5 | 68,0 | 42,9 | * | * | * | 496,8 | * | 496,8 | * | * | * | 40,9 | |
| 49 | 55,9 | 58,7 | 52,0 | * | * | * | 544,0 | * | 544,0 | 9073,0 | * | 9073,0 | 73,2 | |
| 50 | 68,4 | 65,3 | 68,9 | * | * | * | 356,0 | * | 356,0 | * | * | * | * | |
| geom. MW | 68,8 | 70,4 | 69,2 | * | * | * | 343,1 | * | 343,1 | 516,2 | * | 516,2 | 50,8 | |
| SF | 1,4 | 1,4 | 1,4 | * | * | * | 2,3 | * | 2,3 | 12,0 | * | 12,0 | 1,4 | |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH | |
|----------|----------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Tier-Nr. | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | total |
| | | total | pos. | | neg. | pos. | | neg. | pos. | | neg. | pos. | | |
| 101 | 54,9 | 48,6 | 57,2 | * | * | * | 451,0 | * | 451,0 | * | * | * | 57,5 | |
| 102 | 54,6 | 57,4 | 54,1 | * | * | * | 98,2 | * | 98,2 | 212,0 | * | 212,0 | 52,0 | |
| 103 | 53,8 | 74,6 | 41,9 | * | * | * | 161,7 | 48,0 | 175,9 | 230,3 | * | 230,3 | 39,0 | |
| 104 | 89,6 | 85,2 | 90,9 | * | * | * | 129,0 | * | 129,0 | 208,3 | * | 208,3 | 72,5 | |
| 105 | 73,1 | 30,0 | 79,5 | * | * | * | 300,7 | * | 300,7 | * | * | * | 48,3 | |
| 106 | 80,2 | 58,6 | 89,1 | * | * | * | 581,0 | * | 581,0 | 280,8 | * | 280,8 | 10,0 | |
| 107 | 108,5 | 137,5 | 106,1 | * | * | * | 326,2 | 698,0 | 301,4 | 426,4 | * | 426,4 | 16,0 | |
| 108 | 57,8 | 44,6 | 64,8 | 81,0 | * | 81,0 | 68,7 | * | 68,7 | 236,0 | * | 236,0 | 38,3 | |
| 109 | 82,9 | 84,0 | 81,9 | * | * | * | 178,8 | 29,0 | 197,5 | 511,3 | * | 511,3 | 15,5 | |
| 110 | 143,4 | 194,0 | 129,2 | * | * | * | 294,3 | * | 294,3 | 308,1 | * | 308,1 | 120,0 | |
| geom. MW | 75,9 | 70,7 | 75,6 | 81,0 | * | 81,0 | 212,8 | 99,0 | 215,0 | 286,4 | * | 286,4 | 36,9 | |
| SF | 1,4 | 1,7 | 1,4 | 1,0 | * | 1,0 | 2,0 | 5,5 | 2,0 | 1,4 | * | 1,4 | 2,2 | |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH | |
|-----------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Tier-Nr. | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | total |
| | | total | pos. | | neg. | pos. | | neg. | pos. | | neg. | pos. | | |
| 161 | 81,7 | 61,3 | 89,4 | 60,0 | 60,0 | * | 153,0 | * | 153,0 | 237,0 | * | 237,0 | 66,6 | |
| 162 | 72,6 | 83,2 | 69,2 | * | * | * | 101,4 | 108,0 | 100,3 | 215,0 | 386,0 | 180,8 | 51,5 | |
| 163 | 86,0 | 90,2 | 85,6 | * | * | * | 100,3 | * | 100,3 | 220,0 | * | 220,0 | * | |
| 164 | 118,2 | 82,4 | 127,5 | * | * | * | 218,9 | * | 218,9 | 538,0 | * | 538,0 | 114,7 | |
| 165 | 136,5 | 88,3 | 142,5 | 579,0 | * | 579,0 | 458,6 | 922,0 | 423,0 | 215,8 | * | 215,8 | 94,3 | |
| 166 | 99,4 | 79,9 | 105,8 | * | * | * | 187,7 | 101,0 | 202,2 | 126,0 | * | 126,0 | 65,0 | |
| 167 | 114,1 | 95,1 | 115,8 | * | * | * | 654,1 | * | 654,1 | 287,4 | 432,0 | 266,8 | 30,0 | |
| 168 | 114,8 | 179,9 | 108,3 | * | * | * | 570,6 | * | 570,6 | 237,9 | 85,0 | 254,9 | 498,7 | |
| 169 | 128,6 | 91,6 | 134,7 | * | * | * | 128,7 | * | 128,7 | 453,3 | * | 453,3 | 50,0 | |
| geom. MW | 103,6 | 90,8 | 106,2 | 186,4 | 60,0 | 579,0 | 223,8 | 215,9 | 223,4 | 258,1 | 242,0 | 253,1 | 80,7 | |
| SF | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 5,0 | 1,0 | 1,0 | 2,1 | 3,5 | 2,1 | 1,5 | 2,5 | 1,6 | 2,3 | |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 50: Einzeltierwerte: Labelling-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von Ethinylestradiol

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 41 | 6,6 | 4,3 | 8,4 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 42 | 28,1 | 33,4 | 27,7 | * | * | * | 33,5 | * | 33,5 | * | * | * | * |
| 43 | 14,3 | 8,9 | 17,2 | * | * | * | 27,3 | * | 27,3 | * | * | * | 2,9 |
| 44 | 37,6 | 29,4 | 41,8 | * | * | * | 24,6 | * | 24,6 | * | * | * | 2,4 |
| 45 | 18,8 | 10,4 | 21,0 | * | * | * | 42,7 | * | 42,7 | 18,0 | * | 18,0 | 15,4 |
| 46 | 21,1 | 12,2 | 22,6 | * | * | * | 40,1 | * | 40,1 | * | * | * | 8,8 |
| 47 | 12,6 | 13,4 | 12,2 | * | * | * | 16,8 | * | 16,8 | 28,1 | * | 28,1 | 12,3 |
| 48 | 20,9 | 13,2 | 22,4 | * | * | * | 31,8 | * | 31,8 | * | * | * | 7,7 |
| 49 | 21,9 | 26,5 | 14,9 | * | * | * | 50,2 | * | 50,2 | 24,5 | * | 24,5 | 8,5 |
| 50 | 29,6 | 15,8 | 31,7 | * | * | * | 49,0 | * | 49,0 | * | * | * | * |
| geom. MW | 19,2 | 14,3 | 20,0 | * | * | * | 33,3 | * | 33,3 | 23,2 | * | 23,2 | 6,9 |
| SF | 1,6 | 1,9 | 1,6 | * | * | * | 1,4 | * | 1,4 | 1,3 | * | 1,3 | 2,0 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 101 | 8,6 | 11,7 | 7,7 | * | * | * | 17,2 | * | 17,2 | * | * | * | 9,6 |
| 102 | 15,5 | 11,8 | 16,2 | * | * | * | 12,6 | * | 12,6 | 24,1 | * | 24,1 | 11,5 |
| 103 | 11,6 | 10,8 | 12,4 | * | * | * | 18,8 | 20,8 | 18,8 | 17,2 | * | 17,2 | 11,1 |
| 104 | 19,4 | 10,2 | 21,9 | * | * | * | 32,6 | * | 32,6 | 34,2 | * | 34,2 | 8,1 |
| 105 | 16,9 | 10,0 | 17,3 | * | * | * | 24,4 | * | 24,4 | * | * | * | 8,8 |
| 106 | 19,4 | 18,8 | 19,6 | * | * | * | 15,0 | * | 15,0 | 40,0 | * | 40,0 | 0,0 |
| 107 | 17,7 | 26,9 | 16,7 | * | * | * | 15,4 | 5,9 | 16,9 | 23,8 | * | 23,8 | 0,0 |
| 108 | 16,7 | 17,7 | 16,4 | 6,2 | * | 6,2 | 6,3 | * | 6,3 | 33,9 | * | 33,9 | 11,3 |
| 109 | 9,5 | 9,0 | 9,9 | * | * | * | 13,2 | 17,2 | 13,2 | 24,2 | * | 24,2 | 9,7 |
| 110 | 25,2 | 17,1 | 28,6 | * | * | * | 24,6 | * | 24,6 | 35,1 | * | 35,1 | 13,3 |
| geom. MW | 15,3 | 13,6 | 15,7 | 6,2 | * | 6,2 | 16,6 | 12,8 | 16,7 | 28,1 | * | 28,1 | 4,4 |
| SF | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,0 | * | 1,0 | 1,6 | 2,0 | 1,6 | 1,3 | * | 1,3 | 6,0 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 161 | 29,0 | 12,8 | 33,2 | 0,0 | 0,0 | * | 34,4 | * | 34,4 | 43,0 | * | 43,0 | 13,2 |
| 162 | 20,7 | 9,8 | 25,0 | * | * | * | 28,3 | 30,6 | 27,9 | 31,7 | 32,6 | 31,3 | 12,6 |
| 163 | 27,3 | 13,7 | 28,6 | * | * | * | 35,2 | * | 35,2 | 37,3 | * | 37,3 | * |
| 164 | 26,6 | 8,7 | 29,7 | * | * | * | 26,5 | * | 26,5 | 46,8 | * | 46,8 | 4,1 |
| 165 | 27,4 | 8,4 | 28,8 | 33,2 | * | 33,2 | 44,3 | 69,5 | 40,0 | 41,5 | * | 41,5 | 13,8 |
| 166 | 21,9 | 12,9 | 24,1 | * | * | * | 16,0 | 31,7 | 14,7 | 34,1 | * | 34,1 | 7,7 |
| 167 | 18,5 | 9,9 | 19,2 | * | * | * | 30,9 | * | 30,9 | 21,7 | 14,4 | 23,5 | 26,7 |
| 168 | 21,7 | 4,8 | 24,5 | * | * | * | 10,7 | * | 10,7 | 25,2 | 10,6 | 25,8 | 7,0 |
| 169 | 33,3 | 9,0 | 36,1 | * | * | * | 23,9 | * | 23,9 | 55,5 | * | 55,5 | 6,4 |
| geom. MW | 24,8 | 9,6 | 27,3 | 2,2 | 0,0 | 33,2 | 25,8 | 40,0 | 25,2 | 36,1 | 17,1 | 36,4 | 9,8 |
| SF | 1,2 | 1,4 | 1,2 | 45,5 | 1,0 | 1,0 | 1,6 | 1,6 | 1,5 | 1,4 | 1,8 | 1,3 | 1,8 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 51: Einzeltierwerte: Apoptose-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von Ethinylestradiol

