

Untersuchungen zur Mutagenität der Lebensmittelfarbstoffe
Amaranth und Erythrosin B anhand der
Induktion von Schwesterchromatidaustauschen und
Chromosomenaberrationen bei Humanlymphozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Bitzer, Christiane, geb. Scholz
aus Göttingen

Gießen 2004

Aus dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med Th. Eikmann

Gutachter: Frau Professor Dr. Anna Barbara Fischer

Gutachter: Frau Professor Dr. M. Koch

Tag der Disputation: 31.01.2006

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Einleitung	2
2.1.1	Geschichtliches zu Lebensmittelfarbstoffen	3
2.1.2	Gesetzgebung in Deutschland	4
2.1.3	Lebensmittelfarbstoffe in der Europäischen Union	7
2.1.4	Lebensmittelfarbstoffe im außereuropäischen Ausland	8
2.2	Gesundheitliche Aspekte von Lebensmittelfarbstoffen	8
2.2.1	Toxizität	9
2.2.2	Mutagenität	9
2.2.3	Kanzerogenität	10
2.3	Testung von Lebensmittelfarbstoffen	11
2.3.2	Testmethoden <i>in vivo</i>	11
2.3.2.1	Ermittlung der Toxizität	11
2.3.2.2	Prüfung der Kanzerogenität	12
2.3.2.3	Ermittlung der Mutagenität <i>in vivo</i>	13
2.3.3	Mutagenitätstests <i>in vitro</i>	14
2.3.3.1	Ames-Test	14
2.3.3.2	E. coli-Test	15
2.3.3.3	Hefetest	15
2.3.3.4	Mäuselymphomzell-Assay	16
2.3.3.5	Chromosomenaberrationen	16

2.3.3.6	Schwesterchromatidaustausche (SCEs)	20
3	Material und Methoden	24
3.1	Testsubstanzen	24
3.1.1	Azofarbstoffe	24
3.1.1.1	Amaranth	25
3.1.1.2	1. Positivkontrolle: Buttergelb	26
3.1.2	Xanthenfarbstoffe	27
3.1.2.1	Erythrosin B	27
3.1.3	2. Positivkontrolle: Ethylmethansulfonat	28
3.2	Zellen	29
3.3	Zellkulturmedium	31
3.4	Weitere Chemikalien	31
3.5	Protokoll der Untersuchung von Schwesterchromatidaustauschen	33
3.6	Protokoll der Untersuchung auf Aberrationen	36
3.7	Statistik	37
3.7.1	Kruskal-Wallis Test	38
3.7.2	Paarvergleichstest	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Chromosomenaberrationen	40
4.1.1	Erythrosin B	42
4.1.2	Amaranth	42

4.1.3	Diaminoazobenzol (Buttergelb)	43
4.1.4	Ethylmethansulfonat	44
4.2	Schwesterchromatidaustausche	45
4.2.1	Erythrosin B	46
4.2.2	Amaranth	49
4.2.3	Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb)	52
4.2.4	Ethylmethansulfonat	54
5	Diskussion	57
6	Zusammenfassung	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Verzeichnis der Abbildungen	92
9	Verzeichnis der Tabellen	93

Erklärung

Danksagung

Lebenslauf

Zusammenfassung

Summary

1 Einleitung und Fragestellung

In den vergangenen Jahren hat sich das Umwelt- und Gesundheitsbewusstsein deutlich verstärkt. In diesem Zusammenhang wird auch die Ernährung kritisch betrachtet. Das Interesse geht dahin, überflüssige Belastungen des Körpers mit möglicherweise nicht un-schädlichen Stoffen zu reduzieren. Ohne Frage müssen sich auch die Lebensmittelfarbstoffe dieser Betrachtung unterziehen lassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die mutagene Wirkung ausgewählter Lebensmittelfarbstoffe auf Humanlymphozyten *in vitro* zu testen. Am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universität Giessen wurden schon mehrere Studien zum Thema Lebensmittelfarbstoffe durchgeführt, allerdings wurden anstelle der menschlichen Lymphozyten Peritonealfibroblasten des Chinesischen Hamsters verwendet (Müller 1988, Wellhausen 1989, Moos 1991, Fischer et al. 1990, Galal 1998). Außerdem wurde im Anschluss an die hier vorgestellten Experimente eine weitere Arbeit über die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Lebensmittelfarbstoffe in unserem Labor durchgeführt (FEINÄUGLE 1993). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Aspekten, einmal mit der klastogenen Wirkung von Lebensmittelfarbstoffen, die sich in Chromosomenaberrationen ausdrückt, und zum anderen mit mutagenen Auswirkungen, die sich durch die Rate von Schwesterchromatidaustauschen darstellen lassen. Als mutagene bzw. kanzerogene Kontrollsubstanzen dienen Ethylmethansulfonat (EMS) und Dimethylaminoazobenzol (DAB).

2 Literaturübersicht

2.1 Einleitung

Was wären unsere Lebensmittel ohne Farbe? Der Mensch schmeckt die Nahrungsmittel nicht nur mit seinen Geschmacksnerven, schon vorher "isst" er unter anderem mit den Augen. In diesem Zusammenhang entstanden weit verbreitete Redewendungen wie: "Wenn ich das sehe, läuft mir das Wasser im Mund zusammen". Schon beim Anblick von Speisen wird das Verdauungssystem in Gang gesetzt. Das ist der Grund, warum den Lebensmitteln oft Farbstoffe zugesetzt werden. Nach Verarbeitung und Lagerung verblasst die natürliche Farbe häufig. Sie soll nun durch Zusatz von Farbstoffen wieder hergestellt werden. Ein weiterer Grund für den Einsatz von Lebensmittelfarbstoffen ist die Vorstellung, die die Verbraucher vom Aussehen eines Produktes haben, dass z.B. Orangen- oder Zitronenlimonaden orange bzw. gelb sein müssen. Die meisten Menschen sind sich gar nicht bewusst, in wie vielen Lebensmitteln künstliche Farbstoffe versteckt sind. Bewusst oder unbewusst sorgt der Käufer selbst auch mit seinem Kaufverhalten dafür, dass viele Genussmittel eine nachträgliche Färbung erhalten.

Für die beiden untersuchten Lebensmittelfarbstoffe Amaranth und Erythrosin wurde berechnet, wie viel ein Mensch im Durchschnitt und im Extremfall täglich zu sich nehmen kann. Bei extremem Gebrauch, der allerdings in Deutschland vor allem bei dem eingeschränkten Einsatz von Erythrosin B sehr unwahrscheinlich ist, könnte am Tag bis zu einem Viertel des ADI aufgenommen werden (Tabelle 1).

Tabelle 1. Tägliche Aufnahme von Lebensmittelfarbstoffen (nach COMBES und HAVELAND-SMITH 1982)

	Durchschnittlicher Gebrauch	Extremer Gebrauch	ADI (pro 50-70 kg Körpergewicht)
Amaranth	1,44 mg	16,59 mg	40-56 mg
Erythrosin	0,21 mg	1,56 mg	5-7 mg

2.1.1 Geschichtliches zu Lebensmittelfarbstoffen

Das Färben von Lebensmitteln ist keineswegs eine neue Erfindung. Schon zu Zeiten der Römer benutzte man Farben, um die Speisen und Getränke zu verschönern. Natürlich standen damals noch keine künstlichen Lebensmittelfarben zur Verfügung, sondern man hielt sich an natürliche Farben, zum Beispiel an Safran und Kurkuma.

Erst vor ca. 200 Jahren, seit dem Entstehen der chemischen Industrie, wurden auch kupfer-, blei- und quecksilberhaltige Stoffe zum Färben benutzt. Sie hatten den großen Vorteil der schöneren und intensiveren Färbungen, doch wusste man bald über ihre Giftigkeit Bescheid, was im ersten Farbengesetz von 1887 zum Verbot dieser Verbindungen führte.

Die Entwicklung ging weiter; neue Stoffe, nämlich Azofarbstoffe, erschienen auf dem Markt. Mit Raffinesse konnten sogar schon verdorbene Lebensmittel ein derartiges Aussehen erhalten, dass der Käufer über die Frische der Speise getäuscht wurde. Einer dieser Farbstoffe war das Dimethylaminoazobenzol, besser bekannt als Buttergelb. Auch mit diesem Färbemittel war man nicht lange glücklich, da in Tierversuchen eine krebserregende Wirkung gezeigt

wurde, was wiederum zum Verbot führte (DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT 1956, Mitteilung 9). Von Kinosita (1937) unternommene Untersuchungen zu diesem Stoff wurden später von Druckrey und Mitarbeitern in den Jahren 1948 und 1955 bestätigt. Anfangs wurden alle Azofarbstoffe verboten. In weiteren Versuchen setzte man sich zum Ziel, die Unschädlichkeit einiger Stoffe nachzuweisen, was zur Wiedezulassung einzelner Azofarbstoffe führte. Ganz ausgeräumt werden konnten die Zweifel allerdings bis heute nicht. 1949 gründete man auf Drängen von A. Butenandt eine "Fachkommission zur Bearbeitung des Lebensmittelfarbstoffproblems". Diese Kommission, die später in „Farbstoffkommission“ umbenannt wurde, widmet sich der Aufgabe, "die wissenschaftlichen Grundlagen für den Schutz der Bevölkerung vor möglichen gesundheitlichen Schädigungen durch Lebensmittelzusätze, vor allem durch Farbstoffe, zu erarbeiten" (DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT 1962, Mitteilung 11).

2.1.2 Gesetzgebung in Deutschland

Lebensmittelfarbstoffe sind "Zusatzstoffe" im Sinne des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes. Ihr Einsatz wird in den §§ 2, 11 und 12 dieses Gesetzes geregelt. Damit gemeint sind "Stoffe, die dazu bestimmt sind, Lebensmitteln zur Beeinflussung ihrer Beschaffenheit oder zur Erzielung bestimmter Eigenschaften oder Wirkungen zugesetzt zu werden". Es dürfen nur solche Stoffe zugelassen werden, deren Unbedenklichkeit erwiesen ist. Weitere generelle Einschränkungen sind zu beachten. Die Zumischung darf nicht zur Täuschung des Verbrauchers führen, und der Zusatz muss technisch notwendig sein. Die zugelassenen Substanzen sind in Anlage 6 der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung namentlich aufgeführt. Zurzeit finden hier ca. 30 Lebensmittelfarbstoffe Erwähnung, die aber zum großen Teil nur in eingeschränktem Rahmen verwendet werden dürfen. Genauer gesagt sind nach gültigem Recht nur die Farbstoffe,

Riboflavin E101 (Vitamin B2) und Beta-Carotin E160a (Provitamin A), sowie natürliche Inhaltsstoffe wie Chlorophyll E140 (grüner Blattfarbstoff) und Rote-Bete-Farbstoff E162 für alle Lebensmittel zugelassen. Generell gilt allerdings, dass die natürliche Herkunft eines Farbstoffes keine Gewähr für die Unbedenklichkeit bietet. Daher gelten für diese Farbstoffe die gleichen Anforderungen wie für synthetische Farbstoffe (KÖNIG 1965).

Es dürfen mit zugelassenen Farbstoffen folgende Lebensmittel gefärbt werden (ELMADFA et al. 1996, 14):

Süßwaren:

- Zuckerüberzüge und Zuckerwaren; ausgenommen sind Lakritzen sowie Waren, die mit Milch, Butter, Honig, Ei, Malz, Karamell, Kakao, Schokolade oder Kaffee zubereitet sind.
- Cocktailkirschen
- Kandierte Früchte, mit Ausnahme von Orangeat und Zitronat
- Kunstspeiseeis
- Marzipan und marzipanähnliche Erzeugnisse

Fischerzeugnisse:

- Fischrogenerzeugnisse
- Garnelen in Dosen
- Lachsersatz

Sonst. Lebensmittel:

- Kalorienarme Konfitüren
- Creme- und Geleespeisen, Pudding, rote

Grütze, süße Soßen und Suppen, ausgenommen die mit Kakao, Schokolade, Kaffee, Ei oder Karamell hergestellten Erzeugnisse

- Brausen, künstliche Heiß- und Kaltgetränke
- Halbfettmargarine, Margarine
- Chesterkäse, halbfester Schnittkäse, Schnittkäse
- Fruchtaromaliköre, Kräuterbrandweine und -liköre
- Kunsthonig
- Erdbeer-, Himbeer-, Kirschkonserven

Die Lebensmittelfarbstoffe, für die eine einheitliche Regelung in allen Mitgliedsstaaten der Europäischen Union gilt, sind durch eine E-Nummer gekennzeichnet. Allerdings unterscheiden sich die Bestimmungen weltweit sehr voneinander. Dieses wird an den folgenden Beispielen deutlich: Amaranth und Erythrosin B sind in Deutschland, wenn auch eingeschränkt, erlaubt. In den USA sind diese beiden Farbstoffe in den letzten Jahren vollständig aus Lebensmitteln verbannt worden.

Damit der Verbraucher die Möglichkeit erhält zu wissen, was er an Zusatzstoffen mit einem bestimmten Lebensmittel zu sich nimmt, hat der Gesetzgeber vorgeschrieben, dass alle Zusatzstoffe in der Zutatenliste einzeln oder mit einer Gruppenbezeichnung erwähnt sein müssen. Der kritische Käufer kann so beeinflussen, welches Produkt auf dem Markt bleibt und welches nicht. Die Nachfrage regelt das Angebot.

Für alle Lebensmittelfarbstoffe hat die WHO/FAO ADI-Werte festgelegt. Die Bezeichnung "ADI" steht für "Acceptable Daily Intake"

und beschreibt eine tolerierbare Tagesdosis einer Substanz, die von einer Person ein Leben lang täglich eingenommen werden kann, ohne dass gesundheitliche Schäden zu erwarten sind. Diese Angaben beziehen sich auf eine Menge in Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht und basieren auf der Durchführung von Tierversuchen, in denen die akute, subakute und chronische Toxizität getestet wird. Um sicher zu gehen, wird die durch Tierversuche ermittelte unschädliche Dosis (No Observed Adverse Effect Level = NOAEL) durch den Faktor 100 geteilt, zusammengesetzt aus dem Faktor 10 für die Übertragung von Tierversuchen auf den Menschen und einem weiteren Faktor 10 als Sicherheitsspielraum (ELMADFA et al. 1996).

2.1.3 Lebensmittelfarbstoffe in der Europäischen Union

Seit der Gründung der Europäischen Union bedarf es dringend nicht nur einer nationalen Gesetzgebung, sondern vor allem auch einer EU-Harmonisierung. In der Vergangenheit hat die EU mehrere Zusatzstoffrichtlinien erlassen, doch eine Vereinheitlichung konnte nicht vollständig erreicht werden, da die Kommission in Brüssel nicht genügend Kompetenzen von den Mitgliedstaaten übertragen bekam.

Seit dem 6.2.1998 ist die neue Zusatzstoff-Zulassungsverordnung in Kraft. In deren Anlage 1 sind die in der EU zugelassenen Lebensmittelfarbstoffe aufgeführt. Für diese gelten, wie für andere Lebensmittelzusatzstoffe auch, die folgenden grundsätzlichen Prinzipien:

1. die gesundheitliche Unbedenklichkeit des Stoffes für den Verbraucher
2. die hinreichende technologische Notwendigkeit des Stoffes für den Zusatz (diese ist bereits gegeben, wenn der Stoff in einem

Mitgliedsstaat der EU zugelassen ist)

3. die Forderung, dass durch die Verwendung der Stoffe eine Irreführung des Verbrauchers ausgeschlossen ist

2.1.4 Lebensmittelfarbstoffe im außereuropäischen Ausland

Als Beispiel sollen die Vereinigten Staaten von Amerika zitiert werden. Dort ist die "United States Food and Drug Administration" (FDA) zuständig für Bestimmungen zum Einsatz von Lebensmittelfarbstoffen. Bevor Lebensmittelfarbstoffe auf den Markt kommen, müssen sie auf eventuelle schädigende Wirkungen untersucht werden. Häufig werden diese Austestungen von Lebensmittelfirmen, die den Zusatzstoff auf den Markt bringen wollen, veranlasst oder selbst vorgenommen. Die Ergebnisse werden der FDA vorgelegt. Ist die FDA der Meinung, dass der Farbstoff vollständig oder nur eingeschränkt zugelassen werden kann, erscheint er auf einer Liste, die besagt, dass er vorläufig zugelassen ist. 1960 standen auf dieser Liste ca. 200 Farbstoffe. Inzwischen ist die Liste um einiges reduziert worden (ANONYM 1988). Unter anderem wurde 1976 Amaranth gestrichen, seit 1990 ist auch Erythrosin B von der Liste verbannt worden (NATIONAL ARCHIVES AND RECORDS ADMINISTRATION 1991).

2.2 Gesundheitliche Aspekte von Lebensmittelfarbstoffen

Das Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz verlangt, dass

Lebensmittelzusatzstoffe gesundheitlich unbedenklich sein müssen. Es gibt viele Aspekte dabei zu beachten. Besonders wichtig erscheinen Fragen zum Potenzial Krebs, genetische Veränderungen und Allergien auszulösen. Aber auch ungewollte toxische Wirkungen in anderen Bereichen, wie der Einfluss auf das Immunsystem, auf die Ontogenese und das Wachstum, auf die Fertilität und auf das Allgemeinbefinden dürfen nicht aus den Augen gelassen werden.

2.2.1 Toxizität

Unter Toxizität versteht man Giftigkeit oder eine gesundheitsschädigende Wirkung, in der Regel bezogen auf chemische Substanzen oder physikalische Faktoren. Toxizität ist immer eine Frage der Dosis. Die Angaben werden meist in Milligramm bezogen auf das Körpergewicht oder die Körperoberfläche vorgenommen (PSCHYREMBEL 1998, S. 1584).

2.2.2 Mutagenität

Mutagenität ist definiert als das Potenzial eines Agens, Erb-gutveränderung auszulösen (PSCHYREMBEL 1998, S. 1060). Mutationen können durch verschiedene Agenzien hervorgerufen werden, z.B. ionisierende Strahlung oder chemische Verbindungen. Mutationen treten in unterschiedlicher Form mit unterschiedlichen Folgen auf. Man unterscheidet 1. Änderungen der Basensequenz in der DNA (Genmutationen), 2. Änderungen der Zahl der Chromosomen (numerische Aberrationen: Aneuploidie, Polyploidie), und 3. strukturelle Änderungen der Chromosomen (strukturelle Aberrationen).

Mutationseffekte lassen sich an Zellkulturen oder in Tierversuchen experimentell aufzeigen. Auch beim Menschen beobachtet man

exogen ausgelöste Mutationen. Somatische Mutationen werden als eine mögliche Ursache der Kanzerogenese angesehen (PSCHYREMBEL 1998, S. 1060).

Mutagenität und Kanzerogenität sind aber nicht synonym zu gebrauchen. Zahlreiche Wissenschaftler haben sich damit befasst, eine Korrelation zwischen den beiden Ereignissen aufzuzeigen (McCANN et al. 1975, HOLLSTEIN et al. 1979, ROSENKRANZ und POIRIER 1979). Da der erste Schritt bei der Umwandlung einer normalen somatischen Zelle in eine Krebszelle meist in einer Mutation besteht, können durch Mutagenitätstests mit relativ wenig Aufwand potenziell kanzerogene Substanzen identifiziert werden (GARNER und NUTMAN 1977). Es können jedoch auch epigenetische Veränderungen zu Krebszellen führen (LEWIN 1998, TROSKO und UPHAM 2005).