| 1 Woche | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 41 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | |
| 42 | 0,029 | 0,000 | 0,031 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * | |
| 43 | 0,065 | 0,000 | 0,100 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 44 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,391 | * | 0,391 | * | * | * | 0,000 | |
| 45 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 46 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 47 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 48 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 49 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,011 | * | 0,011 | 0,000 | |
| 50 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,112 | * | 0,110 | * | * | * | * | |
| geom. MW | 0,006 | 0,000 | 0,007 | * | * | * | 1,010 | * | 0,010 | 0,010 | * | 0,006 | 0,000 | |
| SF | 2,780 | 1,000 | 3,140 | * | * | * | 5,890 | * | 5,870 | 1,420 | * | 1,790 | 1,000 | |

| 4 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 101 | 0,000 | 0,229 | 0,000 | * | * | * | 0,055 | * | 0,055 | * | * | * | 0,000 | |
| 102 | 0,111 | 0,000 | 0,066 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 103 | 0,084 | 0,084 | 0,085 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 104 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 105 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 | |
| 106 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 107 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,019 | 0,000 | 0,022 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 108 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 109 | 0,023 | 0,050 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 110 | 0,022 | 0,037 | 0,015 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,072 | * | 0,072 | 0,000 | |
| geom. MW | 0,011 | 0,013 | 0,008 | 0,000 | * | 0,000 | 0,006 | 0,000 | 0,006 | 0,006 | * | 0,006 | 0,000 | |
| SF | 3,890 | 4,940 | 3,450 | 1,000 | * | 1,000 | 2,500 | 1,000 | 2,550 | 2,780 | * | 2,780 | 1,000 | |

| 13 Wochen | | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | |
| 161 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,211 | * | 0,211 | 0,000 | |
| 162 | 0,000 | 0,100 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| 163 | 0,039 | 0,000 | 0,043 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,076 | * | 0,076 | * | |
| 164 | 0,000 | 0,101 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 165 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,016 | 0,000 | 0,018 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 166 | 0,016 | 0,083 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | |
| 167 | 0,008 | 0,000 | 0,009 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| 168 | 0,011 | 0,000 | 0,013 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | |
| 169 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,110 | * | 0,110 | 0,000 | |
| geom. MW | 0,007 | 0,011 | 0,006 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,000 | 0,005 | 0,012 | 0,000 | 0,012 | 0,000 | |
| SF | 2,280 | 4,860 | 2,300 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,590 | 1,000 | 1,650 | 5,610 | 1,000 | 5,600 | 1,000 | |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 52: Einzeltierwerte: Anzahl der FAH pro cm² Leberfläche nach Verabreichung von PCB 126

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 51 | 8,9 | 4,7 | 4,2 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 52 | 28,8 | 4,6 | 24,2 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 |
| 53 | 8,5 | 2,3 | 6,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,3 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 54 | 8,4 | 2,8 | 5,6 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,8 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,5 |
| 55 | 8,1 | 0,3 | 7,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 56 | 22,0 | 3,6 | 18,4 | 0,4 | 0,0 | 0,4 | 2,4 | 0,0 | 2,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,2 |
| 57 | 26,5 | 2,3 | 24,2 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 1,2 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 58 | 7,3 | 3,2 | 4,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 |
| 59 | 10,9 | 5,0 | 5,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,8 |
| 60 | 7,6 | 1,0 | 6,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| geom. MW | 11,8 | 2,3 | 8,5 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,3 |
| SF | 1,7 | 2,5 | 2,0 | 1,8 | 1,4 | 1,8 | 2,9 | 1,8 | 3,1 | 1,5 | 1,0 | 1,5 | 2,8 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 111 | 12,4 | 3,2 | 9,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 |
| 112 | 8,4 | 2,4 | 6,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 113 | 10,9 | 5,5 | 5,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,9 | 0,7 | 2,2 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,2 |
| 114 | 10,3 | 5,5 | 4,8 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 1,8 | 0,3 | 1,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 |
| 115 | 12,6 | 5,8 | 6,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,4 |
| 116 | 8,4 | 2,8 | 5,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 1,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| 117 | 9,7 | 3,5 | 6,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 118 | 6,3 | 2,8 | 3,5 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 1,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 119 | 20,7 | 3,1 | 17,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 |
| 120 | 10,3 | 4,7 | 5,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,1 | 0,3 | 1,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,1 |
| geom. MW | 10,5 | 3,8 | 6,4 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,8 | 0,2 | 0,7 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,4 |
| SF | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,4 | 1,0 | 1,4 | 2,7 | 2,1 | 3,2 | 1,3 | 1,0 | 1,3 | 2,9 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 171 | 18,1 | 4,9 | 13,3 | 0,4 | 0,4 | 0,0 | 3,8 | 1,5 | 2,4 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,9 |
| 172 | 26,2 | 5,8 | 20,3 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 173 | 11,0 | 2,2 | 8,8 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,3 |
| 174 | 18,7 | 2,8 | 15,9 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 1,4 | 0,2 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| 175 | 8,8 | 2,3 | 6,5 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 1,8 | 0,0 | 1,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 176 | 10,6 | 3,7 | 6,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,2 | 1,8 | 1,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,4 |
| 177 | 5,7 | 1,9 | 3,8 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| 179 | 15,6 | 3,8 | 11,8 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 |
| geom. MW | 13,0 | 3,2 | 9,7 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 1,0 | 0,3 | 0,9 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,3 |
| SF | 1,6 | 1,5 | 1,7 | 1,6 | 1,7 | 1,5 | 2,8 | 3,4 | 2,1 | 1,5 | 1,0 | 1,5 | 2,7 |

BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus";

NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 53: Einzeltierwerte: Zellzahl pro FAH-Querschnitt nach Verabreichung von PCB 126

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 51 | 53,9 | 67,1 | 39,3 | 12,0 | * | 12,0 | * | * | * | * | * | * | 20,0 |
| 52 | 84,0 | 75,9 | 85,5 | 14,0 | 14,0 | * | 336,0 | 336,0 | * | * | * | * | 24,0 |
| 53 | 72,2 | 71,1 | 72,5 | * | * | * | 49,3 | 36,0 | 56,0 | * | * | * | * |
| 54 | 73,8 | 99,7 | 60,9 | 78,0 | * | 78,0 | 100,7 | 94,5 | 113,0 | 4617,0 | * | 4617,0 | 57,5 |
| 55 | 91,1 | 29,0 | 93,2 | * | * | * | 406,8 | * | 406,8 | * | * | * | * |
| 56 | 80,7 | 110,8 | 74,8 | 14,0 | * | 14,0 | 1085,8 | * | 1085,8 | * | * | * | 42,3 |
| 57 | 105,9 | 108,1 | 105,7 | 38,0 | * | 38,0 | 401,0 | * | 401,0 | * | * | * | * |
| 58 | 82,1 | 112,9 | 57,4 | * | * | * | 41,0 | * | 41,0 | * | * | * | 46,0 |
| 59 | 72,6 | 83,2 | 63,6 | * | * | * | 2906,5 | * | 2906,5 | 998,0 | * | 998,0 | 33,7 |
| 60 | 63,7 | 66,7 | 63,3 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| geom. MW | 76,8 | 77,5 | 69,2 | 23,4 | 14,0 | 26,6 | 277,6 | 104,6 | 279,6 | 2146,4 | * | 2146,4 | 34,9 |
| SF | 1,2 | 1,5 | 1,3 | 2,3 | 1,0 | 2,4 | 4,4 | 3,1 | 4,8 | 3,0 | * | 3,0 | 1,5 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 111 | 187,2 | 461,4 | 90,4 | * | * | * | 187,0 | * | 187,0 | * | * | * | 27,5 |
| 112 | 65,3 | 82,6 | 58,5 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 113 | 93,0 | 59,5 | 128,0 | * | * | * | 88,0 | 34,7 | 105,8 | 374,0 | * | 374,0 | 22,0 |
| 114 | 71,9 | 71,0 | 72,9 | 16,0 | * | 16,0 | 121,9 | 293,0 | 93,3 | * | * | * | 83,5 |
| 115 | 48,0 | 39,1 | 55,8 | * | * | * | 137,5 | * | 137,5 | * | * | * | 16,5 |
| 116 | 69,6 | 31,0 | 88,9 | * | * | * | 163,7 | * | 163,7 | * | * | * | 35,0 |
| 117 | 145,5 | 88,9 | 178,2 | * | * | * | 55,5 | 55,5 | * | * | * | * | * |
| 118 | 81,0 | 79,9 | 81,8 | 10,0 | * | 10,0 | 570,0 | * | 570,0 | * | * | * | * |
| 119 | 88,3 | 74,9 | 90,7 | * | * | * | 105,3 | * | 105,3 | * | * | * | 25,7 |
| 120 | 45,9 | 43,0 | 48,5 | * | * | * | 336,5 | 32,0 | 397,4 | * | * | * | 41,3 |
| geom. MW | 81,6 | 73,3 | 83,1 | 12,7 | * | 12,7 | 154,7 | 65,2 | 177,6 | 374,0 | * | 374,0 | 31,5 |
| SF | 1,6 | 2,1 | 1,5 | 1,4 | * | 1,4 | 2,0 | 2,8 | 1,9 | 1,0 | * | 1,0 | 1,7 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 171 | 83,7 | 61,5 | 91,8 | 41,0 | 41,0 | * | 244,2 | 78,4 | 349,6 | 2673,0 | * | 2673,0 | 86,3 |
| 172 | 88,1 | 84,3 | 89,1 | 59,0 | * | 59,0 | 141,7 | 18,0 | 203,5 | * | * | * | * |
| 173 | 51,7 | 31,4 | 56,7 | 29,0 | 29,0 | * | 109,0 | * | 109,0 | 103,0 | * | 103,0 | 16,0 |
| 174 | 83,5 | 63,3 | 87,1 | 100,5 | 57,0 | 144,0 | 74,8 | 65,0 | 76,8 | * | * | * | 28,0 |
| 175 | 77,5 | 74,4 | 78,6 | 35,0 | 35,0 | * | 200,6 | * | 200,6 | * | * | * | * |
| 176 | 52,3 | 45,9 | 55,7 | * | * | * | 152,8 | 92,8 | 232,8 | * | * | * | 38,2 |
| 177 | 58,1 | 86,7 | 43,9 | 20,0 | 20,0 | * | 180,0 | * | 180,0 | * | * | * | 140,0 |
| 179 | 73,7 | 32,5 | 86,8 | 174,0 | 174,0 | * | 214,0 | * | 214,0 | * | * | * | 43,7 |
| geom. MW | 69,6 | 56,2 | 71,4 | 50,7 | 45,0 | 92,2 | 166,0 | 54,0 | 179,4 | 524,7 | * | 524,7 | 45,6 |
| SF | 1,3 | 1,5 | 1,3 | 2,1 | 2,1 | 1,9 | 1,5 | 2,1 | 1,6 | 10,0 | * | 10,0 | 2,2 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 54 : Einzeltierwerte: Labelling-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von PCB 126

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 51 | 2,7 | 2,8 | 2,5 | 0,0 | * | 0,0 | * | * | * | * | * | * | 10,0 |
| 52 | 6,8 | 8,1 | 6,5 | 0,0 | 0,0 | * | 9,8 | 9,8 | * | * | * | * | 2,1 |
| 53 | 3,7 | 0,4 | 4,9 | * | * | * | 4,7 | 13,9 | 1,8 | * | * | * | * |
| 54 | 5,2 | 2,6 | 7,2 | 5,1 | * | 5,1 | 7,0 | 10,1 | 1,8 | 15,3 | * | 15,3 | 6,1 |
| 55 | 3,8 | 3,4 | 3,8 | * | * | * | 8,4 | * | 8,4 | * | * | * | * |
| 56 | 4,8 | 3,7 | 5,1 | 0,0 | * | 0,0 | 12,1 | * | 12,1 | * | * | * | 2,4 |
| 57 | 5,9 | 8,2 | 5,7 | 0,0 | * | 0,0 | 3,6 | * | 3,6 | * | * | * | * |
| 58 | 3,4 | 1,5 | 6,4 | * | * | * | 2,4 | * | 2,4 | * | * | * | 9,4 |
| 59 | 3,6 | 3,8 | 3,4 | * | * | * | 11,1 | * | 11,1 | 17,7 | * | 17,7 | 3,0 |
| 60 | 3,9 | 4,5 | 3,8 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| geom. MW | 4,2 | 3,0 | 4,7 | 0,3 | 0,0 | 0,4 | 6,5 | 11,1 | 4,4 | 16,5 | * | 16,5 | 4,5 |
| SF | 1,3 | 2,5 | 1,4 | 4,9 | 1,0 | 5,9 | 1,8 | 1,2 | 2,3 | 1,1 | * | 1,1 | 2,0 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-----|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 111 | 5,6 | 6,1 | 4,8 | * | * | * | 2,1 | * | 2,1 | * | * | * | 0,0 |
| 112 | 3,9 | 4,4 | 3,6 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 113 | 5,0 | 2,5 | 6,2 | * | * | * | 7,4 | 7,7 | 7,4 | 7,0 | * | 7,0 | 9,1 |
| 114 | 5,1 | 3,6 | 6,8 | 6,3 | * | 6,3 | 5,4 | 4,8 | 5,7 | * | * | * | 1,2 |
| 115 | 5,5 | 6,0 | 5,1 | * | * | * | 3,3 | * | 3,3 | * | * | * | 9,1 |
| 116 | 3,4 | 3,5 | 3,3 | * | * | * | 3,0 | * | 3,0 | * | * | * | 0,0 |
| 117 | 5,9 | 3,8 | 6,5 | * | * | * | 9,0 | 9,0 | * | * | * | * | * |
| 118 | 6,6 | 4,1 | 8,6 | 0,0 | * | 0,0 | 8,8 | * | 8,8 | * | * | * | * |
| 119 | 16,6 | 8,1 | 17,9 | * | * | * | 14,2 | * | 14,2 | * | * | * | 3,9 |
| 120 | 6,4 | 5,6 | 7,0 | * | * | * | 10,1 | 12,5 | 10,1 | * | * | * | 3,0 |
| geom. MW | 5,8 | 4,5 | 6,2 | 1,0 | * | 1,0 | 6,0 | 7,4 | 5,7 | 7,0 | * | 7,0 | 1,6 |
| SF | 1,5 | 1,4 | 1,6 | 13,8 | * | 13,8 | 1,9 | 1,6 | 2,0 | 1,0 | * | 1,0 | 5,8 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 171 | 9,4 | 9,7 | 9,4 | 2,4 | 2,4 | * | 9,5 | 14,6 | 8,8 | 12,8 | * | 12,8 | 0,3 |
| 172 | 5,7 | 5,3 | 5,8 | 18,6 | * | 18,6 | 10,6 | 22,2 | 10,1 | * | * | * | * |
| 173 | 9,5 | 1,6 | 10,6 | 6,9 | 6,9 | * | 4,6 | * | 4,6 | 8,7 | * | 8,7 | 0,0 |
| 174 | 7,6 | 3,7 | 8,1 | 8,5 | 3,5 | 10,4 | 7,3 | 7,7 | 7,3 | * | * | * | 25,0 |
| 175 | 12,0 | 10,1 | 12,6 | 11,4 | 11,4 | * | 12,3 | * | 12,3 | * | * | * | * |
| 176 | 5,4 | 4,8 | 5,7 | * | * | * | 7,8 | 7,1 | 8,2 | * | * | * | 0,0 |
| 177 | 3,1 | 2,8 | 3,4 | 0,0 | 0,0 | * | 4,6 | * | 4,6 | * | * | * | 0,0 |
| 179 | 5,4 | 5,1 | 5,4 | 12,1 | 12,1 | * | 4,7 | * | 4,7 | * | * | * | 3,1 |
| geom. MW | 6,7 | 4,6 | 7,1 | 4,8 | 3,3 | 13,9 | 7,2 | 11,6 | 7,1 | 10,6 | * | 10,6 | 0,7 |
| SF | 1,5 | 1,9 | 1,5 | 5,2 | 5,2 | 1,5 | 1,5 | 1,7 | 1,5 | 1,3 | * | 1,3 | 8,5 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 55: Einzeltierwerte: Apoptose-Indizes (%) der FAH nach Verabreichung von PCB 126

| 1 Woche | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 51 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * | * | * | 0,000 |
| 52 | 0,011 | 0,000 | 0,012 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | 0,000 |
| 53 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * |
| 54 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,529 | 0,000 | 0,022 | * | 0,022 | 0,000 |
| 55 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 56 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,015 | * | 0,015 | * | * | * | 0,000 |
| 57 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 58 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 59 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 60 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| geom. MW | 0,004 | 0,000 | 0,004 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,020 | 0,005 | 0,009 | * | 0,009 | 0,000 |
| SF | 1,377 | 1,000 | 1,420 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,600 | 16,780 | 1,650 | 3,340 | * | 3,340 | 1,000 |

| 4 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 111 | 0,012 | 0,000 | 0,033 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 112 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 113 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 114 | 0,068 | 0,128 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 115 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 116 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,102 | * | 0,102 | * | * | * | 0,000 |
| 117 | 0,067 | 0,075 | 0,065 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * | * |
| 118 | 0,039 | 0,000 | 0,068 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 119 | 0,026 | 0,205 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 1,299 |
| 120 | 0,059 | 0,137 | 0,000 | * | * | * | 0,050 | 0,000 | * | * | * | * | 0,000 |
| geom. MW | 0,016 | 0,016 | 0,009 | 0,000 | * | 0,000 | 0,008 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | * | 0,000 | 0,009 |
| SF | 3,580 | 6,090 | 3,520 | 1,000 | * | 1,000 | 3,610 | 1,000 | 3,400 | 1,000 | * | 1,000 | 8,900 |

| 13 Wochen | CCF | | | ECF | | | BCF | | | MCF | | | NAH |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tier-Nr. | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | total | GST-P | | |
| | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | | pos. | neg. | |
| 171 | 0,029 | 0,074 | 0,018 | 0,000 | 0,000 | * | 0,023 | 0,000 | 0,026 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 172 | 0,019 | 0,088 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | * |
| 173 | 0,048 | 0,398 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| 174 | 0,015 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 175 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | * |
| 176 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 177 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| 179 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | * | 0,000 | * | 0,000 | * | * | * | 0,000 |
| geom. MW | 0,010 | 0,015 | 0,006 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,000 | 0,005 | 0,000 | * | 0,000 | 0,000 |
| SF | 2,820 | 6,660 | 1,980 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,860 | 1,000 | 1,940 | 1,000 | * | 1,000 | 1,000 |

* = FAH-Typ nicht vorhanden; BCF = "basophilic cell focus"; CCF = "clear cell focus"; ECF = "eosinophilic cell focus"; geom. MW = geometrischer Mittelwert; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); MCF = "mixed cell focus"; NAH = nicht abgrenzbare Herde; neg. = negativ; pos. = positiv; SF = Streufaktor