2.2.3 Kanzerogenität

Kanzerogene sind Substanzen oder Faktoren, die beim Menschen oder im Tierversuch die Inzidenz maligner Tumoren erhöhen, die Latenzzeit der Kanzerogenese verkürzen oder das Tumorspektrum in einem Gewebe verändern können (PSCHYREMBEL 1998, S. 799). Krebs kann ausgelöst werden durch chemische Stoffe, unter ihnen auch natürliche Substanzen, sowie physikalische Einwirkungen.

Im Mehrstufenmodell der Krebsentstehung wird dieser Prozess in Initiation, Promotion, Progression und Metastasierung unterteilt. Genmutationen sind für die Initiationsphase verantwortlich, während bei der Promotion und den anschließenden Prozessen auch sogenannte „nicht genotoxische“ Kanzerogene eine Rolle spielen. Dazu gehören u.a. Mitosegifte, endokrine Disruptoren und Substanzen, die sich auf Zellproliferation oder Zelltod auswirken (FAHRIG 1993a, Chen et al. 2004).

2.3 Testung von Lebensmittelfarbstoffen

Es werden verschiedene Testverfahren zum Aufdecken von toxischem, mutagenem und kanzerogenem Potenzial ausgewählter Substanzen eingesetzt. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, müssen die methodischen Variationen möglichst gering gehalten werden. Kilbey et al. (1984) haben ein Handbuch über die gebräuchlichen Testmethoden zur Mutagenitätsprüfung herausgegeben, in dem eingehende Beschreibungen und Hintergrundinformationen zusammengestellt wurden.

Einige der wichtigsten Testmethoden werden in unserer Arbeit beschrieben, wobei den Verfahren zur Ermittlung von Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidaustauschen besondere Bedeutung zukommt, da wir sie selbst anwendeten.

2.3.2 Testmethoden *in vivo*

2.3.2.1 Ermittlung der Toxizität

Die Toxizität eines Stoffes ist dosisabhängig. Es lassen sich eine akute, eine subchronische und eine chronische Toxizität unterscheiden.

Die Toxizität von Chemikalien wird mit Hilfe von Tierversuchen ermittelt. Im ersten Versuchsabschnitt geht es um die akute Toxizität. Zunächst wird die Substanzmenge in mg/kg Körpergewicht festgestellt, durch deren Aufnahme 50% der Versuchstiere sterben (LD₅₀). Bei Lebensmittelzusatzstoffen erfolgt die Behandlung oral. Ebenso wird auf Haut- und Schleimhautverträglichkeit bzw. Sensibilisierungsfähigkeit geachtet. Anschließend wird im 90-Tage-

Versuch an zwei Tierarten, davon ein Nicht-Nager, die subchronische Toxizität eruiert. Ziel ist es, Wissen über Kumulation, Rückbildung von entstandenen Schäden und Adaptation zu erlangen. Ebenfalls wichtig sind bei der Toxizitätsermittlung Untersuchungen zu Resorption, Verteilung, Um- und Abbau im Organismus sowie Ausscheidung.

Die chronische Toxizität wird in Langzeitversuchen an zwei Tierspezies getestet. Die Versuche laufen über etwa 2 Jahre (entsprechend ca. 60 Menschenjahren). Besonders entscheidend ist auch der Einfluss der geprüften Substanzen auf die Reproduktion über mindestens zwei Generationen und auf die Embryotoxizität einschließlich der Teratogenität. Lebensmittelzusatzstoffe müssen an mindestens zwei Tierarten (Maus oder Ratte und Kaninchen) untersucht werden (BERTRAM 1989).

2.3.2.2 Prüfung der Kanzerogenität

Bei der Ermittlung einer kanzerogenen Potenz eines Stoffes spielt sowohl die Dosis als auch die Zeitspanne der Anwendung eine Rolle. Den Versuchstieren wird die zu testende Substanz oral, per Injektion oder kutan über einen festgelegten Zeitraum verabreicht. Durch Sektion der Tiere und die histologische Auswertung der Gewebe kann man prüfen, ob Geschwülste sowie Zellveränderungen auftreten, die eine Vorstufe von Krebs bedeuten können. Geschwülste können sowohl lokal als auch systemisch auftreten.

Ein wichtiger Faktor ist die stark eingeschränkte Reversibilität der Zellveränderungen. Obwohl es Reparaturmechanismen gibt, die potenziell mutagene und kanzerogene DNA-Schäden beheben, wird über die Lebenszeit eine Summation der schädigenden Einflüsse durch kanzerogene Substanzen angenommen, auch wenn die Exposition für längere Zeit unterbrochen wird.

2.3.2.3 Ermittlung der Mutagenität *in vivo*

Einer der gebräuchlichsten Tests ist der Mikronukleustest. Ermittelt werden Chromosomenveränderungen bei Versuchstieren, denen eine Testsubstanz meist *per os* oder intraperitoneal zugeführt wurde. Nach einer vorher festgelegten Einwirkzeit fertigt man Knochenmarksausstriche an. Mikronuklei können durch klastogene Agenzien entstehen und sich in der folgenden Weise bei der Zellteilung manifestieren: In der Anaphase bewegen sich zentrische Elemente auf die Spindelpole zu. Azentrische Chromatiden- und Chromosomenfragmente bleiben zurück. Nach der Telophase bilden die unzerstörten Chromosomen und zentrischen Fragmente einen normalen Tochterzellkern. Die beschädigten Chromosomen werden auch mit in die Tochterzelle einbezogen, bilden aber einen oder mehrere zusätzliche Kerne, die kleiner sind als der Hauptkern und daher Mikronuklei genannt werden. Voraussetzung für diesen Vorgang ist das Durchlaufen einer oder mehrerer Mitosen. Mikronuklei sind unter anderem in Myeloblasten, Myelocyten und Erythroblasten zu finden. Am einfachsten und ergiebigsten ist die Auswertung von polychromatischen Erythrozyten. Die Auswertung ist einfacher und schneller als Analysen von Chromosomenaberrationen (SCHMID 1975, HEDDLE et al. 1984).

Ein weiterer Test, der *in vivo* induzierte somatische Mutationen nachweist, ist der Fellfleckentest, der meistens an der Maus durchgeführt wird. Hierbei werden Embryonen, die für verschiedene rezessive Fellfarbenmutationen rezessiv sind, während des 8.-11. Tages der Embryonalentwicklung im Uterus einer Testsubstanz ausgesetzt. Dies geschieht durch intraperitoneale Injektion oder über die Exposition des Muttertieres durch das Futter. Führt diese Behandlung in einer Pigmentvorläuferzelle zur Änderung oder zum Verlust des Wildtypallels eines der heterozygoten Fellfarbgene, so entsteht nach mehreren Zellteilungen ein Fellfleck (FAHRIG 1993).

2.3.3 Mutagenitätstests *in vitro*

Auch *in vitro* kann die toxische sowie mutagene Potenz von chemischen oder physikalischen Agenzien erforscht werden. Bei toxikologischen Untersuchungen liegt das Augenmerk vor allem auf der Aufdeckung von Wirkmechanismen, während Mutagenitätstest überwiegend zur Beantwortung der Frage eingesetzt werden, ob ein Stoff überhaupt mutagen wirkt und somit auch über DNA-Veränderungen in somatischen Zellen potenziell kanzerogen ist; gleichzeitig muss auch an Keimzellmutagenese gedacht werden. Durch *in vitro*-Testmethoden können aber auch Aussagen zu Wirkmechanismen gewonnen werden.

2.3.3.1 Ames-Test

Der Ames-Test ist ein Bakterien-Test, der zur Ermittlung von Genmutationen dient (AMES et al. 1975). Ein besonderer Vorteil dieses Testverfahrens ist seine schnelle Durchführbarkeit. Als Testsystem werden ausgewählte Stämme von *Salmonella typhimurium*-Bakterien mit einem besonderen genetischen Defekt benutzt. Es handelt sich um histidin-auxotrophe Mutanten (His⁻), die ohne Zugabe von Histidin zum Nährboden nicht mehr zu Kolonien heranwachsen können. Löst die Testsubstanz eine bestimmte Mutation aus, so erhält das Bakterium seine eingebüsste Fähigkeit zurück (Rückmutation). Nun wachsen Kolonien auf dem Nährboden heran, ohne dass Histidin hinzugegeben werden muss.

Mit Hilfe der mikrosomalen Fraktion aus Rattenleber (S9-Fraktion) kann der im Körper ablaufende Metabolismus der Testsubstanz imitiert werden, so dass getestet werden kann, ob eine Substanz eventuell erst durch enzymatischen Abbau in der Leber mutagene Potenz erhält.

Der Test fällt in maximal 90% der Fälle richtig positiv und in maximal 80% der Fälle richtig negativ aus (STEGEMANN 1981), d.h. seine Ergebnisse stimmen mit denjenigen anderer Mutagenitäts- bzw. Kanzerogenitätstests gut überein. Durch die Entwicklung weiterer *Salmonella*-Mutanten mit unterschiedlicher Metabolisierungsfähigkeit oder Veränderungen im DNA-Reparatursystem wurde die Empfindlichkeit dieses Testsystems weiter erhöht. Eine revidierte Methodenbeschreibung wurde von Maron und Ames (1983) gegeben.

2.3.3.2 E. coli-Test

Escherichia coli-Zellen eignen sich ebenfalls für ein Screening auf Mutagenität. Unter anderem werden der WP2-Stamm und dessen zur Reparatur befähigte bzw. nicht befähigte Abkömmlinge eingesetzt, um DNA-Basensubstitutionen aufzudecken. Dieser Test ist einfach und schnell durchzuführen, allerdings ist er nicht geeignet, um den zusätzlichen Einbau oder Verlust einer Base aufzuzeigen. Eine Imitation des Metabolismus durch Zusatz von S9-Fraktion ist möglich (GREEN 1976).

2.3.3.3 Hefetest

Ein häufig benutzter Vertreter der eukaryotischen Mikroorganismen ist die Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae*. Es gibt verschiedene Stämme (z.B. D3 bis D7, MP-I), mit denen sich unterschiedlich mutagen wirkende Ereignisse darstellen lassen, z.B. Genkonversion, Vorwärts- und Rückwärtsmutation. Dieser Test existiert in zwei Formen, einmal als *in vitro*-Test und einmal als "host mediated"-Test, bei dem die Hefezellen intraperitoneal in einem Wirt exponiert werden (FAHRIG 1975).

2.3.3.4 Mäuselymphomzellen-Assay

Es gibt verschiedene Säugerzellkultursysteme, die gut geeignet zur Feststellung von Chromosomen- und Punktmutationen sind. Als günstiges Genmarkersystem hat sich die murine Zelllinie L5178Y/TK^{+/-} herausgestellt, bei der die Thymidinkinase heterozygot angelegt ist (TK^{+/-}). Sie besitzt die Eigenschaft, Thymidinanaloga in die DNA einzubauen, was den Zelltod zur Folge hat. Hat eine Vorwärtsmutation stattgefunden (TK^{+/-} → TK^{-/-}), so ist ein Einbau von toxisch wirkenden Thymidinanaloga nicht möglich, und die Zelle bleibt am Leben. Dieser Test kann mit und ohne metabolische Aktivierung durchgeführt werden (TURNER et al. 1984).

2.3.3.5 Chromosomenaberrationen

Als Chromosomenaberrationen bezeichnet man numerische oder strukturelle Abweichungen vom normalen Chromosomensatz. Überwiegend werden Säugerzellen, auch Humanzellen, eingesetzt. Die Chromosomen einer Zelle sind zum Zeitpunkt der Zellteilung in der Metaphase darstellbar. Mit Hilfe eines Spindelgiftes blockiert man die Mitose in dieser Phase. Um eine gute Ausbreitung der Chromosomen zu erreichen, werden die Zellen anschließend bei der Aufarbeitung in einer hypotonischen Salzlösung zum Quellen gebracht. Die Chromosomen lassen sich u.a. durch Färbung mit Giemsa, einem an DNA bindenden Farbstoff, darstellen. Die Auswertung findet unter dem Lichtmikroskop statt.

Numerische Aberrationen, auch Aneuploidie genannt, sind durch Zählen der Chromosomen pro Metaphase aufzudecken. Allerdings muss man sich im Klaren sein, dass sich auch durch die Präparierungsmaßnahmen einzelne Chromosomen weiter von den restlichen Chromosomen entfernen und somit bei der Auszählung

leicht übersehen werden können. Beispiele für numerische Aberrationen beim Menschen sind gonosomale Aneuploidien (Klinefelter-Syndrom, Turner-Syndrom) oder die Trisomie 21 (Down-Syndrom). Die meisten somatischen Zellen sind diploid, d.h. sie enthalten den doppelten Chromosomensatz ($2n$). Es gibt aber auch Zellen mit mehreren Kopien sämtlicher Chromosomen, d.h. polyploide Zellen, als Beispiel können regenerierende Leberzellen angeführt werden.

Unter strukturellen Aberrationen versteht man Abweichungen von der normalen Form der Chromosomen. Abhängig davon, ob die Aberrationen auf einer oder parallel auf beiden Chromatiden auftreten, unterscheidet man Aberrationen vom Chromosomentyp und vom Chromatidtyp (ISHIDATE 1988). Tumorzellen zeigen häufig einen abnormen Karyotyp mit überwiegend strukturellen Aberrationen, aber auch numerische Aberrationen können vorkommen (MITTELMAN 1990, KIRSCH-VOLDERS et al. 2002).

Folgende Aberrationen vom Chromosomentyp werden unterschieden:

- a) Chromosomengaps: achromatische Lücken, die auf beiden Chromatiden parallel auftreten
- b) terminale Deletionen: zu einem Chromosom gehört ein Paar azentrischer Fragmente
- c) Double Minutes: zu einem Chromosom gehört ein Paar punktförmiger azentrischer Fragmente. Die Fragmente sind kleiner als die der terminalen Deletion und werden als interstitielle Deletion angesehen
- d) Azentrische Ringe: die Ringe enthalten kein Zentromer und sind aus einer terminalen Deletion entstanden
- e) Zentrische Ringe: die Ringe enthalten ein Zentromer
- f) Inversion: nach einem Bruch haben sich azentrische Fragmente an einer anderen Stelle des Chromosoms wieder eingefügt, so dass sich die relative Position des Zentromers verschiebt

- g) Polyzentrische Aberration: zwei oder mehr Chromosomen brechen und verschmelzen an den Bruchstellen miteinander, wobei gleichzeitig dizentrische oder trizentrische Chromosomen entstehen, die meist von azentrischen Fragmenten begleitet sind.

Aberrationen vom Chromatidtyp:

- a) Gap: Diskontinuität einer Chromatide, auch als achromatische Läsion bezeichnet
- b) Bruch: Diskontinuität einer Chromatide, wobei im Präparat meist eine deutliche Abweichung des Fragments von der ursprünglichen Ausrichtung zu beobachten ist
- c) Translokation: Austausch von Chromatiden zwischen verschiedenen Chromosomen, es entsteht ein vier- oder mehr-armiges Gebilde.

Aus Aberrationen von Chromatidtyp können in der nächsten Mitose abgeleitete Aberrationen entstehen, wie z.B. Ringchromosomen, dizentrische Chromosomen oder azentrische Fragmente, die von Aberrationen des Chromosomentyps nicht zu unterscheiden sind (EVANS 1984). Einzelne strukturelle Aberrationen sind in Abbildung 5 mit Beispielen aus den eigenen Präparaten illustriert.

Neuere Färbemethoden können Untereinheiten der Chromosomen, sogenannte Banden, darstellen, wodurch feinere Analysen der strukturellen Aberrationen vorgenommen werden können. Die gebräuchlichsten Methoden sind die Behandlung der Chromosomenpräparate mit der Trypsin-Giemsa-Färbung, die G-Banden erzeugt; bei dieser Färbung werden die Chromosomen kontrolliert mit Trypsin angedaut und dann mit Giemsa angefärbt. Q-Banden werden durch Färbung der Chromosomen mit Fluoreszenzfarbstoffen erzeugt, z.B. Quinacrin, die bevorzugt an A-T-reiche DNA binden. Die G- und Q-Färbungen markieren dieselben Chromosomenabschnitte. Im Gegensatz dazu werden durch die sogenannten R-Färbung (reverse

Färbung) die in den beiden erstgenannten Färbungen schwach färbbaren Anteile markiert; dies geschieht, indem man vor der Giemsa-Färbung die Chromosomen in einer Salzlösung denaturiert, wobei vor allem A-T-reiche DNA betroffen ist. Durch weitere Färbungen werden die C-Banden erzeugt, bei denen wahrscheinlich das konstitutive Heterochromatin gefärbt wird und die Zentromere z.B. in multizentrischen Chromosomen markiert werden, sowie die T-Banden, die die Telomerenregion der Chromosomen darstellen (STRACHAN und REED 1996).

Verschiedene Bandenmuster zeigen eine unterschiedliche DNA-Basen-Zusammensetzung auf. Giemsa- und Q-Banden sind relativ reich an Adenin und Thymin (A-T), und die reversen Banden sind relativ reich an Guanin und Cytosin (G-C) und werden als Chromosomensegmente mit konzentrierten aktiven Genen betrachtet. Die GQ/R-Bandenverbindungsstellen werden als Orte von Austausch und Translokationen durch klastogene Agenzien angesehen sowie auch als „hot-spots“ für das Vorkommen mitotischer Chiasmen (KUHN und THERMAN 1986).

Mit der sogenannten FISH-Methode, bei der eine *in situ* Hybridisierung mit fluoreszierenden Farbstoffen vorgenommen wird, die an chromosomenspezifische DNA-„Libraries“ gebunden sind, kann man heute einzelne Chromosomen nicht nur in Mitosen, sondern auch in Interphasekernen sichtbar machen. Durch diese Färbung können Chromosomen sicher identifiziert werden, Aberrationen entdeckt und zuverlässig einzelnen Chromosomen zugeordnet werden. Die FISH-Färbung spielt eine zunehmend wichtige Rolle in zahlreichen zytogenetischen Forschungs- und klinischen Anwendungsgebieten, bei pränataler Diagnose, Tumorbilogie, Genamplifikation und Genkartierung (TRASK 1991, KORENBERG et al. 1992, BAJALICA et al. 1992, PLUMMER et al. 1994).

2.3.3.6 Schwesterchromatidaustausche (SCEs)

Durch bestimmte zytogenetische Methoden können Veränderungen innerhalb eines Chromosoms dargestellt werden. Ein Chromosom besteht aus zwei identischen Chromatiden. Bei einem mit z.B. Giemsa gefärbten Chromosom sehen beide Chromatiden gleich aus. Man kann keine Aussage darüber treffen, ob während der vorangegangenen Zellteilungen Ereignisse passierten, bei denen die beiden Chromatiden an der gleichen Stelle aufgebrochen wurden und die Enden jeweils am anderen Chromatid durch einen Reparaturmechanismus wieder verbunden wurden. Derartige Schwesterchromatidaustausche (SCEs) lassen sich kenntlich machen, indem die während der DNA-Synthese replizierten Chromatiden markiert werden.