Tab. 56: zonale Verteilung der verschiedenen FAH-Typen innerhalb des Leberläppchens bei den Kontrolltieren

| 1 Woche | | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|----------------|-----|------|---|-----|----|------|---|-----|----|------|--|
| Zone | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | |
| 1 | 95 | 24,5 | 0 | 0 | 9 | 24,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 2 | 168 | 43,3 | 0 | 0 | 10 | 27 | 0 | 0 | 16 | 69,6 | |
| 3 | 69 | 17,8 | 1 | 100 | 7 | 18,9 | 0 | 0 | 6 | 26,1 | |
| 1/2 | 29 | 7,5 | 0 | 0 | 3 | 8,11 | 1 | 100 | 0 | 0 | |
| 2/3 | 17 | 4,4 | 0 | 0 | 1 | 2,7 | 0 | 0 | 1 | 4,4 | |
| 1/2/3 | 10 | 2,6 | 0 | 0 | 7 | 18,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

| 4 Wochen | | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|-----------------|-----|------|---|-----|----|------|---|------|----|------|--|
| Zone | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | |
| 1 | 176 | 30,9 | 0 | 0 | 6 | 15,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 2 | 203 | 35,7 | 0 | 0 | 11 | 29 | 1 | 12,5 | 12 | 40 | |
| 3 | 73 | 12,8 | 0 | 0 | 2 | 5,3 | 3 | 37,5 | 14 | 46,7 | |
| 1/2 | 57 | 10 | 1 | 100 | 6 | 15,8 | 2 | 25 | 1 | 3,3 | |
| 2/3 | 38 | 6,7 | 0 | 0 | 1 | 2,6 | 0 | 0 | 1 | 3,3 | |
| 1/2/3 | 22 | 3,9 | 0 | 0 | 12 | 31,6 | 2 | 25 | 2 | 6,7 | |

| 13 Wochen | | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|------------------|----|------|---|-----|----|------|---|-----|----|------|--|
| Zone | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | |
| 1 | 76 | 24,6 | 0 | 0 | 2 | 9,1 | 0 | 0 | 1 | 3,2 | |
| 2 | 88 | 28,5 | 0 | 0 | 2 | 9,1 | 0 | 0 | 19 | 61,3 | |
| 3 | 73 | 23,6 | 0 | 0 | 4 | 18,2 | 0 | 0 | 7 | 22,6 | |
| 1/2 | 17 | 5,5 | 0 | 0 | 1 | 4,6 | 0 | 0 | 3 | 9,7 | |
| 2/3 | 37 | 12 | 0 | 0 | 3 | 13,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 1/2/3 | 18 | 5,8 | 0 | 0 | 10 | 45,5 | 5 | 100 | 1 | 3,2 | |

n = FAH-Anzahl, FAH-Typen s. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 57: zonale Verteilung der GST-P-positiven und –negativen CCF innerhalb des Leberläppchens bei den Kontrolltieren

| GST-P | 1 Woche | | | | 4 Wochen | | | | 13 Wochen | | | |
|-------|---------|------|---------|------|----------|------|---------|------|-----------|------|---------|------|
| | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | |
| Zone | n | % | n | % | n | n | % | % | n | % | n | % |
| 1 | 9 | 10,5 | 86 | 28,5 | 11 | 10,5 | 165 | 35,6 | 3 | 4,2 | 73 | 30,7 |
| 2 | 36 | 41,9 | 132 | 43,7 | 36 | 34,3 | 167 | 36 | 12 | 16,9 | 76 | 31,9 |
| 3 | 31 | 36,1 | 38 | 12,6 | 29 | 27,6 | 44 | 9,5 | 30 | 42,3 | 43 | 18,1 |
| 1/2 | 2 | 2,3 | 27 | 8,9 | 5 | 4,8 | 52 | 11,2 | 5 | 7 | 12 | 5 |
| 2/3 | 6 | 7 | 11 | 3,6 | 16 | 15,2 | 22 | 4,7 | 15 | 21,1 | 22 | 9,2 |
| 1/2/3 | 2 | 2,3 | 8 | 2,7 | 8 | 7,6 | 14 | 3 | 6 | 8,5 | 12 | 5 |

CCF = "clear cell focus"; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); n = FAH-Anzahl

Tab. 58: zonale Verteilung der verschiedenen FAH-Typen innerhalb des Leberläppchens nach Phenobarbital-Verabreichung

| 1 Woche | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|---------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|---|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 72 | 23,2 | 7 | 21,9 | 1 | 6,7 | 0 | 0 | 5 | 11,9 |
| 2 | 135 | 43,6 | 7 | 21,9 | 7 | 46,7 | 0 | 0 | 14 | 33,3 |
| 3 | 31 | 10 | 5 | 15,6 | 5 | 33,3 | 0 | 0 | 19 | 45,2 |
| 1/2 | 46 | 14,8 | 3 | 9,4 | 1 | 6,7 | 0 | 0 | 1 | 2,4 |
| 2/3 | 13 | 4,2 | 1 | 3,1 | 1 | 6,7 | 0 | 0 | 2 | 4,8 |
| 1/2/3 | 13 | 4,2 | 9 | 28,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2,4 |

| 4 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|----------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 31 | 16,4 | 4 | 6,8 | 9 | 25,7 | 0 | 0 | 3 | 11,1 |
| 2 | 73 | 38,6 | 18 | 30,5 | 8 | 22,9 | 0 | 0 | 14 | 51,9 |
| 3 | 25 | 13,2 | 14 | 23,7 | 3 | 8,6 | 0 | 0 | 8 | 29,6 |
| 1/2 | 24 | 12,7 | 2 | 3,4 | 10 | 28,6 | 0 | 0 | 1 | 3,7 |
| 2/3 | 24 | 12,7 | 12 | 20,3 | 1 | 2,6 | 0 | 0 | 1 | 3,7 |
| 1/2/3 | 12 | 6,4 | 9 | 15,2 | 4 | 11,4 | 1 | 100 | 0 | 0 |

| 13 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|-----------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 38 | 16,8 | 5 | 5,2 | 4 | 17,4 | 0 | 0 | 2 | 16,7 |
| 2 | 91 | 40,3 | 14 | 14,6 | 8 | 34,8 | 0 | 0 | 3 | 25 |
| 3 | 38 | 16,8 | 36 | 37,5 | 1 | 4,4 | 0 | 0 | 5 | 41,7 |
| 1/2 | 36 | 15,9 | 9 | 9,4 | 2 | 8,7 | 10 | 83,3 | 0 | 0 |
| 2/3 | 17 | 7,5 | 15 | 15,6 | 2 | 8,7 | 0 | 0 | 1 | 8,3 |
| 1/2/3 | 6 | 2,7 | 17 | 17,7 | 6 | 26,1 | 2 | 16,7 | 1 | 8,3 |

n = FAH-Anzahl, FAH-Typen s. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 59: zonale Verteilung der GST-P-positiven und –negativen CCF innerhalb des Leberläppchens nach Phenobarbital-Verabreichung

| GST-P | 1 Woche | | | | 4 Wochen | | | | 13 Wochen | | | |
|-------|---------|------|---------|------|----------|------|---------|------|-----------|------|---------|------|
| | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 1 | 1,8 | 71 | 28 | 2 | 3,9 | 29 | 21 | 2 | 4,7 | 36 | 19,4 |
| 2 | 29 | 51,8 | 106 | 41,7 | 9 | 17,7 | 64 | 46,4 | 11 | 25,6 | 80 | 43,7 |
| 3 | 10 | 17,9 | 21 | 8,3 | 15 | 29,4 | 10 | 7,3 | 16 | 37,2 | 22 | 12 |
| 1/2 | 5 | 8,9 | 41 | 16,1 | 5 | 9,8 | 19 | 13,8 | 2 | 4,7 | 34 | 18,6 |
| 2/3 | 6 | 10,7 | 7 | 2,8 | 14 | 27,5 | 10 | 7,3 | 11 | 25,6 | 6 | 3,3 |
| 1/2/3 | 5 | 8,9 | 8 | 3,2 | 6 | 11,8 | 6 | 4,4 | 1 | 2,3 | 5 | 2,7 |

CCF = "clear cell focus"; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); n = FAH-Anzahl

Tab. 60: zonale Verteilung der verschiedenen FAH-Typen innerhalb des Leberläppchens nach Chloroform-Verabreichung

| 1 Woche | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|---------|-----|------|-----|---|-----|------|-----|------|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 60 | 20,5 | 0 | 0 | 9 | 17,7 | 1 | 16,7 | 2 | 11,8 |
| 2 | 87 | 29,7 | 0 | 0 | 22 | 43,1 | 0 | 0 | 9 | 52,9 |
| 3 | 78 | 26,6 | 0 | 0 | 10 | 19,6 | 0 | 0 | 6 | 35,3 |
| 1/2 | 24 | 8,2 | 0 | 0 | 2 | 3,9 | 3 | 50 | 0 | 0 |
| 2/3 | 24 | 8,2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 33,3 | 0 | 0 |
| 1/2/3 | 20 | 6,8 | 0 | 0 | 7 | 13,7 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| 4 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|----------|-----|------|-----|---|-----|------|-----|----|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 78 | 27,1 | 0 | 0 | 2 | 16,7 | 0 | 0 | 2 | 9,5 |
| 2 | 82 | 28,5 | 0 | 0 | 3 | 25 | 1 | 50 | 10 | 47,6 |
| 3 | 64 | 22,2 | 0 | 0 | 3 | 25 | 0 | 0 | 8 | 38,1 |
| 1/2 | 23 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2/3 | 21 | 7,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4,8 |
| 1/2/3 | 20 | 6,9 | 0 | 0 | 4 | 33,3 | 1 | 50 | 0 | 0 |