Die erste Veröffentlichung zu diesem Thema stammt von Taylor (1958). Er stellte fest, dass Chromosomen, die den ersten Verdopplungszyklus in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Thymidin und den folgenden Zellzyklus in Abwesenheit dieses Isotops durchliefen, unterschiedlich markierte Chromatiden aufwiesen. Bei einigen Chromosomen fielen symmetrische Austausche von Teilen der Chromatiden (SCEs) auf. Diese autoradiographische Methode war allerdings sehr zeitaufwändig und daher nicht für Routinezwecke geeignet. Außerdem besaß sie im Vergleich zu späteren Methoden eine geringere Auflösungsleistung.

Etwa 15 Jahre später wurde die Methode von Perry und Wolff (1974) und von Latt (1974) insofern verändert, dass anstelle der Radioisotope 5-Bromodesoxyuridin (BrdU) eingesetzt wurde. Die unterschiedliche Inkorporation von diesem Marker in die DNA resultiert in einem unterschiedlichen Färbeverhalten der Chromatiden und ermöglicht es, die Schwesterchromatiden zu unterscheiden (Abbildung 1). Im 1. Zellzyklus wird in der S-Phase BrdU in beide DNA-Stränge eingebaut, so dass in der 1. Mitose beide Chromatiden zur Hälfte substituiert sind. Als Ergebnis des 2. Zellzyklus hat jeweils eine Chromatide zur Hälfte und die andere auf beiden DNA-Strängen BrdU aufgenommen,

wodurch sich die beiden Chromatiden unterschiedlich anfärben. Die Färbung wird entweder mit einem fluoreszierenden Farbstoff allein, z.B. Bisbenzimid, oder mit Fluoreszenzfärbung, UV-Bestrahlung und Giemsa-Färbung vorgenommen. Die Fluoreszenz-plus-Giemsa- (FPG-) Färbung erlaubt die Herstellung permanenter Präparate. Die Präparate werden unter einem Lichtmikroskop ausgewertet. Beispiele für Chromosomen mit SCEs gibt Abbildung 2.

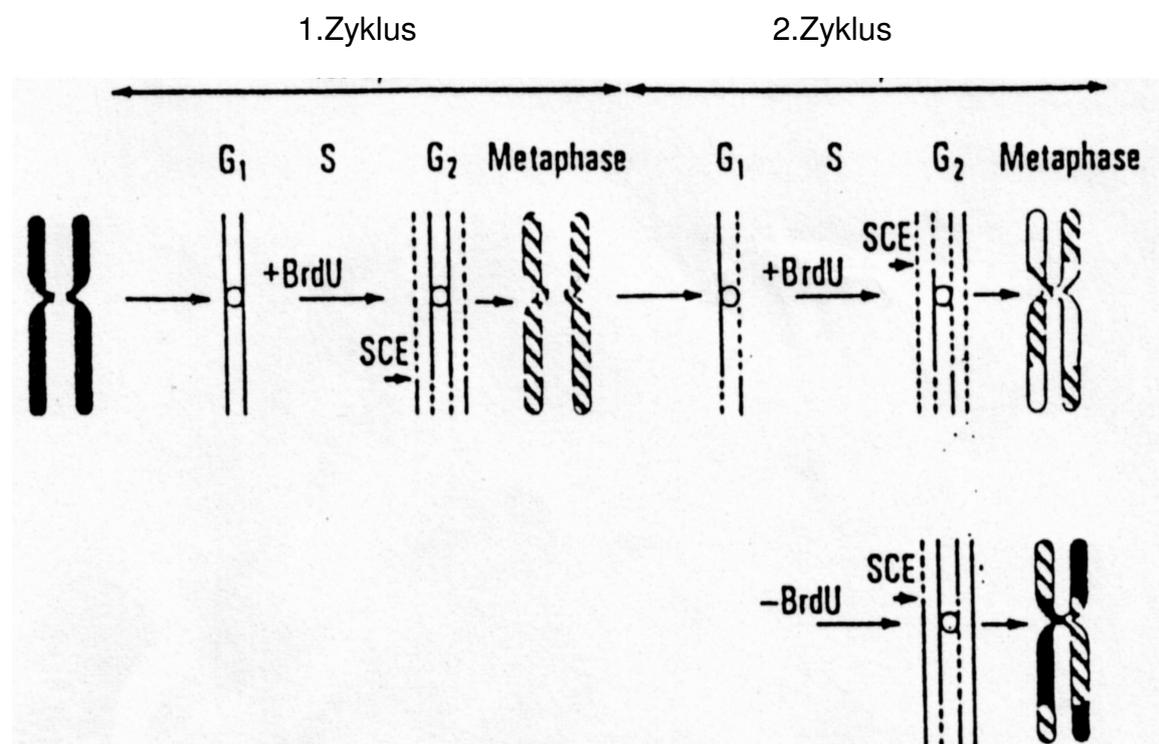


Abbildung 1. BrdU-Inkorporation und Entstehung von Schwesterchromatidaustauschen (nach PERRY und THOMPSON 1984).

Die SCE-Testung wird mit verschiedenen kultivierten diploiden Zellen durchgeführt, z.B. mit Zellen des Chinesischen Hamsters oder mit Humanlymphozyten. Da die Einwirkzeit von BrdU einen Zeitraum von

mindestens zwei Replikationszyklen betragen muss, variieren die Versuchszeiten je nach Zellart. Die menschlichen Lymphozyten haben eine ungefähre Zellzyklusdauer von 24 Stunden. Bei einer Aufarbeitung nach 72 Stunden hat man eine ausreichende Menge 2. Mitosen zur Verfügung (s. Abbildung 3 und Ergebnisse 4.1).

Chromosom ohne Schwesterchromatidaustausch



Chromosomen mit mehrfachen Schwesterchromatidaustauschen

Abbildung 2. Beispiele für Chromosomen mit und ohne Schwesterchromatidaustausche

Mitoseausbeute in Humanlymphozytenkulturen

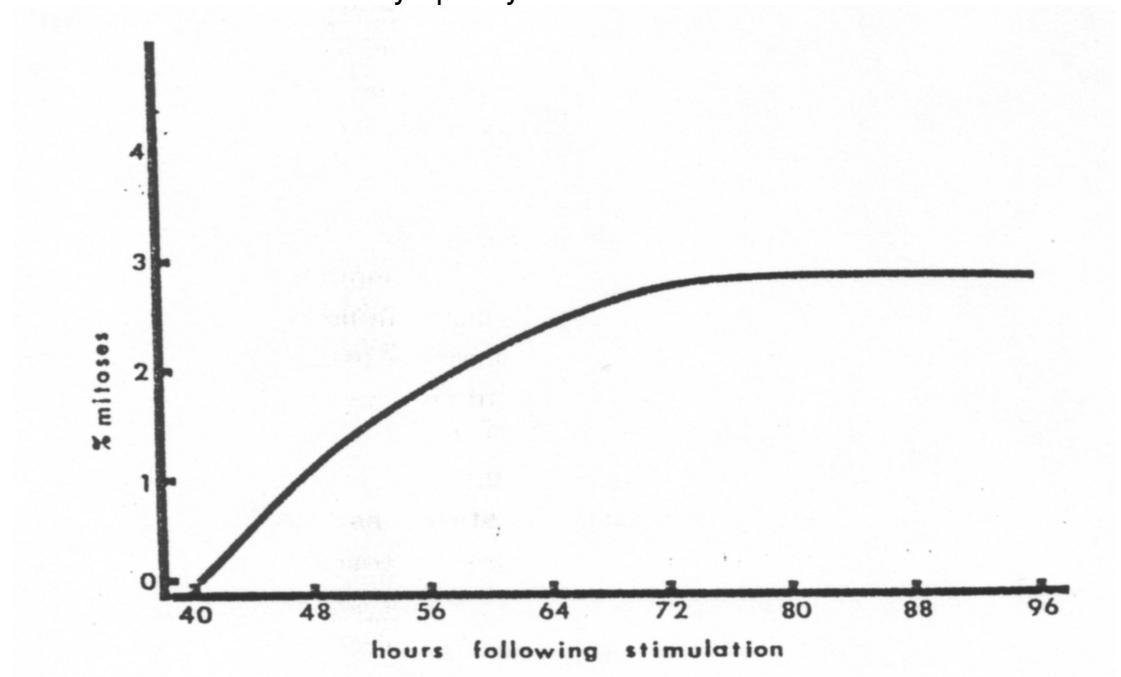


Abbildung 3. Darstellung der Mitoseausbeute in Humanlymphozytenkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation mit Phytohämagglutinin (VERMA und BABU 1989, S.10)

3 Material und Methoden

3.1 Testsubstanzen

Zu untersuchen waren die Farbstoffe Erythrosin B und Amaranth sowie als Positivkontrollen Ethylmethansulfonat (EMS) und Buttergelb (DAB). Als Positivkontrolle wird im Allgemeinen eine Testsubstanz mitgeführt, von der man erwartet, dass sich mit ihr unter den Versuchsbedingungen deutliche Ergebnisse aufzeigen lassen. Von jedem dieser Stoffe wurde eine Stammlösung angefertigt, aus der dann verschiedene Konzentrationen hergestellt wurden.

3.1.1 Azofarbstoffe

Azoverbindungen sind die zahlenmäßig größte Farbstoffklasse im Color Index mit über 2000 gelisteten Verbindungen und damit eine sehr wichtige Gruppe von künstlichen organischen Farbstoffen (BERTRAM 1989). Sie finden unter anderem Anwendung beim Färben von Textilien, Holz, Papier, Kosmetika, Arzneimitteln und Lebensmitteln. Der farbgebende Anteil des Stoffes ist die Azogruppe (-N=N-). Diese Gruppe ist beidseits an aromatische Reste gebunden. Je nach Anzahl der Azogruppen handelt es sich um einen Mono-, Di- oder Triazofarbstoff. Wir untersuchten zwei Farbstoffe aus dieser Gruppe, Amaranth als zugelassenen Lebensmittelfarbstoff und das verbotene Buttergelb als mutagene Kontrollsubstanz.

3.1.1.1 Amaranth

Synonyme: L-Rot 3, Naphtholrot, Bordeaux S, FD&C Red 2, Food Red 9, Acid Red 27

EG-Nr.: E 123

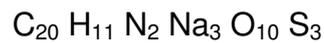
Color Index-Nr.: 16185

Mol-Gewicht: 604,49

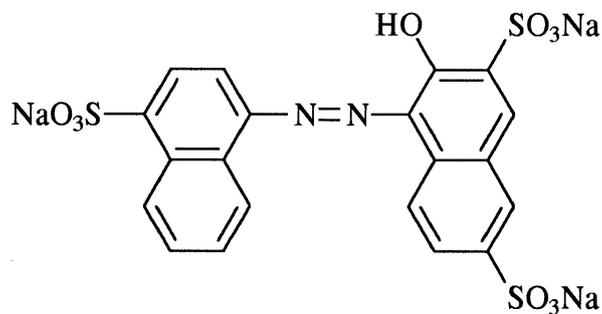
Farbe: rot

Klasse: Monoazofarbstoff

Formel: Hydroxynaphthalindisulfonsäure (Tri-Natrium-salz)



Strukturformel:



Herkunft: synthetisch hergestellt

Eigenschaften: gute Lichtechtheit

gute Hitzebeständigkeit

gut löslich in Wasser, mäßig in Glycerin

Verwendung: Liköre, Speiseeis, Pudding, Kosmetika, (Wolle,

Seide)

ADI-Wert: 0,8 mg/Tag und kg Körpergewicht

3.1.1.2 1. Positivkontrolle: Buttergelb

Synonyme: Dimethylaminoazobenzol, N,N-Dimethyl-4-phenylazoanillin, Dimethylgelb, Sudangelb GG

Color Index-Nr.: 11020

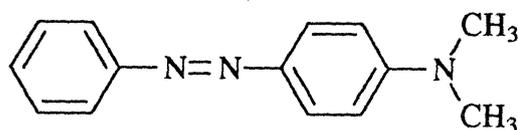
Mol-Gewicht: 225,30

Farbe: gelb

Klasse: Monoazofarbstoff

Formel: $C_{14} H_{15} N_3$

Strukturformel:



Herkunft: synthetisch hergestellt

Eigenschaften: unlöslich in Wasser, gut löslich in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln

Verwendung: früher zur Gelbfärbung von Butter (bis 1938) genutzt, heute als Indikator für chemische Analysen

ADI-Wert: -

3.1.2 Xanthenfarbstoffe

Diese Farbstoffklasse zeichnet sich durch große Brillanz und Farbstärke aus. Zu dieser Klasse gehören unter anderem Eosin, Fluorescein, Rhodamin und Erythrosin B. Nur der letztgenannte Farbstoff ist in Deutschland zum Färben von Lebensmitteln zugelassen.

3.1.2.1 Erythrosin B

Synonyme: LB-Rot 1, L-Rot 11, FD&C Red 3, Food Red 14, Acid Red 51

EG-Nr.: E 127

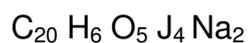
Color Index-Nr.: 45430

Mol-Gewicht: 879,92

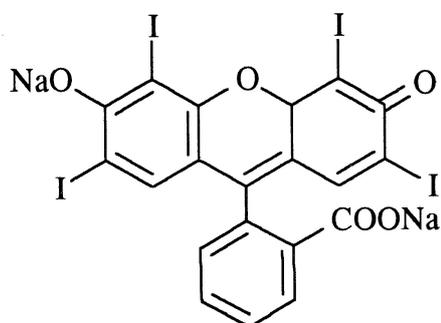
Farbe: rot

Klasse: Fluoresceinfarbstoffe, Xanthen

Formel: Tetrajodfluorescein (Di-Natriumsalz)



Strukturformel:

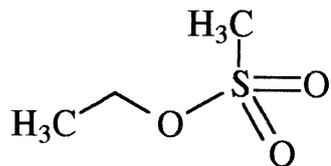


Herkunft:	synthetisch hergestellt
Eigenschaften:	geringe Lichtechtheit pH-Beständigkeit Hitzebeständigkeit gut bis 140°C Löslichkeit in Wasser und Äthanol
Verwendung:	Cocktail- und kandierte Kirschen, Obstsalat in Dosen, (Kosmetika, Mikroskopie)
ADI-Wert:	0,1 mg/Tag und kg Körpergewicht

3.1.3

2. Positivkontrolle: Ethylmethansulfonat

Synonyme:	Ethylmethansulfonsäure
Mol-Gewicht:	124,16
Formel:	$\text{CH}_3 \text{SO}_3 \text{C}_2\text{H}_5$
Strukturformel:	



3.2 Zellen

Für die gesamten Versuche wurden Humanlymphozyten verwendet. Das Blut stammte von ein und derselben Person (weiblich, 26 Jahre, Nichtraucherin), so dass interpersonelle Unterschiede ausgeschlossen waren. Allerdings wurde dafür in Kauf genommen, dass eventuell Beeinflussungen durch die Auswahl der Versuchsperson auftraten.

Humanlymphozyten haben einen diploiden Chromosomensatz mit 46 Chromosomen, darunter 44 Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen. Die Chromosomen werden nach verschiedenen Merkmalen klassifiziert; in Betracht gezogen werden die Gesamtlänge, die Lage des Zentromers und die Länge der vom Zentromer ausgehenden Arme (ALBERTS et al. 1986). Nach den genannten Kriterien werden sieben Gruppen gebildet, dazu gesellen sich die Geschlechtschromosomen. Nach der ISCN-Klassifikation (1985) ordnet man die Chromosomen folgenden Gruppen zu: A (1-3), B (4, 5), C (6-12, X), D (13-15), E (16-18), F (19, 20) und G (21, 22, Y). Durch die G-Bandenfärbung lassen sich die Chromosomen in den einzelnen Gruppen genauer identifizieren und zuordnen.

Abbildung 4 zeigt den Karyotyp eines Lymphozyten der Probandin nach konventioneller Giemsa-Färbung. Da es sich um eine weibliche Versuchsperson handelt, finden sich immer zwei X-Chromosomen.

Deutlich lassen sich der doppelte Chromosomensatz (Diploidie) und die beiden Untereinheiten eines Chromosoms, nämlich die paarigen Chromatiden (Schwesterchromatiden), unterscheiden.

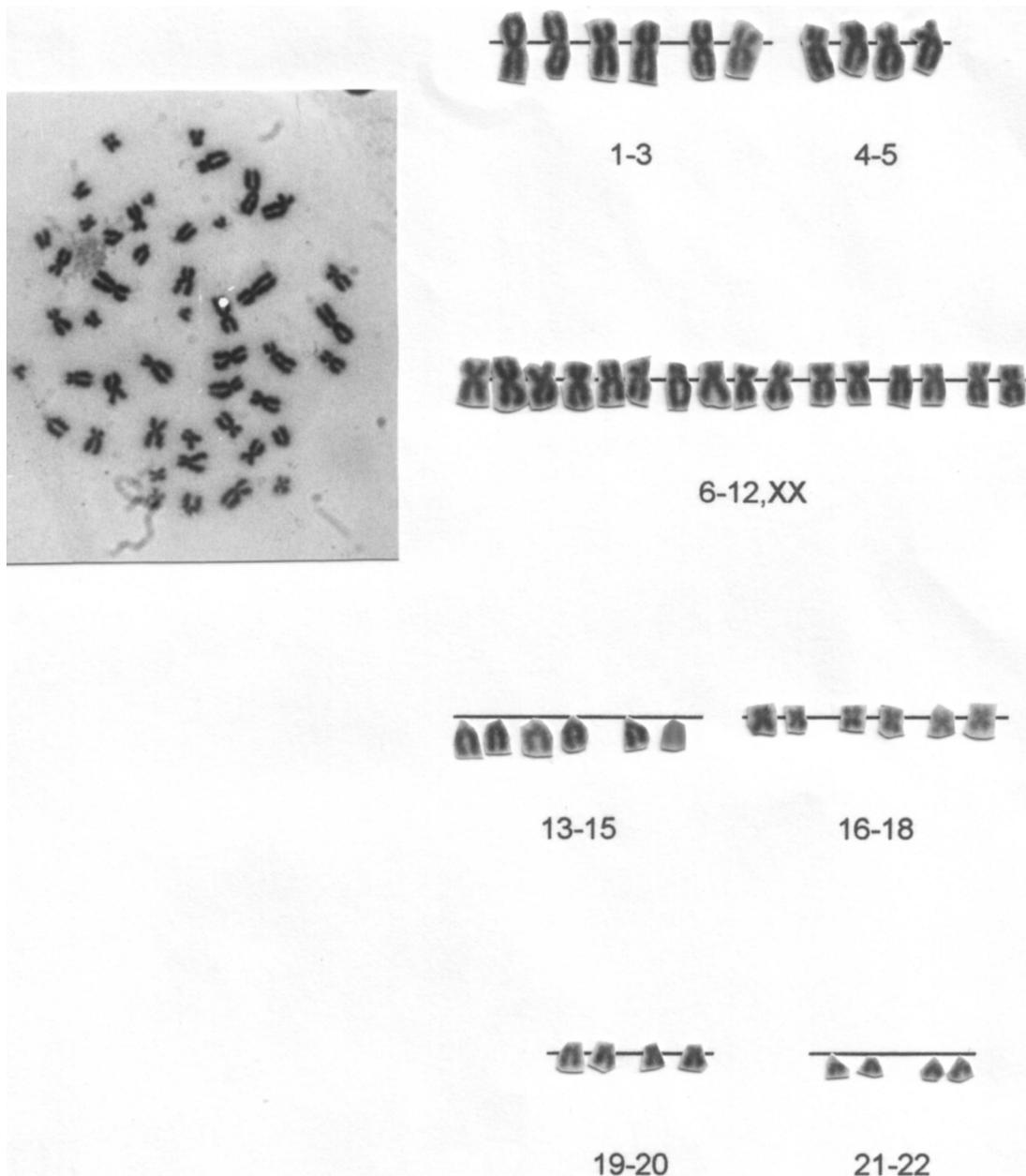


Abbildung 4. Karyotyp einer normalen weiblichen menschlichen Zelle

3.3 Zellkulturmedium

Als Medium wurde RPMI 1640 (GIBCO) mit einem Zusatz von 20%-igem fetalem Kälberserum (Boehringer), Glutamin (Serva), Penicillin/Streptomycin (Seromed) sowie Phytohämagglutinin (Seromed) unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Glasflasche angesetzt.

Das Medium setzt sich aus folgenden Zutaten zusammen:

20 ml RPMI 1640, 10-fach

180 ml Wasser destilliert und autoklaviert

50 ml fetales Kälberserum

3 ml Penicillin (10.000 i.E/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)

2 ml L-Glutamin (150 mg/ml)

5 ml Phytohämagglutinin

8 ml Bicarbonat (7,5%)

Jeweils 5 ml des Mediums wurden in sterile Kulturröhrchen abgefüllt und bis zum Gebrauch bei -18 °C aufbewahrt.

3.4 Weitere Chemikalien

Zur Aufarbeitung und Färbung werden benötigt:

BrdU, Serva (7,5 µg/ml Endkonzentration)

Colcemidlösung, Sigma (0,065 µg/ml Endkonzentration)

KCl, Merck

Methanol, Merck

Essigsäure (100 %), Merck

NaCl, Merck

Na-Citrat, Merck

Bisbenzimid, Hoechst

Giemsa, Merck

Für die Färbung der Objektträger werden folgende Lösungen hergestellt und verwendet:

Stammlösung: 5 mg "Hoechst 33258"-Fluorochrom (Bisbenzimid) in 100 ml KCl/NaCl-Puffer

Gebrauchslösung: 2 ml Stammlösung + 98 ml KCl/NaCl-Puffer

KCl/NaCl Puffer: 2,24 g KCl + 8,77 g NaCl in 1000 ml destilliertem Wasser

SSC 10fach: 87,7 g NaCl + 44,1 g Na-Citrat in 1000 ml destilliertem Wasser

Sörensenpuffer: 2,04 g KH_2PO_4 + 3,27 g Na_2HPO_4 in 500 ml destilliertem Wasser (pH 6,88)

Gepuffertes Wasser: 20 ml Sörensenpuffer + 80 ml destilliertes Wasser

Giemsalösung (7%): 20 ml Sörensen-Puffer (pH 6,88) + 7 ml Giemsa

+ 73 ml destilliertes Wasser

Zum Eindecken die Präparate wurde Entellan verwendet, nach dem die Präparate mit Xylol befeuchtet wurden.

3.5 Protokoll der Untersuchung von Schwesterchromatidaustauschen

Mit Hilfe einer heparinisierten Spritze wurde der Spenderperson venöses Blut entnommen.

Die mit 5 ml Kulturmedium gefüllten Kulturröhrchen wurden mit 15 Tropfen heparinisiertem Vollblut versetzt. Dieser Ansatz wurde ergänzt durch 60 µl BrdU (Endkonzentration 7,5 µg/ml) und eine bestimmte Dosis der Testsubstanzen. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 2 angegeben. Zu jedem Versuch wurde eine Kontrollkultur ohne Zusatz der Testsubstanz mitgeführt (Negativkontrolle).

Grundsätzlich wurden jeweils zwei von einander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

An die Herstellung des Ansatzes schloss sich eine Inkubationszeit von 70 h bei 37° C an. Die Kulturen wurden während der gesamten Zeit mit einer Aluminiumfolie bedeckt und im Dunklen gehalten, da Lichteinfluss die BrdU-substituierte DNA photolysiert und zu zusätzlichen SCEs führen könnte. Außerdem ist der Farbstoff Erythrosin B phototoxisch, und es wurde eine Zunahme von SCEs und Chromosomenaberrationen unter Lichteinwirkung nachgewiesen (Yoshikawa et al. 1978). Die Arbeitsschritte bis zu diesem Zeitpunkt

mussten sehr sorgfältig unter sterilen Bedingungen ablaufen, da sonst Bakterien und Pilze ebenfalls günstige Wachstumsbedingungen gefunden hätten und somit die Versuche wertlos geworden wären.

Tabelle 2. Verwendete Konzentrationen der Testsubstanzen in Mol/l

	Erythrosin	Amaranth	Diamino-azobenzol	Ethylmethan-sulfonat
Kontrolle	-	-	-	-
Konz. 1	10^{-5}	10^{-5}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-5}
Konz. 2	$3,3 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-5}$	10^{-6}	$3,3 \times 10^{-5}$
Konz. 3	10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}
Konz. 4	$3,3 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	10^{-4}	$3,3 \times 10^{-4}$
Konz. 5	10^{-3}	10^{-3}		
Konz. 6		$2,0 \times 10^{-3}$		

Nach Verstreichen von 70 h wurde jedem Röhrchen 500 µl Colcemid (Endkonzentration 0,065 µg/ml) zugemischt. Colcemid ist ein Spindelgift, welches den Zellzyklus in der Metaphase anhält. Die Einwirkzeit betrug 2 h. In dieser Zeit wurden die Kulturen ebenfalls bei 37° C inkubiert.

Nun folgte die Aufarbeitung, die ungefähr vier Stunden in Anspruch nahm. Der Inhalt der Kulturröhrchen wurde in beschriftete Zentrifugenröhrchen umgeschüttet und 10 min lang bei 1000 U/min (200 g) zentrifugiert. Jetzt musste sehr vorsichtig der Überstand mit Hilfe einer Eppendorfpipette abgesaugt werden. Ziel war es, den Bodensatz an

Lymphozyten zu erhalten, den Überstand aber fast vollständig zu entfernen.

Im nächsten Arbeitsgang wurden jedem Röhrchen 8 ml auf 37° C vorgewärmte 0,075 molare KCl-Lösung zugefügt, um eine Hypotonie und dadurch eine bessere Ausbreitung der Metaphasechromosomen zu erreichen. Daran schloss sich eine weitere Phase der Inkubation für 8 min bei 37° C und eine weitere zehnminütige Zentrifugation an. Wieder wurde, wie oben beschrieben, der Überstand entfernt. Nun mussten dem Bodensatz 4 ml frisch angesetztes eisgekühltes Fixativ (Methanol:Eisessig 3:1) zugefügt werden. Bei der Zugabe des Fixativs war besondere Sorgfalt geboten, damit sich keine Verklumpungen bildeten. Hierbei half es, das Röhrchen auf einen Schüttler zu halten und das Fixativ sehr langsam hinzuzufügen. Nun wurde wieder zentrifugiert und abermals abgesaugt. Dieses Mal wurden nur 3 ml Fixativ dazugegeben. Nach erneutem Mischen, Zentrifugieren und Absaugen wurde das Sediment in 2 ml Fixativ aufgenommen.

Jetzt musste die Suspension für mindestens 20 min in den Gefrierschrank gestellt werden. Danach wurden die Röhrchen ein letztes Mal in die Zentrifuge gestellt und der Überstand abgesaugt. Das Sediment wurde nun mit einer geringen Menge frischem Fixativ versetzt und resuspendiert, bis sich eine trübe Suspension ergab. Jeweils einige Tropfen dieser Suspension wurden aus einem Abstand von ca. 20 cm auf einen gut gereinigten und gekühlten Objektträger getropft. Durch kräftiges Blasen über die Oberfläche des Objektträgers ließ sich eine bessere Ausbreitung der Mitosen erreichen. Darauf wurden die Objektträger auf einer Heizplatte bei 45°C getrocknet und staubfrei aufbewahrt.

Die Färbung der Objektträger erfolgte nach 1-2 Tagen. Zunächst wurden die Objektträger für 10 min in eine mit einer Bisbenzimid-Gebrauchslösung gefüllte Küvette gestellt. Da diese Lösung lichtempfindlich ist, wurde die Küvette in Aluminiumfolie eingeschlagen. Darauf mussten die Objektträger unter gepuffertem Wasser kurz

gespült werden.

Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für 20 min unter UV-Licht (UV-A Lampe, 1000W) gelegt, wobei der Abstand zur Lichtquelle ca. 30 cm betrug. Während dieser Zeit lagen die Präparate in einer flachen Schale, mit gepuffertem Wasser gerade bedeckt. Anschließend wurden die Objektträger 30 min lang in 5 x SSC-Lösung bei $60^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Wichtig war, die Lösung gut vorzutemperieren und die Temperatur über die halbe Stunde konstant zu halten. Nach kurzem Abspülen unter Wasser wurden die Präparate im letzten Arbeitsgang in 7% Giemsalösung 5 min gefärbt, mit Aqua dest. abgespült und anschließend getrocknet.

Die Objektträger wurden mit Entellan und Xylol bestrichen und mit Deckgläschen abgedeckt. Die Beurteilung der Präparate erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei einer Endvergrößerung von 1250x. Pro Präparat wurden 30 Metaphasen ausgewertet und die Zahl der SCEs pro Mitose protokolliert. Dabei wurden nur 2. Mitosen mit ihrer Doppelfärbung berücksichtigt. Das Verhältnis von 1.-3. Mitosen wurde für jeden Testsubstanz ermittelt, wobei jeweils 100 Mitosen gesichtet wurden.

3.6 Protokoll der Untersuchung auf Chromosomenaberrationen

Der Versuchsansatz entspricht dem oben beschriebenen Ansatz zu den SCE-Versuchen, lediglich auf die Zugabe von BrdU wurde verzichtet. Auch die unter 3.4 beschriebenen Schritte zur Aufarbeitung gelten für die Versuche zu Aberrationen.

Zur Darstellung der Chromosomen wurden die gut getrockneten Objektträger für 5 Minuten einer 7%igen Giemsalösung ausgesetzt, mit entionisiertem Wasser gespült und getrocknet. Anschließend wurden sie mit Entellan eingedeckt.

Auch bei diesen Versuchen wurden die angefertigten Objektträger unter einem Lichtmikroskop bei 1250-facher Vergrößerung betrachtet. Pro Präparat wurden 100 Mitosen beurteilt. Nur gut ausgebreitete Metaphasen, die aus mindestens 40 Chromosomen bestanden, wurden in die Wertung mit einbezogen. Die Koordinaten, Chromosomenzahl und gegebenenfalls strukturelle Aberrationen wurden protokolliert und zum Teil fotografiert, wobei wir uns an die Klassifizierungsvorschläge von ISHIDATE (1988) hielten.

3.7 Statistik

Als Testverfahren für die statistische Auswertung wurde zum einen der Kruskal-Wallis Test gewählt, zum anderen der Paarvergleichstest nach Wilcoxon. Bei beiden Testverfahren handelt es sich um Hypothesentests, d.h. es wurde eine bestimmte Hypothese überprüft.

Die Hypothese ist eine Vermutung über die unbekannte wahre Verteilung einer Grundgesamtheit. Die Gegenhypothese ist eine Vermutung über eine mögliche Abweichung von der Hypothese. Vor Durchführung des Testes muss das Testniveau festgelegt werden. Das Testniveau bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, sich für die Gegenhypothese zu entscheiden, obwohl die Hypothese richtig ist.

Generell gilt für die Problematik statistischer Hypothesen-Testverfahren, dass bei einem vorgegebenen Stichprobenumfang "n" die

Annahme bzw. Ablehnung einer Hypothese nicht (!) im Umkehrschluss die Ablehnung bzw. Annahme der Gegenhypothese zur Folge hat. Dies bedeutet, dass bei Entscheidungen, die aufgrund von Tests getroffen werden, grundsätzlich auch Fehlentscheidungen möglich sind (AUTORENKOLLEKTIV, o.J., S. 417).

Bei den hier angewandten Testverfahren wurde versucht, durch die Vorgabe eines möglichst geringen "Fehlers 1. Art" ($\alpha = 0,05$) die Wahrscheinlichkeit, sich fälschlicherweise für die Gegenhypothese zu entscheiden, so gering wie möglich zu halten. Daraus folgt jedoch im Umkehrschluss die Tatsache, dass eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit besteht, sich fälschlicherweise für die Hypothese zu entscheiden, obwohl die Gegenhypothese richtig gewesen wäre. Es wurden also "falsch positive" Ergebnisse vermieden mit der Gefahr, zu "falsch negativen" Ergebnissen zu gelangen.

Durch die Vorgabe des Signifikanzniveaus wird lediglich festgelegt, wann eine Stichprobe eine signifikante Abweichung zu dem bei der Hypothese festgelegten erwarteten Ergebnis zeigt. Die "Nicht-Ablehnung" einer Hypothese kann von daher u.a. in vielen Fällen auf nicht ausreichendes Datenmaterial zurückzuführen sein; sie bedeutet nicht automatisch, dass eine Mutagenität der hier untersuchten Substanzen in Zweifel gezogen oder sogar abgelehnt werden kann.

Die beiden zur Anwendung gekommenen Testverfahren zeigten ähnliche, aber nicht identische Ergebnisse.

3.7.1 Kruskal-Wallis Test

In diesem Test sollen Lokalisationsunterschiede zwischen den Verteilungen der Merkmalsausprägungen der Konzentrationen aufgezeigt werden. Die Stichproben müssen unabhängig sein.

Hypothese: Zwischen den Konzentrationen besteht kein Unterschied

bezüglich der Lage der Verteilungen des beobachteten Merkmals.

Gegenhypothese: Die Lage der Verteilungen in den Konzentrationen ist unterschiedlich. Bei einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art von $\alpha = 0,05$ kann die Hypothese nicht abgelehnt werden.

3.7.2 Paarvergleichstest

In diesem Test werden die einzelnen Werte der Testkonzentrationen auf die Kontrollwerte bezogen.

Hypothese: Zwischen den Konzentrationen und den Kontrollen besteht kein Unterschied.

Gegenhypothese: Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und den einzelnen Konzentrationen.

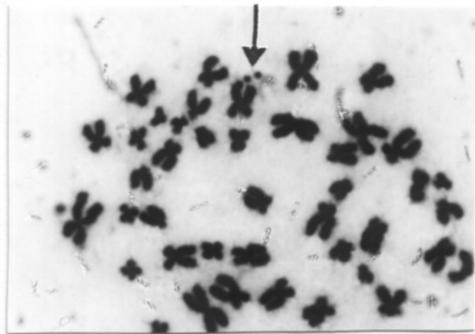
4 Ergebnisse

4.1 Chromosomenaberrationen

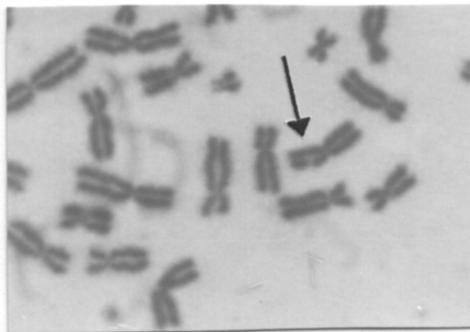
Die Ergebnisse der Versuche zur Feststellung von Aberrationen sind den Tabellen 3-6 zu entnehmen. Zu jedem Versuchsansatz liefen Negativkontrollen mit, die keine Testsubstanz enthielten. Dargestellt werden die Zahl der aberranten Zellen mit Aufgliederung in prozentualen Anteil aberranter Mitosen, Gaps, Chromatidbrüche und Chromosomenbrüche jeweils bezogen auf 100 ausgezählte Mitosen. Da scheinbare Aneuploidien durch bei der Präparation versprengte Chromosomen entstehen können, wurde nicht auf numerische, sondern nur auf strukturelle Aberrationen geachtet. In einem Falle wurde allerdings eine tetraploide Metaphase mit 92 Chromosomen berücksichtigt.

Insgesamt sind sechs **Negativkontrollansätze** mitgelaufen. Die Ergebnisse liegen sehr eng beieinander, entweder ergaben sich auf 100 Mitosen ein oder zwei aberrante Zellen. Im Durchschnitt ließ sich ein Wert von 1,3 errechnen.

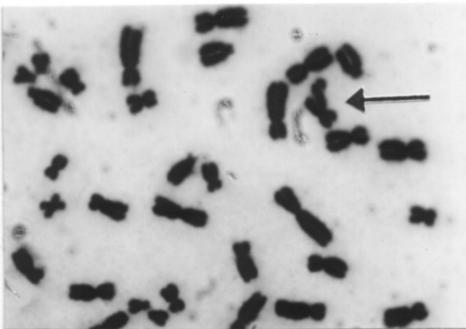
Einige Beispiele der in den mit den Testsubstanzen behandelten Präparaten entdeckten Aberrationen sind in Abbildung 5 dargestellt.



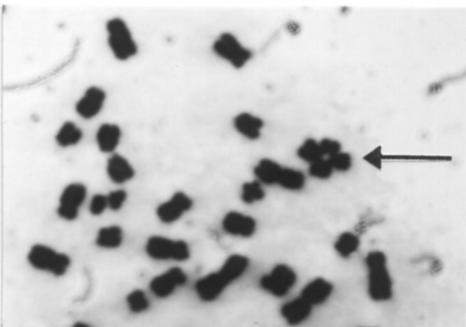
Double Minutes



Chromatidgap



Chromatidbruch



Translokation

Abbildung 5. Beispiele für strukturelle Aberrationen: a) double minutes bei Amaranth, b) Chromatidgap bei Amaranth, c) Chromatidbruch bei Erythrosin B, d) Translokation bei Ethylmethansulfonat

4.1.1 Erythrosin B

Wie Tabelle 3 zeigt, wurden die Erythrosin B-Konzentrationen 10^{-5} bis 2×10^{-3} M getestet. In den Konzentrationen 10^{-5} bis $3,3 \times 10^{-4}$ M waren mehr Aberrationen als in der unbehandelten Kontrolle zu verzeichnen. Ohne Farbstoffzugabe fanden wir 2% aberrante Zellen, unter Farbstoffzugabe zählten wir bis zu 4%. Es wurden hauptsächlich Gaps beobachtet. Nur bei $3,3 \times 10^{-4}$ M wurde ein Chromatidbruch registriert. In den beiden höchsten Konzentrationen 1 und 2×10^{-3} M wurden wieder weniger aberrante Zellen beobachtet.

Tabelle 3. Induktion von Aberrationen durch Erythrosin B. Es wurden jeweils 100 Metaphasen ausgewertet.

Konzentrationen	% aberranter Zellen	Gaps	Chromatidbrüche	Chromosomenbrüche
1. Kontrolle	2	2	-	-
$1,0 \times 10^{-5}$ M	4	4	-	-
$3,3 \times 10^{-5}$ M	4	4	-	-
$1,0 \times 10^{-4}$ M	4	4	-	-
$3,3 \times 10^{-4}$ M	4	3	1	-
2. Kontrolle	1	1	-	-
$1,0 \times 10^{-3}$ M	-	-	-	-
$2,0 \times 10^{-3}$ M	1	1	-	-

4.1.2 Amaranth

Der Einfluss von Amaranth wurde im Konzentrationsbereich von 10^{-5}

bis 2×10^{-3} M untersucht. In den Konzentrationen 10^{-5} bis $3,3 \times 10^{-4}$ M erhöhte sich die Gesamtzahl der aberranten Zellen deutlich im Vergleich zur Kontrolle, wobei auch Chromatid- und Chromosomenbrüche gezählt wurden. In den beiden höheren Konzentrationen war kein deutlicher Anstieg zu sehen. Die einzelnen Werte lassen sich der Tabelle 4 entnehmen.