| 13 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|-----------|-----|------|-----|---|-----|------|-----|----|-----|----|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 78 | 21,6 | 0 | 0 | 3 | 10 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| 2 | 76 | 21 | 0 | 0 | 9 | 30 | 0 | 0 | 8 | 32 |
| 3 | 129 | 35,6 | 0 | 0 | 8 | 26,7 | 0 | 0 | 14 | 56 |
| 1/2 | 30 | 8,3 | 0 | 0 | 3 | 10 | 1 | 50 | 1 | 4 |
| 2/3 | 24 | 6,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 50 | 1 | 4 |
| 1/2/3 | 25 | 6,9 | 0 | 0 | 7 | 23,3 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n = FAH-Anzahl, FAH-Typen s. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 61: zonale Verteilung der GST-P-positiven und -negativen CCF innerhalb des Leberläppchens nach Chloroform-Verabreichung

| GST-P | 1 Woche | | | | 4 Wochen | | | | 13 Wochen | | | |
|-------|---------|------|---------|------|----------|----|---------|------|-----------|------|---------|------|
| | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 6 | 6,7 | 54 | 26,6 | 1 | 4 | 77 | 29,3 | 2 | 3,6 | 76 | 24,8 |
| 2 | 23 | 25,6 | 64 | 31,5 | 8 | 32 | 74 | 28,1 | 7 | 12,7 | 69 | 22,5 |
| 3 | 37 | 41,1 | 41 | 20,2 | 9 | 36 | 55 | 20,9 | 30 | 54,6 | 99 | 32,3 |
| 1/2 | 5 | 5,6 | 19 | 9,4 | 1 | 4 | 22 | 8,4 | 4 | 7,3 | 26 | 8,5 |
| 2/3 | 12 | 13,3 | 12 | 5,9 | 3 | 12 | 18 | 6,8 | 7 | 12,7 | 17 | 5,5 |
| 1/2/3 | 7 | 7,8 | 13 | 6,4 | 3 | 12 | 17 | 6,5 | 5 | 9,1 | 20 | 6,5 |

CCF = "clear cell focus"; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); n = FAH-Anzahl

Tab. 62: zonale Verteilung der verschiedenen FAH-Typen innerhalb des Leberläppchens nach Wyeth-14,643-Verabreichung

| 1 Woche | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|---------|-----|------|-----|---|-----|------|-----|------|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 195 | 28,5 | 0 | 0 | 14 | 25 | 0 | 0 | 7 | 11,1 |
| 2 | 260 | 38 | 0 | 0 | 14 | 25 | 1 | 33,3 | 28 | 44,4 |
| 3 | 109 | 15,9 | 0 | 0 | 7 | 12,5 | 0 | 0 | 23 | 36,5 |
| 1/2 | 61 | 8,9 | 0 | 0 | 7 | 12,5 | 1 | 33,3 | 1 | 1,6 |
| 2/3 | 39 | 5,7 | 0 | 0 | 4 | 7,1 | 0 | 0 | 3 | 4,8 |
| 1/2/3 | 20 | 2,9 | 0 | 0 | 10 | 17,9 | 1 | 33,3 | 1 | 1,6 |

| 4 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|----------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 170 | 29,9 | 0 | 0 | 24 | 27,9 | 2 | 22,2 | 17 | 47,2 |
| 2 | 172 | 30,2 | 0 | 0 | 18 | 20,9 | 3 | 33,3 | 9 | 25 |
| 3 | 85 | 14,9 | 0 | 0 | 7 | 8,1 | 1 | 11,1 | 7 | 19,4 |
| 1/2 | 75 | 13,2 | 0 | 0 | 13 | 15,1 | 1 | 11,1 | 0 | 0 |
| 2/3 | 26 | 4,6 | 1 | 100 | 2 | 2,3 | 0 | 0 | 2 | 5,6 |
| 1/2/3 | 41 | 7,2 | 0 | 0 | 22 | 25,6 | 2 | 22,2 | 1 | 2,8 |

| 13 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|-----------|-----|------|-----|---|-----|------|-----|----|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 247 | 38,4 | 0 | 0 | 23 | 27,7 | 2 | 40 | 34 | 41 |
| 2 | 120 | 18,7 | 0 | 0 | 13 | 15,7 | 0 | 0 | 17 | 20,5 |
| 3 | 66 | 10,3 | 0 | 0 | 6 | 7,2 | 1 | 20 | 16 | 19,3 |
| 1/2 | 106 | 16,5 | 0 | 0 | 14 | 16,9 | 1 | 20 | 7 | 8,4 |
| 2/3 | 25 | 3,9 | 0 | 0 | 1 | 1,2 | 0 | 0 | 3 | 3,6 |
| 1/2/3 | 79 | 12,3 | 0 | 0 | 26 | 31,3 | 1 | 20 | 6 | 7,2 |

n = FAH-Anzahl, FAH-Typen s. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 63: zonale Verteilung der GST-P-positiven und -negativen CCF innerhalb des Leberläppchens nach Wyeth-14,643-Verabreichung

| GST-P | 1 Woche | | | | 4 Wochen | | | | 13 Wochen | | | |
|-------|---------|------|---------|------|----------|------|---------|------|-----------|------|---------|------|
| | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 4 | 9,5 | 191 | 29,8 | 49 | 37,1 | 121 | 27,7 | 89 | 44,5 | 158 | 35,7 |
| 2 | 14 | 33,3 | 246 | 38,3 | 35 | 26,5 | 137 | 31,4 | 35 | 17,5 | 85 | 19,2 |
| 3 | 15 | 35,7 | 94 | 14,6 | 22 | 16,7 | 63 | 14,4 | 18 | 9 | 48 | 10,8 |
| 1/2 | 2 | 4,8 | 59 | 9,2 | 17 | 12,9 | 58 | 13,3 | 26 | 13 | 80 | 18,1 |
| 2/3 | 6 | 14,3 | 33 | 5,1 | 2 | 1,5 | 24 | 5,5 | 6 | 3 | 19 | 4,3 |
| 1/2/3 | 1 | 2,4 | 19 | 3 | 7 | 5,3 | 34 | 7,8 | 26 | 13 | 53 | 12 |

CCF = "clear cell focus"; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); n = FAH-Anzahl

Tab. 64: zonale Verteilung der verschiedenen FAH-Typen innerhalb des Leberläppchens nach Ethinylestradiol-Verabreichung

| 1 Woche | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|---------|-----|------|-----|---|-----|------|-----|----|-----|----|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 117 | 35 | 0 | 0 | 3 | 10 | 0 | 0 | 7 | 28 |
| 2 | 80 | 24 | 0 | 0 | 4 | 13,3 | 2 | 40 | 5 | 20 |
| 3 | 46 | 13,8 | 0 | 0 | 2 | 6,7 | 0 | 0 | 11 | 44 |
| 1/2 | 52 | 15,6 | 0 | 0 | 2 | 6,7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2/3 | 21 | 6,3 | 0 | 0 | 2 | 6,7 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| 1/2/3 | 18 | 5,4 | 0 | 0 | 17 | 56,7 | 3 | 60 | 1 | 4 |

| 4 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|----------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 165 | 35,3 | 1 | 100 | 23 | 37,7 | 9 | 24,3 | 13 | 34,2 |
| 2 | 125 | 26,8 | 0 | 0 | 7 | 11,5 | 2 | 5,4 | 7 | 18,4 |
| 3 | 65 | 13,9 | 0 | 0 | 6 | 9,8 | 4 | 10,8 | 14 | 36,8 |
| 1/2 | 57 | 12,2 | 0 | 0 | 9 | 14,8 | 9 | 24,3 | 1 | 2,6 |
| 2/3 | 25 | 5,4 | 0 | 0 | 1 | 1,6 | 3 | 8,1 | 0 | 0 |
| 1/2/3 | 30 | 6,4 | 0 | 0 | 15 | 24,6 | 10 | 27 | 3 | 7,9 |

| 13 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|-----------|-----|------|-----|----|-----|------|-----|------|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 230 | 40,4 | 1 | 50 | 32 | 33,7 | 13 | 29,6 | 4 | 11,1 |
| 2 | 138 | 24,2 | 0 | 0 | 9 | 9,5 | 3 | 6,8 | 9 | 25 |
| 3 | 56 | 9,8 | 0 | 0 | 9 | 9,5 | 3 | 6,8 | 14 | 38,9 |
| 1/2 | 77 | 13,5 | 0 | 0 | 23 | 24,2 | 1 | 2,3 | 1 | 2,8 |
| 2/3 | 26 | 4,6 | 0 | 0 | 4 | 4,2 | 2 | 4,6 | 5 | 13,9 |
| 1/2/3 | 43 | 7,5 | 1 | 50 | 18 | 19 | 22 | 50 | 3 | 8,3 |

n = FAH-Anzahl, FAH-Typen s. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 65: zonale Verteilung der GST-P-positiven und –negativen CCF innerhalb des Leberläppchens nach Ethinylestradiol-Verabreichung

| GST-P | 1 Woche | | | | 4 Wochen | | | | 13 Wochen | | | |
|-------|---------|------|---------|------|----------|------|---------|------|-----------|------|---------|------|
| | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 10 | 12,7 | 107 | 42 | 31 | 27 | 134 | 39,2 | 16 | 19,5 | 214 | 43,9 |
| 2 | 22 | 27,9 | 58 | 22,8 | 29 | 25,2 | 96 | 28,1 | 21 | 25,6 | 117 | 24 |
| 3 | 25 | 31,7 | 21 | 8,2 | 29 | 25,2 | 36 | 10,5 | 25 | 30,5 | 31 | 6,4 |
| 1/2 | 4 | 5,1 | 48 | 18,8 | 7 | 6,1 | 50 | 14,6 | 2 | 2,4 | 75 | 15,4 |
| 2/3 | 11 | 13,9 | 10 | 3,9 | 12 | 10,4 | 13 | 3,8 | 9 | 11 | 17 | 3,5 |
| 1/2/3 | 7 | 8,9 | 11 | 4,3 | 7 | 6,1 | 13 | 3,8 | 9 | 11 | 34 | 7 |