Tabelle 4. Induktion von Aberrationen durch Amaranth. Es wurden jeweils 100 Metaphasen ausgewertet.

Konzentrationen	% aberranter Zellen	Gaps	Chromatidbrüche	Chromosomenbrüche
1. Kontrolle	2	2	-	-
$1,0 \times 10^{-5}$ M	6	6	-	-
$3,3 \times 10^{-5}$ M	4	4	-	-
$1,0 \times 10^{-4}$ M	8	6	1	1a
$3,3 \times 10^{-4}$ M	7	6	1	-
2. Kontrolle	1	1	-	-
$1,0 \times 10^{-3}$ M	2	2	-	-
$2,0 \times 10^{-3}$ M	2	2	-	-

a) Double minutes

4.1.3 Dimethylaminoazobenzol

Bei dem als Positivkontrolle eingesetzten Farbstoff Buttergelb (Dimethylaminoazobenzol) beschränkten wir uns auf die Konzentrationen $3,3 \times 10^{-7}$ bis 10^{-4} M, da bei höheren Konzentrationen die Ausbeute an auswertbaren Mitosen zu gering war. Es ließ sich mit

steigender Buttergelbkonzentration ein leichter Anstieg an aberranten Zellen sehen, wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist. Die Kontrolle erbrachte 2% veränderte Zellen, bei der Konzentration 10^{-4} M waren 7% der Zellen mit Aberrationen behaftet. Es handelte sich fast ausschließlich um Gaps, allein bei der mit der niedrigsten Buttergelbkonzentration trat ein Chromatidbruch auf.

Tabelle 5. Induktion von Aberrationen durch Dimethylaminoazobenzol. Es wurden jeweils 100 Metaphasen ausgewertet.

Konzentrationen	% aberranter Zellen	Gaps	Chromatidbrüche	Chromosomenbrüche
Kontrolle	2	2	-	-
$3,3 \times 10^{-7}$ M	3	2	1	-
$1,0 \times 10^{-6}$ M	2	2	-	-
$1,0 \times 10^{-5}$ M	4	4	-	-
$1,0 \times 10^{-4}$ M	7	7	-	-

4.1.4 Ethylmethansulfonat

Mit der mutagenen, alkylierenden Verbindung Ethylmethansulfonat haben wir einen Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 10^{-4} M ausgetestet. Es ist ein deutlicher dosisabhängiger Anstieg an Aberrationen auszumachen, wobei man bedenken muss, dass Chromatid- und Chromosomenbrüche schwerwiegendere Veränderungen sind als Gaps (Tabelle 6).

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis Testes kann eine signifikante Veränderung nachgewiesen werden. Die Austestung mit dem Paarvergleichstest zeigt im Konzentrationsbereich von $3,3 \times 10^{-5}$ bis 10^{-4} M einen signifikanten Anstieg bei einem Fehler 1. Art von $\alpha = 0,05$.

Tabelle 6. Induktion von Aberrationen durch Ethylmethansulfonat. Es wurden jeweils 100 Metaphasen ausgewertet.

Konzentrationen	% aberranter Zellen	Gaps	Chromatidbrüche	Chromosomenbrüche
Kontrolle	1a	-	-	-
$1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$	1	1	-	-
$3,3 \times 10^{-5} \text{ M}$	7	4	2b	3c
$1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$	13	6	8d	-

- a) Tetraploidie
- b) 1 Translokation (= 2 Chromatidbrüche)
- c) 1 dizentrisches Chromosom + 3 azentrische Fragmente;
1 Isochromatidbruch
- d) 6 Chromatidbrüche, 1 Translokation (= 2 Chromatidbrüche)

4.2 Schwesterchromatidaustausche

Bei den Versuchen zur Induktion von Schwesterchromatidaustauschen wurden nur zweite Mitosen ausgewertet. Von jeder Konzentration wurden 100 Metaphasen ausgezählt, um das Verhältnis der 1., 2. und 3. Mitosen festzustellen. Diese Untersuchung liefert außerdem einen Eindruck von der Zytotoxizität der Testsubstanzen im Sinne einer Proliferationshemmung. Bei jedem Versuchsansatz wurden Negativkontrollen mitgeführt, die nicht mit den Testsubstanzen exponiert wurden. Die Durchschnittswerte des SCEs dieser Negativkontrollen liegen eng beieinander. Die Befunde bewegen sich zwischen einem Minimum von durchschnittlich 5,07 SCEs und einem Maximum von 5,33 SCEs pro Mitose, die Absolutwerte bewegen sich zwischen 2 und

13 SCEs pro Metaphase.

4.2.1 Erythrosin B

Erythrosin B wurde in einem Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 10^{-3} M getestet. In Tabelle 7 ist der Einfluss des Farbstoffes auf die Häufigkeit der 1. bis 3. Metaphasen dargestellt. Es zeigt sich, dass ab einer Konzentration von 10^{-3} M die Zellen in der 1. Zellteilung zunehmen und diejenigen, die in der 3. Mitose angelangt sind, abnehmen, d.h. dass Erythrosin B ab dieser Konzentration die Zellzyklusdauer verlängert, also die Vermehrung leicht hemmt. Dies konnte durch den Paarvergleichstest abgesichert werden ($\alpha = 0,05$).

Eine graphische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte gibt Abbildung 6. Obwohl eine leichte Zunahme der SCEs mit Dosisanstieg zu verzeichnen ist, ist der Anstieg nicht ausreichend, um im Paarvergleichstest und im Kruskal-Wallis Test beim vorgegebenem Fehler 1. Art von $\alpha = 0,05$ einen signifikanten Unterschied herauszustellen.

Tabelle 7. Einfluss von Erythrosin B auf die Raten von 1., 2. und 3. Mitosen nach der Zugabe von BrdU. Es wurden jeweils 100 Mitosen gemustert.

Konzentration	1. Mitose	2. Mitose	3. Mitose
0	30	31	39
10^{-5}	28	33	39
$3,3 \times 10^{-5}$	33	37	30
10^{-4}	30	35	35
$3,3 \times 10^{-4}$	31	33	36
10^{-3}	39	31	30

Die Ergebnisse zur Induktion von Schwesterchromatidaustauschen sind Abbildung 6 und Tabelle 8 zu entnehmen.

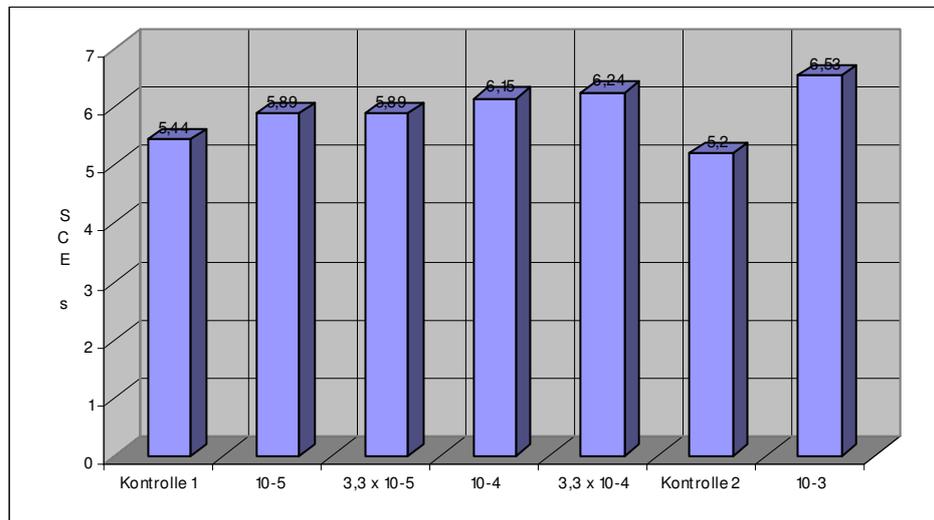


Abbildung 6. Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Erythrosin B.

Tabelle 8. Protokoll der SCE-Auszählung bei Erythrosin B

Mitose	Kontr. 1	10 ⁻⁵ M	3,3 x 10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	3,3 x 10 ⁻⁴ M	Kontr. 2	10 ⁻³ M
1	2	3	4	1	4	3	3
2	3	3	4	3	4	3	4
3	3	4	4	4	5	3	4
4	3	4	4	4	5	3	4
5	4	4	4	5	5	3	4
6	4	4	5	5	5	4	4
7	4	5	5	5	5	4	5
8	4	5	5	5	6	4	5
9	5	5	5	5	6	4	5
10	5	5	5	5	6	5	5
11	5	5	5	5	6	5	5
12	5	5	6	5	6	5	6
13	5	5	6	6	6	5	6
14	5	5	6	6	6	5	6
15	5	6	6	6	6	5	6
16	5	6	6	6	6	5	6
17	6	6	6	6	6	5	6
18	6	6	6	6	6	5	6
19	6	6	6	6	6	5	6
20	6	6	6	6	7	6	7
21	6	6	6	7	7	6	7
22	6	7	6	7	7	6	8
23	6	7	7	7	7	6	8
24	6	7	7	8	7	6	8
25	7	7	7	8	7	6	9
26	7	8	7	8	7	7	9
27	7	8	7	8	7	7	9
28	8	8	7	9	8	8	10
29	8	9	8	9	8	8	12
30	8	10	8	11	8	8	12
Summe	160	175	174	182	185	155	195
Durchschnitt	5,33	5,83	5,8	6,07	6,17	5,16	6,5
Realwert*	5,44	5,89	5,89	6,15	6,24	5,2	6,53

***Realwert** bedeutet, dass die Anzahl der SCEs auf die tatsächlich gezählten Chromosomen pro Metaphase bezogen werden. Der Durchschnitt geht von einer konstanten Anzahl von 46 Chromosomen pro Metaphase aus.

4.2.2 Amaranth

Bei diesem Farbstoff wurde ein Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 2×10^{-3} M getestet (Tabellen 9, 10 und Abb. 7). Die Auszählung der Metaphasen ergab bis zu einer Konzentration von $3,3 \times 10^{-4}$ M keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der 1.-3. Mitosen; ab 10^{-3} M ist eine statisch signifikante Vermehrungshemmung durch Amaranth zu beobachten ($\alpha = 0,05$).

Tabelle 9. Einfluss von Amaranth auf die Raten von 1., 2. und 3. Mitosen nach der Zugabe von BrdU. Es wurden jeweils 100 Mitosen gemustert.

Konzentration	1. Mitose	2. Mitose	3. Mitose
0	43	36	21
10^{-5}	42	38	20
$3,3 \times 10^{-5}$	41	30	29
10^{-4}	39	36	25
$3,3 \times 10^{-4}$	42	35	23
10^{-3}	48	33	19
$2,0 \times 10^{-3}$	48	32	20

Tabelle 10. Protokoll der SCE-Auszählung bei Amaranth

Mitose	Kontr. 1	10 ⁻⁵ M	3,3 x 10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	3,3 x 10 ⁻⁴ M	Kontr. 2	10 ⁻³ M	2 x 10 ⁻³ M
1	2	2	2	3	3	3	5	3
2	2	3	3	3	3	3	5	4
3	2	3	3	4	3	4	5	5
4	3	3	3	4	3	4	5	5
5	3	3	4	4	4	4	5	5
6	4	4	4	4	4	4	5	5
7	4	4	4	5	4	4	6	5
8	4	4	4	5	4	4	6	6
9	4	4	4	5	5	4	6	6
10	4	4	4	5	5	5	6	6
11	4	4	5	5	5	5	6	6
12	5	4	5	5	5	5	6	6
13	5	4	5	5	5	5	6	6
14	5	4	5	5	5	5	6	6
15	5	5	5	5	5	5	6	6
16	5	5	5	5	5	5	6	7
17	5	5	5	5	6	5	7	7
18	5	5	6	6	6	5	7	7
19	5	5	6	6	6	6	7	7
20	5	5	6	6	6	6	7	7
21	6	6	6	6	6	6	7	7
22	6	6	6	6	6	6	7	7
23	6	6	7	6	6	6	7	7
24	6	7	7	6	7	6	8	7
25	6	7	7	6	7	6	8	8
26	6	7	7	7	7	6	8	8
27	6	7	7	7	7	6	9	8
28	7	7	8	7	7	6	9	9
29	9	9	8	7	8	8	10	13
30	13	10	9	10	8	9	10	14
Summe	152	152	160	163	161	156	201	203
Durchschnitt	5,07	5,07	5,33	5,43	5,37	5,2	6,7	6,77
Realwert*	5,08	5,11	5,36	5,51	5,43	5,21	6,72	6,9

***Realwert** bedeutet, dass die Anzahl der SCEs bezogen werden auf die tatsächlich gezählten Chromosomen pro Metaphase. Der Durchschnitt geht von einer konstanten Anzahl von 46 Chromosomen pro Metaphase aus.

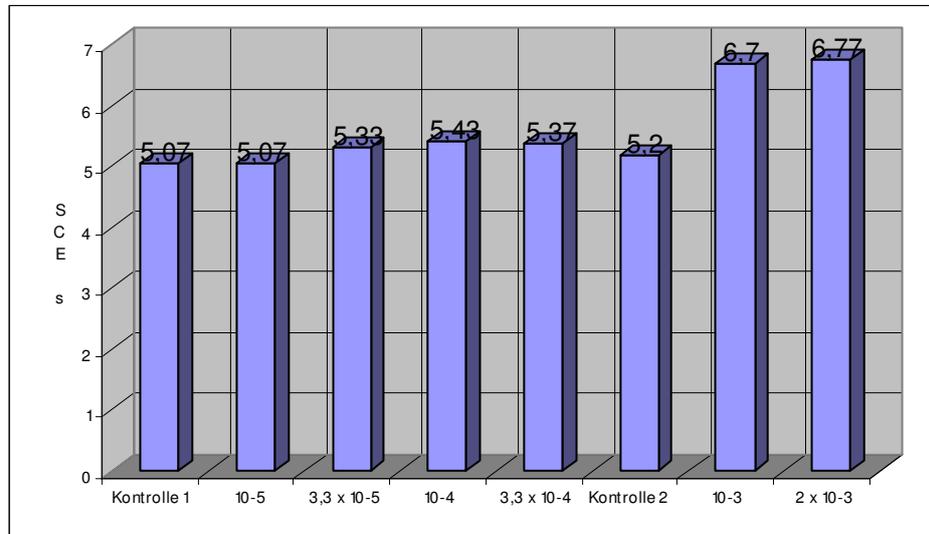


Abbildung 7. Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Amaranth

Tabelle 10 und Abbildung 7 veranschaulichen das Ergebnis der Exposition der Lymphozyten gegenüber Amaranth. Insgesamt lässt sich ein SCE-Anstieg mit steigender Dosis verzeichnen. Die unbehandelten Kontrollen wiesen im Durchschnitt 5,07 bzw. 5,2 SCEs auf, bei 1 und 2×10^{-3} M wurden 6,7 bzw. 6,77 SCEs pro Mitose gezählt. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis Testes kann eine signifikante Veränderung nachgewiesen werden. Die Austestung mit dem Paarvergleichstest zeigt eine Differenzierung zwischen den niedrigeren und höheren Konzentrationen von Amaranth. Der Anstieg ist im Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis $3,3 \times 10^{-4}$ M nicht signifikant, während die Konzentrationen 1 und 2×10^{-3} M dem Test auf Signifikanz bei einem Fehler 1. Art von $\alpha = 0,05$ standhalten.

4.2.3 Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb)

Als Positivkontrolle wurde der kanzerogene, als Lebensmittelzusatz verbotene Azofarbstoff Dimethylaminoazobenzol in den Konzentrationen $3,3 \times 10^{-7}$ bis 10^{-4} getestet. Bei höheren Konzentrationen war die Ausbeute der verwertbaren Mitosen zu gering, als dass wir eine Auswertung hätten vornehmen können. Auch in der Auszählung der Häufigkeit der 1.-3. Metaphasen zeigt sich, dass es bereits ab einer Konzentration von 10^{-5} M zu einer deutlichen Zellzyklusverlangsamung kommt, die sich im Paarvergleichstest bei den 1. und 2. Mitosen statistisch absichern lässt (Tabelle 11).

Eine Auszählung der SCE-Raten bei steigender Konzentration ergibt weder im Kruskal-Wallis Test noch im Paarvergleichstest bei den getesteten Konzentrationen signifikante Veränderungen für das Buttergelb, obwohl eine geringe Erhöhung von 5,07 bei den Kontrollen auf 6,17 SCEs pro Mitose bei 10^{-4} M Dimethylaminoazobenzol festgestellt wurde (Tabelle 12 und Abbildung 8).

Tabelle 11. Einfluss von Dimethylaminoazobenzol auf die Raten von 1., 2. und 3. Mitosen nach der Zugabe von BrdU. Es wurden jeweils 100 Mitosen gemustert.

	1. Mitose	2. Mitose	3. Mitose
Kontrolle	45	34	21
$3,3 \times 10^{-7}$	43	31	26
10^{-6}	44	30	26
10^{-5}	53	26	21
10^{-4}	54	26	20

Tabelle 12. Protokoll der SCE-Auszählung bei Dimethylamino-azobenzol

Mitosen	Kontrolle	$3,3 \times 10^{-7}$ M	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
1	3	3	2	3	3
2	3	3	2	4	3
3	4	3	4	4	3
4	4	3	4	4	3
5	4	4	4	5	3
6	4	4	5	5	4
7	4	4	5	5	4
8	4	4	5	5	4
9	4	4	5	5	5
10	4	4	5	5	5
11	4	4	5	5	5
12	4	4	5	5	5
13	4	4	5	5	5
14	4	5	5	6	5
15	5	5	5	6	5
16	5	5	5	6	5
17	5	5	5	6	6
18	5	5	6	7	6
19	6	6	6	7	6
20	6	6	6	7	6
21	6	6	6	7	7
22	6	6	6	7	7
23	6	6	6	7	7
24	6	6	7	7	8
25	6	6	7	8	9
26	6	6	8	8	9
27	6	7	8	8	11
28	7	8	10	9	11
29	8	8	10	9	12
30	9	10	10	9	13
Summe	152	154	172	184	185
Durchschnitt	5,07	5,13	5,73	6,13	6,17
Realwert*	5,11	5,17	5,9	6,22	6,28

***Realwert** bedeutet, dass die Anzahl der SCEs bezogen werden auf die tatsächlich gezählten Chromosomen pro Metaphase. Der Durchschnitt geht von einer konstanten Anzahl von 46 Chromosomen pro Metaphase aus.

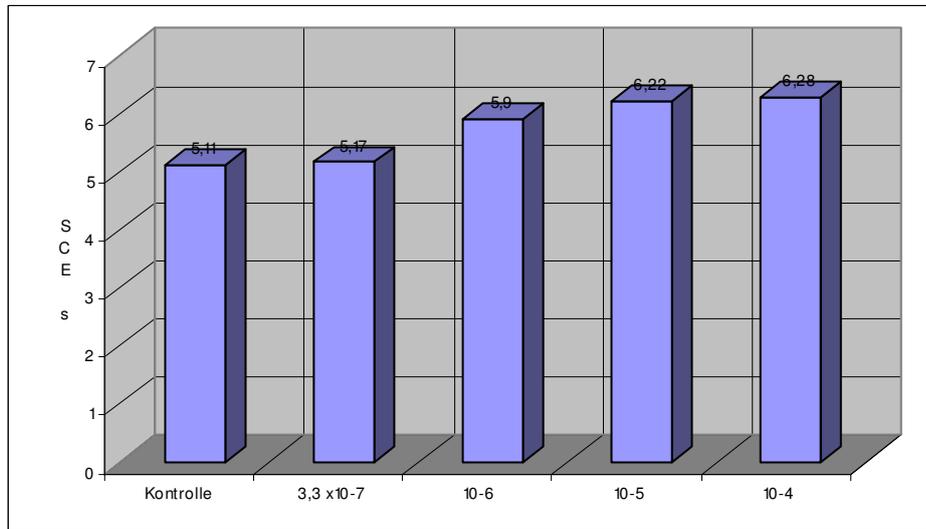


Abbildung 8. Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Dimethylaminoazobenzol

4.2.4 Ethylmethansulfonat

Bei dem der als positive Kontrollsubstanz gewählten Stoff Ethylmethansulfonat ergab die Auszählung der Metaphasen bis zu einer Konzentration von $3,3 \times 10^{-5}$ M keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der 1.-3. Mitosen; ab 10^{-4} M ist eine statistisch signifikante Vermehrungshemmung durch die Verbindung zu beobachten ($\alpha = 0,05$).

Tabelle 13. Einfluss von Ethylmethansulfonat auf die Raten von 1., 2. und 3. Mitosen nach der Zugabe von BrdU. Es wurden jeweils 100 Mitosen gemustert.

	1. Mitose	2. Mitose	3. Mitose
Kontrolle	47	29	24
10^{-5}	46	30	24
$3,3 \times 10^{-5}$	49	30	21
10^{-4}	47	30	22
$3,3 \times 10^{-4}$	52	28	20

In Bezug auf die SCE-Induktion zeigt Ethylmethansulfonat bei den gewählten Konzentrationen von 10^{-5} bis $3,3 \times 10^{-4}$ M einen messbaren, aber laut den statistischen Tests nicht signifikanten Anstieg. Die Ergebnisse sind Tabelle 14 und Abbildung 9 aufgeführt.

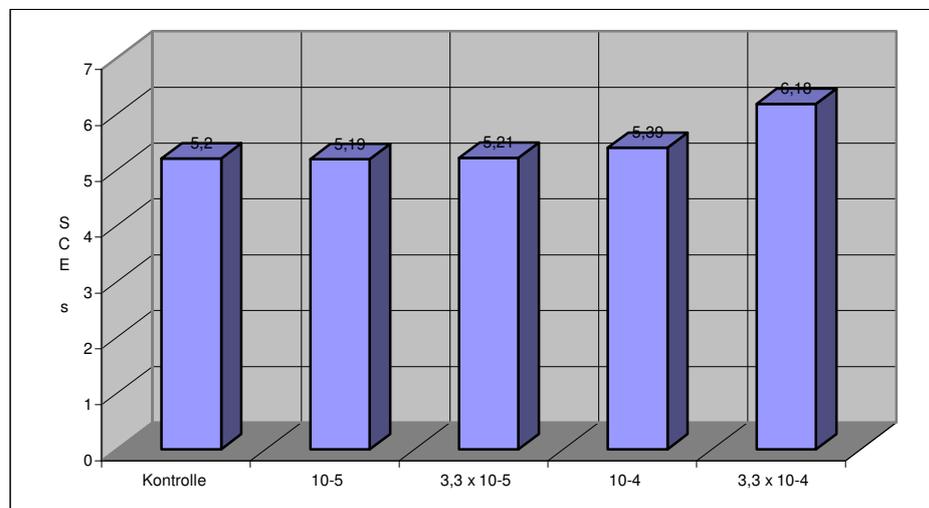


Abbildung 9. Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Ethylmethansulfonat

Tabelle 14. Protokoll der SCE-Auszählung bei Ethylmethansulfonat

Mitosen	Kontrolle	10^{-5} M	$3,3 \times 10^{-5}$ M	10^{-4} M	$3,3 \times 10^{-4}$ M
1	3	2	2	2	3
2	3	3	3	3	4
3	3	3	3	3	4
4	3	4	3	3	4
5	4	4	3	3	4
6	4	4	4	3	5
7	4	4	4	3	5
8	4	4	4	4	5
9	4	4	4	4	5
10	4	4	4	4	5
11	4	5	4	4	5
12	4	5	4	5	5
13	4	5	5	5	5
14	5	5	5	5	5
15	5	5	5	5	6
16	5	5	5	5	6
17	5	5	5	5	6
18	5	6	6	5	6
19	5	6	6	6	6
20	6	6	6	6	6
21	6	6	6	6	6
22	6	6	6	6	6
23	6	6	7	7	7
24	6	6	7	7	7
25	6	6	7	7	7
26	7	6	7	8	7
27	7	7	7	8	9
28	8	7	7	8	10
29	8	8	7	8	12
30	9	8	8	10	12
Summe	153	155	154	158	183
Durchschnitt	5,1	5,17	5,13	5,27	6,1
Realwert*	5,2	5,19	5,21	5,39	6,18

***Realwert** bedeutet, dass die Anzahl der SCEs bezogen werden auf die tatsächlich gezählten Chromosomen pro Metaphase. Der Durchschnitt geht von einer konstanten Anzahl von 46 Chromosomen pro Metaphase aus.

5 Diskussion

Die beiden von uns verwendeten zytogenetischen Tests der Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidenaustausche (SCEs) gehören zu den Standardtests, die zur Prüfung einer genotoxischen Wirkung von Chemikalien eingesetzt werden (ALBERTINI et al. 2000). Chromosomenaberrationen können durch Substanzen entstehen, die mit der DNA reagieren. Zu den Stoffen, die Nukleinsäuren verändern, zählen vor allem alkylierende Verbindungen wie z.B. das von uns als Positivkontrollsubstanz verwendete Ethylmethansulfonat oder die stark kanzerogenen Nitrosoverbindungen. Nukleinsäureantimetaboliten führen zu Replikationsfehlern oder, im Falle des FUdR, zur Hemmung der DNA-Synthese. Substanzen, die Komplexe mit der DNA bilden, sind ebenfalls potente Mutagene. Man unterscheidet Verbindungen, die kovalent gebunden werden, und solche, die durch elektrostatische Bindung in die DNA-Helix interkalieren. Kovalent gebunden werden beispielsweise einige polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen, z.B. das 3,4-Benzpyren nach metabolischer Aktivierung. Zu den DNA-interkalierenden Verbindungen gehören Actinomycin D und Daunomycin. Substanzen, die die DNA-Reparation hemmen, können die chromosomenschädigende Aktivität mutagener Noxen verstärken und als Komutagene wirken (GEBHARD 1977).

Trotz der wenigen Chromosomenaberrationen in unserem Material hätte es sich angeboten, eine genauere Analyse der Bruchstellen durchzuführen. Diese Analyse lässt sich mit Hilfe der G-Bandenfärbung verfeinern, da hierdurch einzelne Chromosomen identifiziert werden können (ISCN 1985). Diese Methodik stand uns zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht zur Verfügung. Außerdem wurde eine derartige Analyse in den bis zu diesem Zeitpunkt

vorliegenden Veröffentlichungen nicht vorgenommen.

Durch Schwesterchromatidaustausche wird das genetische Material normalerweise nicht verändert, da die Rekombination symmetrisch und nur zwischen homologen Basenpaaren erfolgt. Die Reihenfolge der Gene in den Chromosomen bleibt erhalten. Der SCE führt demnach auch nicht zum Untergang einer Zelle. Da jedoch eine Einwirkung auf das genetische Material im Sinne eines Bruch-Reunions-Ereignisses stattgefunden hat, sind Schwesterchromatidaustausche als Indikatoren mutagener Effekte anzusehen (GALLOWAY und WOLFF 1979).

Eine besonders hohe Rate an SCEs ergibt sich bei alkylierenden Substanzen sowie bei Strangbruch erzeugenden Agenzien und Verbindungen, die an die DNA binden können (LATT et al. 1981). UV-Strahlen bewirken eine dosisabhängige Zunahme, während Röntgenstrahlen, die gut Chromosomenaberrationen induzieren, keine SCEs verursachen (GALLOWAY und WOLFF 1979).

Nach Speit (1993) hat der *in vitro*-SCE-Test seine Bedeutung in der Mutagenitätsprüfung als sogenannter Indikator-Test. SCEs stehen in keiner direkten Beziehung zur Entstehung von Genmutationen und Chromosomenaberrationen und sind deshalb kein direktes Maß für Mutagenität. Für einen positiven Ausgang des Tests fordert Speit (1993) mindestens eine Verdopplung des Kontrollwertes und eine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Für Substanzen, die diese Kriterien nicht erfüllen, sollte der Test nicht als informativ angesehen werden.

Zwei zugelassene Lebensmittelfarbstoffe, der Azofarbstoff Amaranth und der Xanthenfarbstoff Erythrosin B, wurden an Humanlymphozyten auf ihre mutagene Wirkung getestet. Zusätzlich wurden als Positivkontrollen der erwiesenermaßen kanzerogene und mutagene Azofarbstoff Diaminoazobenzol (Buttergelb) geprüft sowie das alkylierende Mutagen Ethylmethansulfonat (EMS). Bei jedem Versuch

wurden unbehandelte Lymphozytenkulturen als Negativkontrollen mitgeführt. Auf eine metabolische Aktivierung wurde in allen Fällen verzichtet.

Die Auszählung der 1., 2. und 3. Mitosen zeigt an, ab welchen Konzentrationen die getesteten Stoffe das Wachstum beeinflussen. Eine deutliche Verlängerung des Zellzyklus mit einer signifikant erhöhten Zahl der 1. Mitosen wurde sichtbar in der Konzentration 10^{-3} M bei Erythrosin B, in der Konzentration 2×10^{-3} M bei Amaranth, in der Konzentration $3,3 \times 10^{-4}$ M bei EMS und in der Konzentration 10^{-5} M bei Buttergelb, d.h. das Buttergelb wies die höchste Toxizität auf, die beiden zugelassenen Lebensmittelfarbstoffe die geringste. Um eine genügende Ausbeute an auswertbaren Metaphasen zu erhalten, wurden diese Konzentrationen nicht überschritten. Eine vergleichende Untersuchung des Einflusses verschiedener Farbstoffe auf die von Peritonealzellen des Chinesischen Hamsters durch Moos (1991) zeigte ebenfalls, dass Buttergelb zu einer stärkeren Proliferationshemmung führte als Erythrosin B. Von EMS ist bekannt, dass die Substanz einen G₂-Phaseblock im Zellzyklus induziert (JOHNSON et al. 1999), zu den anderen Verbindungen wurden keine entsprechenden Berichte gefunden.

In unseren Versuchen zur Induktion von Chromosomenaberrationen wurden insgesamt 600 Mitosen aus **Negativkontrollen** mikroskopisch beurteilt. Bezieht man die Gaps mit in die Bewertung ein, so erhielten wir im Durchschnitt 1,3% aberrante Zellen; ohne Gaps lag der entsprechende Wert bei 0,16%; eine tetraploide Zelle wurde entdeckt. Vergleicht man unsere Werte mit denen aus der Literatur, so sind sie relativ niedrig, können aber mit dem niedrigen Alter (26 Jahre) und dem Nichtraucherstatus der Spenderin sowie mit möglicherweise geringfügig unterschiedlichen Beurteilungskriterien bei der Auswertung von Aberrationen erklärt werden.

Am deutlichsten heben sich die Ergebnisse von Aymé und

Mitarbeitern (1976) ab. Bei ihnen ergaben sich ohne Gaps 4,8% aberrante Mitosen. Forni et al. veröffentlichten sowohl 1988 als auch 1990 Ergebnisse zu diesem Thema. In ihren Kontrollgruppen ergaben sich mit Gaps 2,9% und ohne Gaps 1,55% (1988) sowie mit Gaps 3,97% und ohne Gaps 1,7% (1990) Metaphasen mit Aberrationen. Oestreicher et al. (1990) fanden 1,15% strukturelle Aberrationen in ihrem Kontrollkollektiv. Feinäugle (1993) beobachtete bei Auszählung von 1800 Mitosen in 2,5% bzw. 4,33% der Zellen Aberrationen unter Ausschluss bzw. Einbeziehung von Gaps. Zhurkov (1975) sowie Kopjar et al. (2005) ermittelte in ihren Kontrollen 0,3-0,7% bzw. 0,43% Aberrationen ohne Berücksichtigung von Gaps, das kommt unseren Befunden am nächsten.

In unseren Experimenten zur SCE-Induktion lagen die Ergebnisse, die an unbehandelten Lymphozyten erzielt wurden (Auswertung von insgesamt 180 Metaphasen), bei 5,16 SCEs pro Metaphase. Unsere Kontrollwerte liegen im Rahmen verglichen mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten. Eventuelle Unterschiede können von der verwendeten BrdU-Konzentration und der Zusammensetzung der Spendergruppe abhängen (Alter, Exposition, Rauchen usw.).

Wie wichtig die Beachtung des Rauchverhaltens ist, zeigen die Ergebnisse von Oestreicher et al. (1990) und Laurent et al. (1984). Bei der Rauchergruppe ergaben sich 4,5 SCEs, bei den Nichtrauchern nur 4,0 SCEs pro 100 ausgezählte Mitosen (OESTREICHER et al. 1990). Laurent und Mitarbeiter (1984) ermittelten für die Raucher eine SCE-Rate von 8,24% und für die Nichtraucherguppe von 7,52%. In einer Kontrollgruppe, die zu 3/5 aus Rauchern und zu 2/5 aus Nichtrauchern bestand und ein Durchschnittsalter von 39,6 Jahren aufwies, wurden 6,84 SCEs pro Mitose gefunden (HARPS et al. 1990). Etwas höher mit 7,18 SCEs pro Metaphase lag der Kontrollwert bei Ray und Altenburg (1978).

In unserer Versuchsanordnung erbrachte die Untersuchung der

beiden als **Positivkontrollen** eingesetzten Substanzen Ethylmethansulfonat und Buttergelb nicht in jedem Fall Hinweise auf mutagene Potenz.

Ethylmethansulfonat ist ein bekanntes Mutagen und Kanzerogen. Genetische Untersuchungen an Mikroorganismen zeigen, dass EMS sowohl GC—AT- als auch AT—GC-Transitionsmutationen erzeugen kann, möglicherweise auch Insertionen und Deletionen. In Zellen höherer Organismen werden Chromosomenbrüche hervorgerufen. Die gebräuchlichste Hypothese dafür ist, dass DNA-Basen, die durch EMS vor allem in der N7-Position von Guanin ethyliert werden, sich allmählich von der Desoxyribose der DNA-Spirale durch Hydrolyse ablösen und dadurch instabile purin- (oder auch pyrimidin-)freie Stellen entstehen, die zu Einzelstrangbrüchen der DNA führen (Sega 1984). Die Fähigkeit, Chromosomenbrüche bzw. Mikronuklei auszulösen, korreliert mit der Induktion von DNA-Strangbrüchen (WAGNER et al. 2003).

Die von uns verwendeten beiden Mutagenitätstests an EMS haben unterschiedliche Ergebnisse erbracht. Während zahlreiche Chromosomenaberrationen nachgewiesen wurden, wurde ein dosisabhängiger Anstieg von Schwesterchromatidaustauschen beobachtet, der erheblich geringer als bei anderen Arbeiten ausfiel. Ein Erklärungsansatz dafür könnte in der Instabilität der Verbindung zu suchen sein. EMS ist eine stark reaktive alkylierende Substanz. Es ist also nicht auszuschließen, dass ein Teil des EMS schon nach kurzer Zeit die Potenz, Mutationen auszulösen, verloren hat. Da die Zellen in unseren Kulturen nicht synchronisiert waren, ist es möglich, dass nicht alle Zellen die vulnerable Phase des Zellzyklus erreichten, bevor EMS seine mutagenen Fähigkeiten verlor. In einem *in vivo* durchgeführten Test ließ sich zeigen, dass ein 24 Stunden nach Injektion von EMS ermittelter Anstieg an Schwesterchromatidaustauschen nach 7 Tagen vollkommen verschwunden war. Die Werte entsprachen wieder denen vor der Injektion (STETKA und WOLFF 1976a). Auch Nowak et al.

(1990) zeigten an kultivierten Zellen, dass EMS bei kurzer Einwirkzeit die meisten Aberrationen erzeugte.

Unsere Ergebnisse zur klastogenen Potenz von Ethylmethansulfonat stehen im Einklang mit den meisten früheren Befunden. EMS zeigte in unseren Versuchen die Fähigkeit, Chromatid- und Chromosomenbrüche auszulösen. Sie bestätigen eine frühere Untersuchung an Humanlymphozyten in unserem Labor, in der die Substanz bei Konzentrationen bis zu 10^{-3} M vielfältige Aberrationen induzierte, u.a. wurden auch Ringchromosomen und dizentrische Chromosomen registriert (GALAL 1998).

An V79-Zellen des Chinesischen Hamsters wurde die Induktion von Chromosomenaberrationen durch EMS bei Applikation von $5-50 \times 10^{-3}$ M untersucht. Ein auffälliges Resultat ergab sich bei Betrachtung der verschiedenen Einwirkzeiten von 8, 10, 14 und 18 h. Zu allen vier Versuchszeiten war ein konzentrationsabhängiger Anstieg an Aberrationen auszumachen, aber die eindeutig höchsten Werte ergaben sich bei der 14-stündigen Einwirkzeit, bei den 18-Stundenwerten sanken sie wieder ab (NOWAK 1990).

Ein negatives Ergebnis in Bezug auf durch EMS induzierte Aberrationen an Zellen des Chinesischen Hamsters ermittelten Perry und Evans (1975). Bei je 20 ausgezählten M_2 -Mitosen wurden in der Kontrolle ohne EMS drei aberrante Zellen, bei der Konzentration von 3×10^{-4} M EMS vier aberrante Zellen und bei der Konzentration von 3×10^{-3} M drei veränderte Zellen gefunden. Die Zahl der ausgewerteten Mitosen war bei dieser Studie allerdings ungewöhnlich niedrig und die Kontrollwerte relativ hoch. Bei einem Versuch zur Frage der transplazentalen zytogenetischen Aktivität von Ethylmethansulfonat an Mäuseembryonen ergab sich ein Anstieg der Aberrationshäufigkeit in den Embryonalzellen, der in statistischen Tests aber als nicht signifikant eingestuft wurde (BRAUN et al. 1986).

In Humanlymphozyten löste EMS bei maximaler Konzentration

(10^{-3} M) eine Verdreifachung der SCE-Rate in Vergleich zur Kontrolle aus (VIJAYALAXMI und EVANS 1984). Auch Miller (1991) untersuchte die Wirkung von EMS auf Humanlymphozyten, wobei er zwischen B- und T-Lymphozyten differenzierte. In der Negativkontrolle zählte er bei den T-Lymphocyten doppelt so viele SCEs wie bei den B-Lymphocyten. Nach Zugabe von EMS (40 bis 120 $\mu\text{g/ml}$ = 0,4 bis 1×10^{-3} M) war eine dosisabhängige Zunahme an SCEs zu verzeichnen, die Werte lagen aber bei beiden Lymphocytenpopulationen eng beieinander.

In Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO) erzeugte EMS im Dosisbereich von 0,5 bis $2,0 \times 10^{-3}$ M einen linearen Anstieg der Ausbeute von Schwesterchromatidaustauschen (CARRANO et al. 1978). Nach Stetka und Wolff (1976b) bewirkte EMS mit der höchsten Dosis (10^{-3} M) bei der gleichen Zellart eine Vervierfachung des Kontrollwertes. Perry und Evans (1975) teilten Befunde mit, bei denen sich durch EMS in den Konzentrationen 10^{-4} und 10^{-3} M in CHO-Zellen die Anzahl der SCEs verfünffachte. Bei der Lungenzelllinie V79 des Chinesischen Hamsters ergab sich mit der EMS-Konzentration von $1,25 \times 10^{-3}$ M knapp der zweieinhalbfache Wert gegenüber der Kontrolle (ROGERS et al. 1988). Fischer und Kaw (1988) erhielten bei Zugabe von 0,2 bis $0,4 \times 10^{-3}$ M EMS eine Verdopplung bis Vervierfachung der Kontrollwerte bei Peritonealzellen des Chinesischen Hamsters (Linie B14F28).

In einem *in vivo*-Test an männlichen Neuseeland-Kaninchen wurde die Induktion von SCEs nach intraperitonealer Injektion von EMS in den Konzentrationen von 50 und 200 mg/kg geprüft. Den Tieren wurde vor der Injektion, sowie 24 Stunden und 7 Tage nach der EMS-Gabe Blut abgenommen. Bei der zweiten Blutentnahme ergab die Auswertung einen signifikanten Anstieg der SCE-Werte. Nach 7 Tagen sank der Wert wieder auf das Ausgangsniveau ab (STETKA und WOLFF 1976a).

EMS wurde als Positivkontrolle im Mäuselymphomzell-Assay L5178Y

TK^{+/-} benutzt; es ergab sich bei Konzentrationen von 0,25 und 0,4 µl/ml (ca. 10⁻³ M) maximal eine Verzehnfachung der Rate von Genmutationen verglichen mit dem Kontrollwert (LIN und BRUSICK 1986). Bei den menschlichen Lymphoidzelllinien TK6 und WTK1 wurden bei Konzentration von 0-50 µg/ml ebenfalls Genmutationen registriert (BRANDA et al. 2001).

Dimethylaminoazobenzol (DAB), das sogenannte **Buttergelb**, welches früher zum Färben von Lebensmitteln eingesetzt wurde, ist weltweit nicht mehr als Lebensmittelfarbstoff zugelassen. In einer Zusammenstellung von Studien zum genotoxischen Potenzial von Buttergelb waren 12 von 19 Arbeiten positiv (COMBES und HAVELAND-SMITH 1982).

Unsere Untersuchungen ergaben keine signifikante Zunahme von SCEs und nur eine leichte Erhöhung der Gap-Rate.

Unseres Wissens wurde die Induktion von SCEs durch Buttergelb bisher, außer in einer Diplomarbeit in unserem Labor, nicht geprüft. Die Untersuchungen, bei der Peritonealzellen des Chinesischen Hamsters 3 h lang mit bis zu 0,05 mM behandelt wurden, ergaben ohne metabolische Aktivierung nur geringe Erhöhungen der SCE-Rate, während der Zusatz von S9-Mix der Ratte zu einer guten Verdoppelung und von S9-Mix des Goldhamsters zu einer Ver vierfachung der Basiswerte führte (MOOS 1991). In Bezug auf Chromosomenaberrationen durch Buttergelb sind uns keine Veröffentlichungen bekannt.

Aus den dargestellten Befunden kann geschlossen werden, dass Dimethylaminoazobenzol erst nach Metabolisierung seine genotoxische Wirkung entfaltet und dass die Substanz anscheinend durch Lymphozyten nicht oder sehr geringfügig metabolisiert wird. Dies wird auch, wie folgt, durch die Versuche mit prokaryontischen Organismen bestätigt.

Brown et al. (1978) testeten Buttergelb im Ames-Salmonella-Assay aus. Im Standard-Platten-Test ergaben sich für den Dosisbereich 50 bis 1000 µg/Platte mit und ohne metabolische Aktivierung mit S9-Mix an verschiedenen Stämmen keine Mutagenitätszeichen. Im Aerobic-Liquid-Test mit S9-Mix an den Stämmen TA98 und TA100 zeigte sich eine mutagene Potenz. Konzentrationsabhängige Ergebnisse stellte Chung (1983) im Ames-Test fest. Mit metabolischer Aktivierung zeigte sich eine mutagene Wirkung bei niedrigen Konzentrationen, ohne metabolische Aktivierung waren höhere Dosen nötig (1000 µg/Platte), um eine mutagene Potenz herauszustellen.

In einem Fütterungsversuch an 700 Ratten mit Buttergelb-Tagesdosen von 0,1 bis 30 mg/200 g Tier untersuchten Druckrey und Küpfmüller (1948) die Entstehung von Geschwülsten. In den niedrigsten Dosen von 0,1 und 0,3 mg/Tag ergaben sich irreversible Zellveränderungen, doch entwickelte sich bis zum Tod der Tiere kein Krebs. Dagegen zeigte sich bei den höheren Konzentrationen die Bildung von Lebergeschwülsten und zwar umso früher, je höher die täglichen Dosen waren. Dieser Befund ist öfter bestätigt worden (WATABE 1971, MIYAMOTO et al. 1996).

Amaranth darf in Deutschland als Lebensmittelfarbstoff verwendet werden. Es wird häufig eingesetzt und ist daher für die Lebensmittelindustrie sehr wichtig. Amaranth ist allerdings nicht unumstritten. Neben der zu diskutierenden Frage nach einer möglichen Mutagenität wird auch die Frage nach einer kanzerogenen Potenz im Tierversuch unterschiedlich beurteilt.

Unsere Untersuchungen ergaben eine signifikante Induktion von SCEs, die jedoch die von Speit (1993) geforderte Verdopplung des Kontrollwertes nicht erreichten. Dagegen wurden keine gesteigerten Aberrationsraten durch Amaranth festgestellt.

Die Klastogenität von Amaranth wurde wiederholt mit unterschied-

lichen Ergebnissen ausgetestet. Untersuchungen auf Chromosomenaberrationen an Humanlymphozyten und -fibroblasten ergaben bei Auswertung von 300 Zellen bei einer Dosis von 50 µg/ml und einer Einwirkzeit von 24 h keinen signifikanten Anstieg von veränderten Zellen. Der ermittelte Wert an aberranten Zellen lag mit 1,7% unterhalb des mit 2,3% angegebenen Kontrollwertes (TANAKA und KITAHARA 1975). Dagegen ermittelten Zhurkov und Mitarbeiter eine Zunahme von Chromosomenbrüchen. Die getesteten Konzentrationen betragen 1, 10, 100 und 1000 µg/ml, d.h. bis zu ca. $1,65 \times 10^{-3}M$ (ZHURKOV 1975, ZHURKOV und YAKOVENKO 1976).

In Aberrationsversuchen an einer Hamsterfibroblastenzelllinie überprüften Ishidate und Odashima (1977) die Wirkung einer Maximaldosis von 1 mg/ml (ca. $1,65 \times 10^{-3}M$) bei einer Einwirkzeit von 48 h. Fünf Prozent der Zellen wiesen Gaps, Brüche oder Translokationen auf. Daher wurde Amaranth in Bezug auf die Mutagenität von den Forschern als "verdächtig" eingestuft.

Im Mikronukleustest an Knochenmarkszellen von Mäusen stellten Tarjan und Kürti (1982), ohne dass Einzelergebnisse veröffentlicht wurden, keine mutagene Aktivität fest.

Häufig wurde Amaranth im Ames-*Salmonella*-Assay untersucht. Brown et al. (1978) zeigten im Dosisbereich von 50 bis 1000 µg/Platte mit und ohne metabolische Aktivierung durch S9-Mix keine Mutagenität auf. Das gleiche Ergebnis im Ames-Test erbrachten sowohl Versuche von Aulatta et al. (1977) mit Amaranthdosen von 1 bis 10.000 µg/Platte als auch Arbeiten von Garner und Nutman (1977) mit Teststoffdosen von 50 und 100 µg/Platte. Auch Matsushima et al. (1978) und Prival et al. (1988) wandten den Ames-*Salmonella*-Test an, mit und ohne S9-Mix, ergänzt durch eine Präinkubationsmethode zur Begünstigung der Azoreduktion. Es zeigten sich ebenfalls keine mutagenen Aktivitäten.

Im *E. coli* Testsystem mit der Amaranthdosis von 5 mg/ml zeigte sich

eine Erhöhung des Mutantenanteils, die aber im t-Test als nicht signifikant bewertet wurde (LÜCK und RICKERL 1960).

Kornbrust und Barfknecht (1985) prüften, ob chemische Substanzen in Rattenhepatozyten eine außerplanmäßige DNA-Synthese (DNA-Reparatur) bewirken. Amaranth zeigte weder im *in vitro*-Assay im Dosisbereich 10^{-3} bis 10^{-6} M noch im *in vivo/in vitro* HPC/DR-Assay im Dosisbereich 200 mg/kg erhöhte Aktivitäten. Ein großer Vorteil besteht in der fremdstoffmetabolisierenden Ausstattung der Leberzellen (WESTENDORF 1993).

Das Potenzial von Amaranth zu Genkonversion in Hefe wurde von Sankaranarayanan und Murthy (1979) im Stamm *Saccharomyces cerevisiae* BZ34 getestet. Bei der gewählten Dosis von 5 mg/ml ergaben sich keine Aktivitätszeichen.

Untersuchungen an somatischen und Keimzellen von *Drosophila melanogaster*-Larven ergaben bei chronischer Exposition zu verschiedenen Amaranthkonzentrationen keine genotoxischen Effekte (TRIPATHY et al. 1995). Dagegen wurden bei Mäusen, die 10 bzw. 100 mg/kg KG Amaranth im Futter erhielten, 4 bzw. 24 h nach Behandlung mit Hilfe des Comet-Assays DNA-Schäden im gastrointestinalen Trakt (Drüsenmagen und Colon) nachgewiesen (SASAKI et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden von derselben Arbeitsgruppe an Mäusen mitgeteilt (TSUDA et al. 2001).

Versuche zur Prüfung der Kanzerogenität von Amaranth ergaben bei subkutaner Injektion keine Fibrosarkome (NELSON und HAGAN 1953). In einem Fütterungsversuch, bei dem der Farbstoff 4% der Nahrung ausmachte, entwickelte ein Versuchstier ein retroperitoneales Lymphom (DRUCKREY 1955). Eine Studie von Clode et al. (1987) an Ratten, deren Eltern schon 60 Tage vor der Kreuzung eine Amaranthdiät erhalten hatten und die nach der Geburt über zwei Jahre 50-1250 mg/kg Körpergewicht Amaranth im Futter erhielten, ergab keine Anzeichen für eine kanzerogene Wirkung.

Nach Bertram (1989) wurde ein Langzeitversuch an Ratten durchgeführt, die mit einer amaranthhaltigen Paste (2-4 g/kg Futter, Gesamtdosis 245 g/Tier) gefüttert wurden. Nach 25 Monaten entwickelten die Tiere Sarkome im Peritoneum und Intestinum. Ein schwerwiegender Mangel dieser Studie war allerdings, dass der geprüfte Farbstoff nicht ausreichend spezifiziert war und daher die Ergebnisse nicht aussagekräftig waren. Aufgrund des durch diese Versuche aufgetretenen Verdachts auf einen möglichen tumorigenen Einfluss wurde der Farbstoff in den USA aus dem Verkehr gezogen. Es ist möglich, dass Verunreinigungen, wie sie möglicherweise auch im kommerziell verwendeten Farbstoff auftreten können, für die beobachteten Wirkungen verantwortlich waren.

Erythrosin B, ein in Deutschland eingeschränkt erlaubter Lebensmittelfarbstoff, wird in der Fachliteratur mit sehr vielen und sehr widersprüchlichen Versuchsergebnissen in Zusammenhang gebracht.

In unseren Untersuchungen wurde keine statistisch abzusichernde Veränderung der SCE-Rate sowie eine insgesamt leichte Zunahme von Gaps nach Erythrosinbehandlung verzeichnet, die keine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufwies.

Erythrosin B wurde von Tanaka und Kitahara (1975) an Humanlymphozyten auf Klastogenität getestet. Als Ergebnis ergab sich bei der untersuchten Dosis von 50 µg/ml (ca. 5×10^{-5} M) kein Anstieg von Chromosomenaberrationen. Der ermittelte Wert lag mit 1,3% aberranter Zellen bei 300 ausgewerteten Mitosen unterhalb des Kontrollwertes, der mit 2,3% bei 860 gezählten Mitosen angeführt wurde. In einem ähnlichen Versuch an Fibroblasten des Chinesischen Hamsters ließ sich ein leicht positives Ergebnis ermitteln (ISHIDATE et al. 1984). In einer späteren Veröffentlichung wurden von Ishidate (1988) unter denselben Versuchsbedingungen bis zu 28% Aberrationen gezählt, darunter über die Hälfte Brüche und Translokationen vom Chromatidtyp. Eine in unserem Labor durchgeführte Unter-

suchung bei Humanlymphozyten ergab keine Zunahme von Chromosomenaberrationen durch Exposition gegenüber bis zu $3,3 \times 10^{-4}$ M Erythrosin B (FEINÄUGLE 1993).

Die Klastogenität von Erythrosin B wurde auch mit Hilfe des Mikronukleustest *in vivo* untersucht. Vierundzwanzig und 48 h nach intraperitonealer Injektion von 24 mg/kg, 80 mg/kg oder 240 mg/kg Erythrosin B ergab sich kein signifikanter Anstieg von Mikronuklei. Ausgewertet wurden polychromatische Erythrozyten in Knochenmarksausstrichen (LIN und BRUSICK 1986). Ebenfalls ein negatives Ergebnis erbrachte der Mikronukleustest von Tarjan und Kürti (1982). Die Veröffentlichung entbehrt allerdings jeglicher Einzelheiten zum Versuchsaufbau.

Den eben besprochenen Ergebnissen widersprechen die Befunde anderer Arbeitsgruppen. In einem *in vivo*-Test an Schweizer Mäusen fiel nach intraperitonealer Injektion bei Erythrosin B-Dosen von 100 bis 300 mg/kg ein Anstieg von Mikronuklei auf. Der Wert verdreifachte sich im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 100 mg/kg, bei der höchsten Dosis von 300 mg/kg verachtfachte er sich (GODBOLE und VAIDYA 1980). Rogers et al. (1988) stellten bei der Untersuchung von Hamsterzellen *in vitro* fest, dass bei Konzentrationen von 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$ kein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war, jedoch durch 300 $\mu\text{g/ml}$ (ca. $3,4 \times 10^{-4}$) eine Verdreifachung der Anzahl der Mikronuklei im Vergleich zur Kontrolle resultierte.

In der Lungenzelllinie V97 des Chinesischen Hamsters führte Erythrosin im Dosisbereich von 50 bis 300 $\mu\text{g/ml}$ mit und ohne Einsatz von S9-Mix zu keiner signifikanten Steigerung der SCE-Rate (ROGERS et al. 1988). In Peritonealzellen des Chinesischen Hamsters der Linie B14F28 wurde die Induktion von SCEs bei einer Expositionszeit von 3 h (Dosis: 2×10^{-4} bis 5×10^{-4} M) und von 18 h (Dosis: 5×10^{-4} und 10^{-4} M) mit und ohne metabolische Aktivierung untersucht. Es ergaben sich statistisch signifikante Erhöhungen der

SCE-Rate, die mit metabolischer Aktivierung geringfügig höher ausfielen als ohne, aber das von Speit (1993) geforderte Kriterium der Verdoppelung der Kontrollwerte nicht erreichten (FISCHER et al. 1990).

Im Ames-*Salmonella*-Assay entfaltete Erythrosin B in den meisten Fällen weder mit noch ohne metabolische Aktivierung eine mutagene Wirkung (AULETTA et al. 1977, BROWN et al. 1978, ISHIDATE et al. 1984, LAKDAWALLA und NETRAWALI 204/1988, LIN und BRUSICK 1986, TARJAN und KÜRTI 1982). Die Untersuchungen wurden an verschiedenen Stämmen von *Salmonella typhimurium* und mit verschieden hohen Farbstoffkonzentrationen vorgenommen. Auletta und Mitarbeiter (1977) sowie Lin und Brusick (1986) verwendeten Erythrosin B-Konzentrationen von 1 bis 10.000 µg pro Platte. Brown et al. (1978) testeten den Dosisbereich 50 bis 1000 µg und Lakdawalla und Netrawali (1988a) setzten 20, 200 und 2000 µg pro Platte ein. Nur Franekic (1982) stellte im Ames-Test am *Salmonella typhimurium* Stamm TA100 eine mutagene Aktivität von Erythrosin B fest.

Haveland-Smith et al. (1981) untersuchten die Mutagenität von Erythrosin B auf *Salmonella typhimurium* TA1538 und auf *E. coli* WP2 uvrA mit den Farbstoffdosen 0,5 mg/ml bzw. 1,0 mg/ml. Bei diesen Konzentrationen zeigte Erythrosin B kein mutagenes Potenzial. Mit diesem Ergebnis wurden frühere Befunde von Haveland-Smith und Combes (1980a) bestätigt. Auch Lück und Rickerl (1960) und Lück et al. (1963) nahmen Versuche an *E. coli* mit Erythrosin B vor. Im Jahre 1960 ergab sich für Erythrosin B bei einer Dosis von 5 mg/ml eine schwache, statistisch signifikante mutagene Wirkung. 1963 konnte das Ergebnis für die Dosis 10^{-4} M für den Stamm *E. coli* prof1 bestätigt werden. Für die Stämme *E. coli* arg und tryA ergab sich bei gleicher Dosis keine mutagene Aktivität.

An *Bacillus subtilis* untersuchten Lakdawalla und Netrawali (1988b) sowie Yoshikawa und Mitarbeiter (1978) die Auswirkungen von Erythrosin B in Dosierungen von 10, 100 und 1000 µg/ml mit und ohne

S9-Mix und mit und ohne fluoreszierenden Lichteinfluss. Bei dem zur DNA-Exzisionsreparatur fähigen Stamm 168 wurde unter Licht eine im Vergleich zur Kontrolle vierfache Mutationsrate gefunden, die durch Zugabe von S9-Mix zurückging. Beim reparaturdefizienten Stamm hcr-9 (exc-) konnte keine Mutagenität nachgewiesen werden. Yoshikawa et al. (1978) stellten fest, dass eine Abhängigkeit der Mutagenität von Erythrosin B auf *Bacillus subtilis* von Lichteinfluss und pH-Wert des Mediums bestand. Bei Kulturen von *Serratia marcescens* (*Bacterium prodigiosum*) traten dosisabhängig von der Erythrosinzugabe unter sichtbarem Licht Zwergkolonien mit erblichem Charakter auf (KAPLAN 1950). Die positiven Befunde bei den Versuchen unter Lichteinfluss können durch die Phototoxizität des Farbstoffes erklärt werden.