CCF = "clear cell focus"; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); n = FAH-Anzahl

Tab. 66: zonale Verteilung der verschiedenen FAH-Typen innerhalb des Leberläppchens nach PCB 126-Verabreichung

| 1 Woche | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|---------|-----|------|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 147 | 30,8 | 2 | 40 | 4 | 16 | 0 | 0 | 5 | 35,7 |
| 2 | 110 | 23,1 | 1 | 20 | 3 | 12 | 0 | 0 | 1 | 7,1 |
| 3 | 117 | 24,5 | 2 | 40 | 5 | 20 | 0 | 0 | 8 | 57,1 |
| 1/2 | 40 | 8,4 | 0 | 0 | 4 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2/3 | 42 | 8,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/2/3 | 21 | 4,4 | 0 | 0 | 9 | 36 | 2 | 100 | 0 | 0 |

| 4 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|----------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 110 | 26 | 1 | 33,3 | 11 | 24,4 | 0 | 0 | 5 | 23,8 |
| 2 | 104 | 24,6 | 1 | 33,3 | 8 | 17,8 | 0 | 0 | 6 | 28,6 |
| 3 | 115 | 27,2 | 1 | 33,3 | 13 | 28,9 | 0 | 0 | 9 | 42,9 |
| 1/2 | 43 | 10,2 | 0 | 0 | 2 | 4,4 | 0 | 0 | 1 | 4,8 |
| 2/3 | 31 | 7,3 | 0 | 0 | 1 | 2,2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/2/3 | 20 | 4,7 | 0 | 0 | 10 | 22,2 | 1 | 100 | 0 | 0 |

| 13 Wochen | CCF | | ECF | | BCF | | MCF | | NAH | |
|-----------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|----|-----|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 150 | 31,3 | 2 | 22,2 | 7 | 13 | 0 | 0 | 3 | 17,7 |
| 2 | 123 | 25,6 | 0 | 0 | 14 | 25,9 | 0 | 0 | 6 | 35,3 |
| 3 | 116 | 24,2 | 5 | 55,6 | 19 | 35,2 | 1 | 50 | 6 | 35,3 |
| 1/2 | 57 | 11,9 | 1 | 11,1 | 3 | 5,6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2/3 | 18 | 3,8 | 1 | 11,1 | 2 | 3,7 | 0 | 0 | 1 | 5,9 |
| 1/2/3 | 16 | 3,3 | 0 | 0 | 9 | 16,7 | 1 | 50 | 1 | 5,9 |

n = FAH-Anzahl, FAH-Typen s. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 67: zonale Verteilung der GST-P-positiven und –negativen CCF innerhalb des Leberläppchens nach PCB 126-Verabreichung

| GST-P | 1 Woche | | | | 4 Wochen | | | | 13 Wochen | | | |
|-------|---------|------|---------|------|----------|------|---------|------|-----------|------|---------|------|
| | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | | positiv | | negativ | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 1 | 15 | 14,2 | 132 | 35,8 | 14 | 9 | 96 | 36 | 11 | 9,7 | 139 | 38 |
| 2 | 24 | 22,6 | 86 | 23,3 | 42 | 26,9 | 62 | 23,2 | 24 | 21,1 | 99 | 27,1 |
| 3 | 41 | 38,7 | 76 | 20,6 | 70 | 44,9 | 45 | 16,9 | 62 | 54,4 | 54 | 14,8 |
| 1/2 | 2 | 1,9 | 38 | 10,3 | 10 | 6,4 | 33 | 12,4 | 6 | 5,3 | 51 | 13,9 |
| 2/3 | 19 | 17,9 | 23 | 6,2 | 14 | 9 | 17 | 6,4 | 7 | 6,1 | 11 | 3 |
| 1/2/3 | 5 | 4,7 | 14 | 3,8 | 6 | 3,9 | 14 | 5,2 | 4 | 3,5 | 12 | 3,3 |

CCF = "clear cell focus"; GST-P = Glutathion-S-Transferase (plazentare Form); n = FAH-Anzahl

Tab. 68: Gesamt-FAH-Anzahl/cm² Leberfläche

| | 1 Woche | | 4 Wochen | | 13 Wochen | |
|------------------|----------|-----|------------------|-----|-------------------|-----|
| | geom. MW | SF | geom. MW | SF | geom. MW | SF |
| Kontrolle | 10,7 | 1,7 | 13,4 | 1,9 | 11,9 | 1,6 |
| Phenobarbital | 8,6 | 2 | 7,1 ^a | 1,3 | 8,3 | 2 |
| Chloroform | 9,7 | 1,6 | 13,6 | 1,7 | 16 | 1,6 |
| Wyeth-14,643 | 19,9 | 1,8 | 13,8 | 1,6 | 19,3 | 1,5 |
| Ethinylestradiol | 10,3 | 1,8 | 15,7 | 1,3 | 22,8 ^b | 1,5 |
| PCB 126 | 13,2 | 1,7 | 12,2 | 1,4 | 15,6 | 1,6 |

geom. MW = geometrischer Mittelwert; SF= Streufaktor

a: signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,05$

b: signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe mit $p \leq 0,01$

Tab. 69: Prozentualer Anteil der FAH-Typen an der Gesamt-FAH-Anzahl; prozentualer Anteil der GST-P-positiven und -negativen FAH an der FAH-Anzahl des jeweiligen FAH-Typs in Klammern

| Kontrolle | FAH-Typ | 1 Woche | 4 Wochen | 13 Wochen |
|------------------|---------|--------------|--------------|--------------|
| | | CCF | 86,6 (22/78) | 89 (18/82) |
| | ECF | 0,2 (100/0) | 0,2 (100/0) | 0 |
| | BCF | 8,2 (11/89) | 5,6 (11/89) | 5,7 (19/81) |
| | MCF | 0,2 (0/100) | 1,1 (43/57) | 1,6 (0/100) |
| | NAH | 4,8 | 4,2 | 8,2 |
| Phenobarbital | CCF | 77,5 (17/83) | 60,2 (28/72) | 63,1 (19/81) |
| | ECF | 8,8 (50/50) | 18,7 (80/20) | 26,5 (76/24) |
| | BCF | 3,7 (53/47) | 10,7 (20/80) | 6,1 (13/87) |
| | MCF | 0 | 0,3 (0/100) | 1,1 (0/100) |
| | NAH | 10,1 | 10,1 | 3,3 |
| Chloroform | CCF | 80,7 (31/69) | 88,2 (9/91) | 85,8 (16/84) |
| | ECF | 0 | 0 | 0 |
| | BCF | 13,6 (12/88) | 4,2 (7/93) | 7,2 (7/93) |
| | MCF | 1,6 (0/100) | 0,6 (0/100) | 0,7 (0/100) |
| | NAH | 4,1 | 7 | 6,3 |
| Wyeth-14,643 | CCF | 88,7 (4/94) | 82,1 (23/77) | 79,2 (31/69) |
| | ECF | 0 | 0,1 (0/100) | 0 |
| | BCF | 5,1 (2/98) | 12,6 (2/98) | 10,2 (4/96) |
| | MCF | 0 | 0,1 (0/100) | 0,6 (0/100) |
| | NAH | 6,2 | 6,1 | 10,1 |
| Ethinylestradiol | CCF | 85,2 (24/76) | 77,3 (27/73) | 74,6 (15/85) |
| | ECF | 0 | 0,2 | 0,3 (0/100) |
| | BCF | 7,1 (0/100) | 10,1 (5/95) | 12,3 (3/97) |
| | MCF | 0,8 (0/100) | 6,1 (0/100) | 8,1 (7/93) |
| | NAH | 6,9 | 6,3 | 4,8 |
| PCB 126 | CCF | 91,6 (23/77) | 86,3 (36/64) | 85,7 (23/77) |
| | ECF | 1 (20/80) | 0,4 (0/100) | 1,6 (77/23) |
| | BCF | 4,6 (17/83) | 9,1 (15/85) | 9,5 (31/69) |
| | MCF | 0,2 (0/100) | 0,2 (0/100) | 0,4 (0/100) |
| | NAH | 2,7 | 4,1 | 2,8 |

FAH-Typen: s. Abkürzungsverzeichnis

Tab 70: Labelling-Indizes (%) des extrafokalen Lebergewebes

| Kontrolltiere | | | | | Phenobarbital | | | | |
|----------------------|------|------|------|------|----------------------|------|------|-------|-------|
| 1 Woche | Zone | | | | 1 Woche | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| 1 | 1,61 | 0,19 | 0,2 | 0,67 | 11 | 1,42 | 0,63 | 7,2 | 3,18 |
| 2 | 1,26 | 0,48 | 0,73 | 0,82 | 12 | 1,08 | 0,27 | 8,51 | 3,36 |
| 3 | 3,43 | 0,83 | 0,64 | 1,69 | 13 | 1,07 | 0,1 | 4,42 | 1,91 |
| 4 | 1,39 | 0,46 | 2,71 | 1,48 | 14 | 1,3 | 0,94 | 4,9 | 2,41 |
| 5 | 2,23 | 0,65 | 0,53 | 1,18 | 15 | 0,79 | 0,11 | 0,6 | 0,53 |
| 6 | 5,36 | 1,22 | 2,93 | 3,12 | 16 | 5,31 | 2,01 | 26,71 | 11,79 |
| 7 | 3,21 | 0,42 | 0,79 | 1,42 | 17 | 1,84 | 0,44 | 8,3 | 3,79 |
| 8 | 1,99 | 0,2 | 0,9 | 1,03 | 18 | 1,43 | 0,22 | 6,99 | 2,74 |
| 9 | 2,54 | 0,2 | 0,51 | 1,1 | 19 | 1,27 | 0,48 | 5,96 | 2,65 |
| | | | | | 20 | 1,03 | 0,22 | 3,34 | 1,52 |
| geom. MW | 2,31 | 0,43 | 0,81 | 1,26 | geom. MW | 1,41 | 0,36 | 5,48 | 2,58 |
| SF | 1,6 | 1,95 | 2,3 | 1,56 | SF | 1,68 | 2,56 | 2,6 | 2,18 |
| 4 Wochen | Zone | | | | 4 Wochen | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| 61 | 1,25 | 0,1 | 0,27 | 0,57 | 71 | 0,86 | 0,11 | 0,95 | 0,65 |
| 62 | 2,59 | 0,2 | 1,89 | 1,6 | 72 | 3,39 | 0,5 | 4,37 | 2,75 |
| 63 | 3,49 | 0,43 | 0,77 | 1,65 | 73 | 1,06 | 0,18 | 2,98 | 1,39 |
| 64 | 2,43 | 0,29 | 0,35 | 1,05 | 74 | 3,51 | 0,57 | 3,51 | 2,6 |
| 65 | 1,4 | 0,2 | 0,18 | 0,6 | 75 | 2,32 | 0,29 | 1,76 | 1,51 |
| 66 | 1,71 | 0,86 | 1,25 | 1,29 | 76 | 5,42 | 0,65 | 2,2 | 2,78 |
| 67 | 1,18 | 0,1 | 0,81 | 0,71 | 77 | 0,83 | 0,28 | 1,26 | 0,8 |
| 68 | 1,75 | 0,54 | 1 | 1,1 | 78 | 1,01 | 0,58 | 4,9 | 2,19 |
| 69 | 2,37 | 0,62 | 1,6 | 1,58 | 79 | 0,43 | 0,0 | 1,43 | 0,63 |
| 70 | 2,37 | 0,52 | 0,76 | 1,24 | 80 | 0,72 | 0,11 | 4,3 | 1,74 |
| geom. MW | 1,94 | 0,31 | 0,71 | 1,06 | geom. MW | 1,43 | 0,25 | 2,4 | 1,48 |
| SF | 1,43 | 2,13 | 2,17 | 1,13 | SF | 2,3 | 2,45 | 1,79 | 1,79 |
| 13 Wochen | Zone | | | | 13 Wochen | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| 121 | 1,94 | 0,39 | 0,28 | 1,15 | 131 | 1,26 | 0,4 | 2,5 | 1,41 |
| 122 | 1,77 | 0,29 | 0,47 | 0,88 | 132 | 0,18 | 0,1 | 4,45 | 1,61 |
| 123 | 2,23 | 0,31 | 1,2 | 1,3 | 133 | 1,57 | 0,75 | 8,37 | 3,55 |
| 124 | 1,21 | 0,1 | 0,55 | 0,65 | 134 | 0,43 | 0,29 | 2,13 | 0,99 |
| 125 | 2,59 | 0,53 | 1,34 | 1,53 | 135 | 0,93 | 0,09 | 2,03 | 1,04 |
| 126 | 4,55 | 1,91 | 2,98 | 3,21 | 136 | 0,8 | 0,1 | 4,84 | 1,96 |
| 127 | 1,2 | 0,47 | 0,45 | 0,72 | 137 | 1,38 | 0,67 | 1,55 | 1,22 |
| | | | | | 138 | 1,05 | 0,21 | 1,72 | 0,98 |
| 129 | 1,16 | 0,4 | 0,68 | 0,78 | 139 | 0,25 | 0,2 | 0,43 | 0,3 |
| 130 | 1,19 | 0,77 | 1,76 | 1,24 | 140 | 0,89 | 0,2 | 4,96 | 2,07 |
| geom. MW | 1,78 | 0,43 | 0,83 | 1,13 | geom. MW | 0,72 | 0,23 | 2,54 | 1,28 |
| SF | 1,43 | 2,21 | 2,14 | 1,63 | SF | 2,09 | 2,45 | 2,3 | 1,92 |

geom. MW = geometrischer Mittelwert; ges. = gesamtes Leberläppchen; SF = Streufaktor

Tabl. 71: Labelling-Indizes (%) des extrafokalen Lebergewebes

| Chloroform | | | | | Wyeth-14,643 | | | | |
|-------------------|-------|------|-------|-------|---------------------|-------|-------|------|-------|
| 1 Woche | Zone | | | | 1 Woche | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| 21 | 2,29 | 0,83 | 6,65 | 3,58 | 31 | 36,31 | 4,4 | 3,62 | 16,78 |
| 22 | 22,59 | 4,14 | 3,48 | 11,08 | 32 | 37,43 | 2,28 | 3,07 | 15,57 |
| 23 | 30,49 | 3,44 | 8,11 | 14,67 | 33 | 35,87 | 2,74 | 8,41 | 17,26 |
| | | | | | 34 | 36,58 | 1,35 | 1,35 | 14,87 |
| 25 | 24,67 | 0,24 | 0,94 | 9,6 | 35 | 47,49 | 1,82 | 1,02 | 18,58 |
| 26 | 4,6 | 0,1 | 5,53 | 3,33 | 36 | 37,96 | 1,92 | 1,69 | 15,05 |
| 27 | 33,13 | 1,08 | 1,07 | 13,07 | 37 | 41,58 | 1,9 | 3,36 | 16,61 |
| 28 | 35,44 | 3,81 | 3,44 | 16 | 38 | 42,2 | 2,25 | 1,63 | 16,47 |
| 29 | 18,17 | 1,13 | 1,64 | 7,14 | 39 | 50,61 | 12,42 | 7,37 | 26,14 |
| 30 | 14,58 | 1,16 | 2,53 | 6,44 | 40 | 52 | 5,75 | 3,92 | 24,72 |
| geom. MW | 15,63 | 1,05 | 2,91 | 8,26 | geom. MW | 41,42 | 2,88 | 2,84 | 17,88 |
| SF | 2,59 | 3,53 | 2,18 | 1,79 | SF | 1,15 | 1,95 | 2,02 | 1,22 |
| 4 Wochen | Zone | | | | 4 Wochen | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| | | | | | 91 | 21,75 | 5,24 | 2,34 | 10,8 |
| 82 | 21,88 | 3,25 | 3,3 | 9,54 | 92 | 17,66 | 2,22 | 1,33 | 7,36 |
| 83 | 1,42 | 0,52 | 4,22 | 2,09 | 93 | 11,8 | 2,59 | 1,79 | 5,68 |
| | | | | | 94 | 22,63 | 4,18 | 0,99 | 9,63 |
| | | | | | 95 | 23,66 | 4,31 | 2,26 | 11,23 |
| 86 | 15,96 | 1,43 | 3,74 | 7,66 | 96 | 23,12 | 4,93 | 2,26 | 11,34 |
| | | | | | 97 | 17,82 | 0,81 | 0,28 | 6,55 |
| | | | | | 98 | 19,82 | 1,46 | 1,15 | 8,59 |
| 89 | 7,03 | 1,49 | 6,29 | 4,98 | 99 | 11,48 | 2,46 | 2,46 | 5,81 |
| 90 | 5,98 | 0,41 | 2,26 | 3 | 100 | 22,12 | 2,23 | 1,74 | 9,75 |
| geom. MW | 7,31 | 1,08 | 3,75 | 4,7 | geom. MW | 18,63 | 2,65 | 1,44 | 8,41 |
| SF | 2,9 | 2,33 | 1,45 | 1,88 | SF | 1,31 | 1,8 | 1,93 | 1,31 |
| 13 Wochen | Zone | | | | 13 Wochen | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| 141 | 10,43 | 2,86 | 6,59 | 7,09 | 151 | 28,06 | 14,39 | 12,6 | 19,24 |
| 142 | 5,29 | 2,11 | 8,18 | 5,26 | 152 | 16,37 | 6,4 | 2,45 | 8,86 |
| | | | | | 153 | 20,58 | 6,68 | 4,08 | 11,56 |
| | | | | | 154 | 14,72 | 7,11 | 2,93 | 8,6 |
| 145 | 8,8 | 3,02 | 16,88 | 9,8 | 155 | 20,49 | 5,4 | 2,54 | 9,81 |
| 146 | 4,31 | 2,47 | 13,6 | 6,89 | 156 | 10,99 | 2,98 | 0,85 | 5,4 |
| 147 | 2,64 | 0,66 | 8,39 | 3,77 | 157 | 15,03 | 5,89 | 1,19 | 7,95 |
| | | | | | 158 | 8,22 | 2,08 | 0,53 | 3,93 |
| 149 | 8,27 | 2,46 | 9,63 | 6,9 | 159 | 14,5 | 8,3 | 3,97 | 9,39 |
| 150 | 2,14 | 0,31 | 2,63 | 1,75 | 160 | 18,98 | 5,12 | 1,25 | 9,56 |
| geom. MW | 5,16 | 1,56 | 8,26 | 5,28 | geom. MW | 15,95 | 5,71 | 2,19 | 8,71 |
| SF | 1,85 | 2,42 | 1,82 | 1,77 | SF | 1,41 | 1,7 | 2,49 | 1,53 |

geom. MW = geometrischer Mittelwert; ges. = gesamtes Leberläppchen; SF = Streufaktor

Tab 72: Labelling-Indizes (%) des extrafokalen Lebergewebes

| Ethinylestradiol | | | | | PCB 126 | | | | |
|-------------------------|-------------|------|------|------|------------------|-------------|------|------|------|
| 1 Woche | Zone | | | | 1 Woche | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| 41 | 4,88 | 0,72 | 0,6 | 2,01 | 51 | 1,32 | 0,42 | 0,91 | 0,9 |
| 42 | 8,33 | 1,57 | 2,86 | 4,38 | 52 | 2,03 | 1,34 | 2,2 | 1,87 |
| 43 | 7,29 | 1,04 | 0,28 | 2,8 | 53 | 0,88 | 0,49 | 1,74 | 1,04 |
| 44 | 12,42 | 2,75 | 3,95 | 6,37 | 54 | 2,09 | 0,78 | 0,86 | 1,28 |
| 45 | 9,18 | 0,94 | 0,61 | 3,65 | 55 | 2 | 0,2 | 0,68 | 0,99 |
| 46 | 10,41 | 2,38 | 1,2 | 4,6 | 56 | 1,9 | 0,62 | 0,95 | 1,19 |
| 47 | 6,75 | 2,68 | 2,8 | 4,17 | 57 | 4,04 | 0,79 | 1,15 | 2,08 |
| 48 | 15,72 | 2,46 | 3,82 | 7,57 | 58 | 1,47 | 0,1 | 0,29 | 0,62 |
| 49 | 10,31 | 1,58 | 4,77 | 5,46 | 59 | 2,06 | 0,52 | 0,26 | 0,93 |
| 50 | 12,06 | 4,67 | 5,62 | 7,52 | 60 | 1,63 | 0 | 0,34 | 0,66 |
| geom. MW | 9,26 | 1,8 | 1,82 | 4,5 | geom. MW | 1,81 | 0,37 | 0,75 | 1,08 |
| SF | 1,4 | 1,78 | 2,85 | 1,53 | SF | 1,48 | 2,84 | 2,08 | 1,48 |
| 4 Wochen | Zone | | | | 4 Wochen | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| 101 | 4,29 | 1,81 | 1,11 | 2,41 | 111 | 3,68 | 0,1 | 0,28 | 1,41 |
| 102 | 5,68 | 2,64 | 2,37 | 3,69 | 112 | 1 | 0,43 | 0,43 | 0,64 |
| 103 | 3,29 | 3,28 | 2,78 | 3,11 | 113 | 3,11 | 0,37 | 0,72 | 1,41 |
| 104 | 8,85 | 1,92 | 0,71 | 3,92 | 114 | 3,69 | 0,18 | 0,68 | 1,56 |
| 105 | 4,75 | 1,56 | 0,73 | 2,37 | 115 | 1,67 | 0,1 | 0,78 | 0,86 |
| 106 | 4,09 | 1,97 | 0,58 | 2,26 | 116 | 1,11 | 0 | 0,59 | 0,57 |
| 107 | 3,7 | 1,84 | 0,98 | 2,19 | 117 | 2,31 | 0,3 | 1,91 | 1,55 |
| 108 | 2,11 | 1,97 | 5,7 | 3,22 | 118 | 2,77 | 0,42 | 0,31 | 1,23 |
| 109 | 3,67 | 0,84 | 1,16 | 1,89 | 119 | 4,05 | 0,34 | 0,44 | 1,72 |
| 110 | 8,87 | 4,36 | 3,84 | 5,82 | 120 | 3,37 | 0,89 | 0,71 | 1,73 |
| geom. MW | 4,51 | 2,04 | 1,49 | 2,92 | geom. MW | 2,42 | 0,23 | 0,59 | 1,51 |
| SF | 1,55 | 1,56 | 2,2 | 1,41 | SF | 1,66 | 2,44 | 1,73 | 1,42 |
| 13 Wochen | Zone | | | | 13 Wochen | Zone | | | |
| Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. | Tier-Nr. | 1 | 2 | 3 | ges. |
| 161 | 6,75 | 1,97 | 1,14 | 3,43 | 171 | 4,59 | 1,19 | 0,78 | 2,3 |
| 162 | 7,64 | 2,56 | 2,08 | 4,21 | 172 | 2,91 | 0,48 | 0,97 | 1,48 |
| 163 | 7,9 | 3,82 | 6,59 | 6,27 | 173 | 2,67 | 0,2 | 0,19 | 1,07 |
| 164 | 9,8 | 1,29 | 0,54 | 3,99 | 174 | 3,84 | 0,39 | 0,49 | 1,67 |
| 165 | 14,5 | 3,16 | 3,21 | 7,6 | 175 | 3,96 | 0,35 | 0,69 | 1,74 |
| 166 | 4,55 | 2,25 | 2,53 | 3,2 | 176 | 2,12 | 0,37 | 0,68 | 1,09 |
| 167 | 13,92 | 3,12 | 2,72 | 6,99 | 177 | 2,31 | 0,21 | 0,32 | 1,02 |
| 168 | 6,05 | 2,11 | 6,96 | 5,13 | | | | | |
| 169 | 7,42 | 4,34 | 2,91 | 5,03 | 179 | 3,49 | 0,48 | 0,09 | 1,42 |
| | | | | | | | | | |
| geom. MW | 8,18 | 2,58 | 2,5 | 4,89 | geom. MW | 3,13 | 0,39 | 0,42 | 1,42 |
| SF | 1,46 | 1,45 | 2,22 | 1,36 | SF | 1,32 | 1,75 | 2,26 | 1,33 |

geom. MW = geometrischer Mittelwert; ges. = gesamtes Leberläppchen; SF = Streufaktor

Bezugsquellen

Aake Bergmann, Dept. of Environmental Chemistry, Wallenberg Laboratory, Stockholm
PCB 126

ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA
Alzet®Osmotic Pump, model 2ML 1

BASF AG, Ludwigshafen
Formalin 4 %
Ethanol 100 %
Glycerin reinst

Becker & Co., Castrop-Rauxel
Drahtkäfig, Typ DK III

BioGenex, San Ramon, CA, USA
Polyclonal Antibody to Glutathione-S-Transferase (placental form) (Rabbit anti-GST-P)
Monoclonal Antibody to Bromodeoxyuridin (Mouse anti-BrdU)
Biotinylated anti-Mouse immunoglobulin in PBS
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin in PBS
Fast Red Substrate Pack
Liquid DAB Substrate Pack, Ready-to-Use
OptiMax®Plus Automated Cell Stainer
OptiMax™ Wash Buffer (20x)
Pap Pen, hydrophobic slide marker XT 001

Boehringer Ingelheim Pharma KG, Biberach an der Riss
Wistar Ratten, Chbb: THOM (SPF)

ChemSyn Science Laboratories, Lenexa, KS
Wyeth-14,643

Fluka Chemika, Buchs, Schweiz

Chloroform
Hämatoxylin
Chloralhydrat

Janssen GmbH, Neuss

Metofane®

Klingentalmühle AG, Kaiseraugst/Schweiz

Kliba-Haltungsdiet (Ratte/Hamster/Maus)

LEICA, Bensheim

Lichtmikroskop DM RBE
Bildanalyse-System QQ500MC

Medite, Medizintechnik, Burgdorf

Pertex Eindeckmedium
Eindeckautomat RCM 90

Merck, Darmstadt

Kaisers Glyceringelatine
Salzsäure 37 %
Kaliumaluminiumsulfat
Essigsäure konz.
Natriumjodat
Eosin/Eosin G
Zitronensäure-Monohydrat p. A.

Microm, Walldorf

HM 355 Rotationsmikrotom

Pfälzische Spiritfabrik, Ludwigshafen

Ethanol 100 %
Xylol

PSI (Pool of Scientific Instruments) Grünewald, Laudenbach

Starfrost Objektträger

Kühlplatte

Riedel-de Haen, Seelze

Aceton p. A. 32201

Serva Feinbiochemikalien, Heidelberg

BrdU

Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt

2L Processor MK II

Shandon Histocentre

SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA

Phenobarbital

Ethinylestradiol

Protease from *Streptomyces griseus* (lot No. 117H1022)

Lösungen

Hämatoxylin nach Ehrlich (sauer)

12 g Hämatoxylin lösen in

600 ml 96 %igem Ethanol

600 ml Aqua bidest

600 ml reinstes Glycerin

18 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)

60 ml konzentrierte Essigsäure

Zugabe von 0,2 g Natriumjodat pro 1 g Hämatoxylin

Hämatoxylin nach Mayer (saures Hämaun)

2 g Hämatoxylin lösen in

2000 ml Aqua bidest

100 g Kaliumaluminiumsulfat

100 g Chloralhydrat

2 g Zitronensäure

Zugabe von 0,2 g Natriumjodat pro 1 g Hämatoxylin

Eosin-Lösung 0,5 %ig

10 g Eosin gelblich in 2000 ml Aqua dest. lösen

20 ml 40 %iges ungepuffertes Formalin zugeben

HCl-Alkohol 0,5 %ig

995 ml 70 %iges Ethanol

5 ml HCl 32 %ig

APTS (3-Aminopropyltriethoxysilan)-Beschichtung

Schwenken der Objektträger in einer Lösung von 1 g APTS in 100 ml reinem Aceton (2 Minuten)

Spülen mit Aceton (2x kurz)

Spülen mit Aq. bidest (1x kurz)

Trocknung über Nacht bei 60 °C

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher und Herrn Dr. R. Bahnemann danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in das Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Giessen und in das Labor ZIP (Zellproliferation und Immunpathologie) der Toxikologie der BASF AG Ludwigshafen.

Der BASF AG Ludwigshafen bin ich für die Finanzierung dieser Arbeit dankbar. Allen Mitarbeitern der Bereiche Pathologie, Histologie und Bibliothek der Toxikologie der BASF AG, die mir mit Rat und Tat zu Hilfe waren, sage ich herzlichen Dank. Bei H.-R. Hofmann bedanke ich mich für die Einführung in die Geheimnisse der Immunhistologie. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. B. Kittel und Frau Dr. K. Küttler für die fachliche Betreuung und, ebenso wie Herrn Dr. C. Gembardt, für die Hilfeleistung bei allen sonstigen Problemen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen möchte ich für die schöne Zeit in Giessen und die stete Hilfsbereitschaft in allen Dingen danken. Herrn Dr. Failing und Herrn Heiter vom Institut für Biomathematik der JLU Giessen danke ich für die Hilfe und ihre unerschöpfliche Geduld bei der statistischen Beurteilung und der graphischen Darstellung der Daten.

Schließlich möchte ich mich bei allen Freunden, Verwandten und Kollegen bedanken, die durch aufbauende Worte und Taten sowie Korrekturlesen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere Peter hat mir mit seiner Freundschaft und seinem feinsinnigen Humor durch so manche FAH-bedingte Krise geholfen.