Mit der Frage, ob Erythrosin B in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ein Potenzial zu Genkonversionen aufweist, beschäftigten sich drei Arbeitsgruppen. Sankaranarayanan und Murthy (1979) unternahmen ihre Versuche am Stamm BZ34 mit einer Erythrosin B-Dosis von 5 mg/ml, wobei keine Aktivität auftrat. Bei Matula (1984) sowie Lin und Brusick (1986) verliefen Versuche am Stamm D5 im Dosisbereich von 100 bis 5000 µg/ml ebenfalls ohne Aktivitätszeichen. Dagegen ergaben sich bei den Stämmen D7 und XV185-14C im Dosisbereich von 10 bis 10000 µg/ml sowohl in Bezug auf Genkonversion als auch in Bezug auf Rückmutation deutliche Steigerungen. Im Stamm D7 betrug die maximale Steigerung bei der Genkonversion das 5,4-fache und bei der Rückmutation das 20,4-fache. Im Stamm XV185-14C waren die Anstiege nicht so eindeutig.

Zu dem Ergebnis, dass Erythrosin B keine mutagene Potenz aufweist, gelangten Kornbrust und Barfknecht (1985) sowohl im *in vitro* Hepatozytenprimärkultur/DNA-Reparatur-(HPC/DR)-Assay mit den Dosen 10^{-3} bis 10^{-6} M als auch im *in vivo/in vitro* HPC/DR Assay mit der Dosis 500 mg/kg. Im Mäuselymphomzell-Assay mit der Zelllinie L5178 TK^{+/-} erzeugte Erythrosin B im Dosisbereich von 100 bis 600 µg/ml (ca. 0,1-0,7 mM) keine Genmutationen (LIN und BRUSICK 1986).

Die Kanzerogenität von Erythrosin B wurde an Charles River CD Ratten sowie an Charles River CD-1 Mäusen von Borzelleca et al. (1987) untersucht. In dem Versuch mit den Ratten gab es eine vorgeburtliche Expositionsphase sowie eine bis zu 30-monatige Folgephase des Fütterungsversuches mit einer Futterbeimischung von bis zu 4% Erythrosin B. Bei Tieren, die in der vorgeburtlichen Phase exponiert worden waren, gab es keine Auffälligkeiten. In der sich anschließenden Phase zeigte sich bei den männlichen Tieren aus der 4% Futterbeimischungsgruppe eine signifikante Zunahme von Schilddrüsenvergrößerungen und Schilddrüsenadenomen. Bei den weiblichen Tieren traten es diese Auffälligkeiten nicht auf. In dem Mäuseversuch wurde maximal 3% Erythrosin B dem Futter beigemischt über einen maximalen Zeitraum von 24 Monaten. Es ergaben sich keine statistisch relevanten Auffälligkeiten. Schon 1958 bei Waterman und Lignac fand sich in einem Langzeit-Fütterungsversuch an Mäusen keine kanzerogene Wirkung von Erythrosin B.

Bei einem Langzeit-Fütterungsversuch an Wistar-Ratten mit einem Erythrosin B-Anteil von 4 % (WILHEIM und IVY 1953) zeigten sich keine Tumore. Umeda (1956) testete die Induktion von Fibrosarkomen bei subkutaner Applikation von Erythrosin B; es zeigten sich keine Tumore an den Injektionsstellen. Hiasa et. al. (1988) untersuchten die promovierende Wirkung von Erythrosin B auf durch N-bis(2-hydroxypropyl)-Nitrosamin (DNPH) ausgelöste Schilddrüsentumoren bei männlichen Wistarratten. Die Tiere wurden mit DNPH vorbehandelt, in der 4. Woche wurde einem Teil der Tiere der linke Schilddrüsenlappen entfernt, und von der 2. bis zur 19. Lebenswoche erhielten die Ratten 4% Erythrosin B im Futter. Bei den operierten Tieren zeigte sich im Gegensatz zu den nicht operierten Tieren ein statistisch signifikanter Anstieg von Schilddrüsentumoren. Gutartige Schilddrüsentumore und Schilddrüsenvergrößerungen nach Erythrosin B-Behandlung (4% Futterbeimischung sowohl vorgeburtlich als auch über 30 Monate Lebenszeit) bei männlichen Ratten wurden auch von der Certified Color Manufacturers Association entdeckt (CCMA 1983 und 1984). In

neueren Untersuchungen ging man der Frage nach, wodurch bei Erythrosin B-Langzeitbehandlungen von Nagetieren Schilddrüsentumore ausgelöst werden. Jennings et al. (1990) fanden heraus, dass durch eine Langzeitdiät mit Erythrosin der Schilddrüsen-Regelkreis gestört wird. Die Untersuchungsdaten weisen auf eine chronische Überstimulation der Schilddrüse durch Thyreoidea stimulierendes Hormon (TSH) hin.

Wie oben ausgeführt, werden die meisten Mutagenitätstests zur Feststellung einer potentiellen Kanzerogenität durchgeführt. Abgesehen davon, dass diese Tests keine Auskunft über andere, epigenetische Prozesse geben, die bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen können, treten bei der kritischen Betrachtung sowohl der eigenen Befunde als auch im Vergleich von Ergebnissen anderer Autoren Interpretationsprobleme auf.

Betrachtet man die beiden „Positivkontrollen“, so erzielten wir bei EMS im Chromosomenaberrationstest das erwartete positive Ergebnis, jedoch wurde keine erhöhte SCE-Induktion festgestellt. Dass bei früheren Untersuchungen an Hamsterfibroblasten in unserem Labor mit EMS vermehrte SCEs erzielt wurden, könnten auf Unterschieden zwischen den Spezies Mensch und Chinesischer Hamster bzw. den verschiedenen Gewebetypen beruhen, die zu einer unterschiedlichen Inaktivierung der Substanz führten. Es wurde auch von anderen Autoren gezeigt, dass EMS schnell seine mutagene Potenz verlieren kann. Unterschiedliche Resultate anderer Autoren bei Humanlymphozyten können auf Intraspeziesunterschiede zurückzuführen sein. Auch methodische Faktoren können eine Rolle spielen. Die fehlende Reaktion von Diethylaminoazobenzol in unserem Versuchsansatz lässt sich schlüssig durch die Tatsache erklären, dass die Substanz erst nach Metabolisierung aktiv ist und die Lymphozyten dazu nur beschränkt befähigt sind.

Bei dem Azofarbstoff Amaranth wurden von uns keine signifikanten

Mutagenitätsanzeichen entdeckt: bei mangelnder Induktion von Chromosomenaberrationen gab es auch keine im Sinne der Definition von Speit (1993) beweisenden Resultate in Bezug auf SCE-Verursachung, obwohl die Zahl der SCEs dosisabhängig leicht erhöht war. Die meisten in der Literatur veröffentlichten Untersuchungen ergaben in verschiedenen Testsystemen negative Resultate, aber einige *in vivo*-Untersuchungen erbrachten Hinweise auf Genotoxizität und sogar Kanzerogenität, weshalb der Farbstoff in den USA nicht mehr verwendet wird.

Der Xanthenfarbstoff Erythrosin B lieferte in unseren Untersuchungen durchgängig negative Ergebnisse, was gut zu den meisten Befunden früherer Untersuchungen in verschiedenen Testsystemen passt. Aber auch bei dieser Substanz finden sich in der Literatur Hinweise auf Genotoxizität und Kanzerogenität. Diese Befunde begründen die Entscheidung, Erythrosin B nur noch für einige wenige Produkte zuzulassen, die selten genossen werden und für die es sonst keinen geeigneten säurefesten Farbstoff gibt. Obwohl nur sehr geringe Mengen der Farbstoffe verzehrt werden, hat die Vermeidung gesundheitlicher Risiken Vorrang vor allen anderen Erwägungen.

6 Zusammenfassung

Die Mutagenität der Lebensmittelfarbstoffe Erythrosin B (Xanthenfarbstoff) und Amaranth (Azofarbstoff) wurden an Humanlymphozyten *in vitro* ohne metabolische Aktivierung untersucht. Als Positivkontrollen gelangten der hepatokanzerogene Azofarbstoff Diaminoazobenzol (Buttergelb) und die mutagene, alkylierende Substanz Ethylmethansulfonat zum Einsatz. Zur Prüfung wurden zwei Testverfahren verwendet, die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen und die Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (SCEs).

Die Problematik des Einsatzes von Lebensmittelfarbstoffen wurde unter geschichtlichen, gesetzlichen und gesundheitlichen Aspekten beleuchtet und ein Überblick über die gebräuchlichsten toxikologischen Testverfahren gegeben, unter besonderer Berücksichtigung von Mutagenitätstests.

Beide getesteten Lebensmittelfarbstoffe zeigten einen leichten dosisabhängigen Anstieg der SCEs, der sich bei Amaranth als signifikant erwies, ohne dass eine Verdopplung der bei den unbehandelten Kontrollen ermittelten Werte erreicht wurde, die als beweisend angesehen wird. Bei beiden Farbstoffen konnte keine Zunahme von Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Bei den Zellen, die mit Amaranth behandelt worden waren, fanden sich vor allem Gaps und wenige Brüche, bei Erythrosin B wurden einige Gaps sowie ein einzelner Chromatidbruch in sämtlichen Versuchsgruppen registriert. Die kanzerogene Substanz Buttergelb führte, sehr wahrscheinlich aufgrund der fehlenden metabolischen Aktivierung, zu keinem signifikanten Anstieg an Schwesterchromatidaustauschen oder Aberrationen. Die mutagene Verbindung Ethylmethansulfonat induzierte keine erhöhten SCEs, zeigte aber eine deutliche Klastogenität,

charakterisiert durch das dosisabhängige Auftreten von Chromatid- und Chromosomenbrüchen.

Unsere Ergebnisse, die bei den beiden zugelassenen Farbstoffen keinen eindeutigen Hinweis auf Mutagenität ergaben, wurden mit früheren Arbeiten über die Mutagenität und Kanzerogenität der von uns untersuchten Farbstoffe verglichen. Im Hinblick auf die zum Teil sehr widersprüchlichen in der Literatur beschriebenen Ergebnisse gestaltet sich eine abschließende Beurteilung von Erythrosin B und Amaranth als schwierig. Die neueren Befunde zur Induktion von Schilddrüsentumoren durch hohe Dosen von Erythrosin B bei Ratten erklären sich durch die Wirkung des Farbstoffs auf den Schilddrüsenhormonregelkreis und die Schilddrüsenhormonproduktion. Wegen der entscheidenden Bedeutung für die Gesundheit des Menschen sollten Lebensmittelfarbstoffe nur sehr restriktiv eingesetzt werden. Auch sind weitere Untersuchungen auf Mutagenität und Kanzerogenität der Lebensmittelfarbstoffe unter Berücksichtigung von Dosis, Einwirkzeit, Metabolismus und Kumulation wünschenswert.

7 Literaturverzeichnis

Albertini, R.J., D. Anderson, G.R. Douglas, Hagmar, R., K. Herminki, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E. Shuker, R. Tice, M. Waters and A. Aitio: IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Program on Chemical Safety. Mutation Res. 463 (2000) 111-172

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und D. Watson: Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1995)

Alfi, O.S., G.N. Donnell und A. Derencsenyi: C-banding of human chromosomes produced by D.N. ase. Lancet II (7827) (1973) 505

Ames, B.N., J. McCann und E. Yamasaki: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Res. 31 (1975) 347-364

Anonym: A primer on food additives. FDA Consumer 13 (1988) 13-17

Auletta, A.E., J.M. Kuzava und A.S. Parmar: Lack of mutagenic activity of a series of food dyes for Salmonella typhimurium. Mutation Res. 56 (1977) 203-206

Autorenkollektiv FU Berlin, Uni Bielefeld, TU Hannover: Grundausbildung in Statistik für Wirtschaftswissenschaftler. Osnabrück, (o.J.) 407-448

Aymé, S., J.F. Mattéi, M.G. Mattéi, Y. Aurran und F. Giraud: Nonrandom distribution of chromosome breaks in cultured lymphocytes of normal subjects. Hum. Genet. 31 (1976) 161-175

Bajalica, S., T.H. Bui, J.Koch und K. Brondum-Nielsen: Prenatal investigation of a 45,X/46,X,r(?) karyotype in amniocytes using fluorescense in situ hybridization with an X-centromeric probe. *Prenat. Diagn.* 12 (1992) 61-64

Bertram, B.: Farbstoffe in Lebensmitteln und Arzneimitteln. Wissenschaftliche Verlagsanstalt, Stuttgart (1989)

Borzelleca, J.F., C.C. Capen und J.B. Hallagan: Lifetime toxicity/carcinogenicity study of FD & C Red No.3 (erythrosine) in rats. *Food Chem. Toxicol.* 25 (1987) 723-733

Borzelleca, J.F. und J.B. Hallagan: Lifetime toxicity/carcinogenicity study of FD & C Red No.3 (erythrosine) in mice. *Food Chem. Toxicol.* 25 (1987) 735-737

Branda, R.F., J.P. O'Neill, E.M. Brooks, L.M. Trombley und J.A. Nicklas: The effect of folate deficiency and mutagenic response to ethyl methansulfonate in human lymphoblastoid cell lines that differ in p53 status. *Mutat. Res.* 473 (2001) 51-71

Braun, R., E. Hüttner und J. Schöneich: Transplacental genetic and cytogenetic effects of alkylating agents in the mouse. II. Induction of chromosomal aberrations. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 6 (1986) 69-80

Brown, J.P., G.W. Roehm und R.J. Brown: Mutagenicity testing of certified food colors and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the Salmonella/microsome system. *Mutation Res.* 56 (1978) 249-271

Carrano, A.V., L.H. Tompson, P.A. Lindl und J.L. Minkler: Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271 (1978) 551-553

CCMA (Certified Color Manufacturers Association) California League of Food Processors Association: A consideration of the data relating to the thyroid effects of FD&C Red 3. United States Food and Drug Administration, Washington, D.C., File 76 N-0366 (1983)

CCMA (Certified Color Manufacturers Association) California League of Food Processors Association: Further studies on the thyroid effects of FD&C Red 3. United States Food and Drug Administration, Washington, D.C., File 76N-0366 (1984)

Chen, H., S. Li, J. Liu, B.A. Diwan, J.C. Barrett und M.P. Waalkes: Chronic inorganic arsenic exposure includes hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 25 (2004) 1779-1786

Chung, K.-T.: The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutation Res.* 114 (1983) 269-281

Clode, S.A., J. Hooson, D. Grant und W.H. Butler: Long-term toxicity study of amaranth in rats using animals exposed in utero. *Food Chem. Toxicol.* 25 (1987) 937-946

Combes, R.D. und R.B. Haveland-Smith: A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Res.* 98 (1982) 101-248

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): Farbstoff-Kommission: Mitteilung 9. Franz Steiner Verlag GmbH, Wiesbaden (1960)

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): Farbstoff-Kommission: Mitteilung 11. Franz Steiner Verlag GmbH, Wiesbaden (1962)

Druckrey, H.: Schädliche und unschädliche Farbstoffe für Lebensmittel. *Z. Krebsforsch.* 60 (1955) 344-360

Druckrey, H. und K. Küpfmüller: Quantitative Analyse der Krebsentstehung. Z. Naturforsch. 3b (1948) 254-266

Elmadfa, I., E. Muskat und D. Fritzsche: GU-Kompass, E-Nummern. Gräfe und Unzer, München (1996)

Evans, H.J.: Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. In Kilbey, B.J., M. Legator, W. Nichols und C. Ramels (Hrsg.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2. Auflage, Elsevier, North-Holland, Amsterdam (1984) 406-427

Fahrig, R.: Host-mediated mutagenicity tests - yeast systems. Mutation Res. 31 (1975) 381-394

Fahrig, R.: Das Problem „nicht genotoxischer“ Kanzerogene. In: Fahrig, R. (Hrsg.) Mutationsforschung und genetische Toxikologie. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt (1993a) 199-206

Fahrig, R.: Der Fellfleckentest (spot-Test) mit der Maus. In: Fahrig, R. (Hrsg.) Mutationsforschung und genetische Toxikologie. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt (1993b) 199-206

Falbe, J. und M.Regitz (Hrsg.): Römpf Chemie Lexikon. Lebensmittelchemie. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York (1995)

Feinäugle, D.: Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenaberrationen durch Lebensmittelfarbstoffe in vitro. Diplomarbeit, FB Oecotrophologie, Gießen (1993)

Fischer, A.B. und J.L. Kaw: Induction of sister chromatid exchanges by asbestos fibres in combination with other mutagens studied in Chinese hamster cells in vitro. In: Seemayer, N.H. und W. Hadnagy (Hrsg.) Environmental Hygiene. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1988) 23-26

Fischer, A.B., D. Müller und F. Wellhausen: Induction of sister chromatid exchanges by food dyes. In: Seemayer, N.H. und W. Hadnagy (Hrsg.) Environmental Hygiene II. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1990) 38-41

Forni, A., E. Goggi, E. Ortisi, R. Cecchetti, G. Cortona, G. Sesana und L. Alessio: Cytogenetic findings in styrene workers in relation to exposure. In: Seemayer, N.H. und W. Hadnagy (Hrsg.) Environmental Hygiene. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1988) 159-162

Forni, A., F. Toffoletto, E. Ortisi und L. Alessio: Occupational exposure to cadmium: Cytogenetic findings in relation to exposure levels. In: Seemayer, N.H. und W. Hadnagy (Hrsg.) Environmental Hygiene II. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1990) 161-164

Franekic, J.: Mutagenicity testing of some food dyes in the Salmonella test with metabolic activation in vitro. Prehrambeno-tehnolovskarevija (PTRVB 7) 20 (1982) 11-14

Galal, T.: Induktion von Schwesterchromatidaustauschen und Chromosomenaberrationen durch Lebensmittelfarbstoffe an humanen Lymphozyten in vitro. Inauguraldissertation im Fach Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (1998)

Galloway, S.M. und S. Wolff: The relation between chemically induced sister-chromatid exchanges and chromatid breakage. Mutation Res. 61 (1979) 297-307.

Garner, R.C. und C.A. Nutmann: Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using Salmonella typhimurium TA 1538. Mutation Res. 44 (1977) 9-19

Gebhard, E.: Chemische Mutagenese. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1977)

Godbole, N.N. und V.G. Vaidya: Further evidence of the clastogenic property of erythrosine. *Biovigyanam* 6 (1980) 89-91

Green, M.H.L. und W.J. Muriel: Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res.* 38 (1976) 3-32

Harps, E., U. Turhan, C. Kuhlmann, N. Mayer und E.H. Pfeiffer: Effect of chronic toluene exposure on sister-chromatid exchanges and circulating immune complexes. In: Seemayer, N.H. und W. Hadnagy (Hrsg.) *Environmental Hygiene II*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1990) 157-160

Haveland-Smith, R.B. und R.D. Combes: Screening of food dyes for genotoxic activity. *Food Cosmet. Toxicol.* 18 (1980) 215-221

Haveland-Smith, R.B., R.D. Combes und B.A. Bridges: Studies on the genotoxicity of some fluorescein dyes. *Mutation Res.* 88 (1981) 1-15

Hiasa, Y., M. Ohshima, Y. Kitahori, N. Konishi, T. Shimoyama, Y. Sakaguchi, H. Hashimoto, S. Minami und Y. Kato: The promoting effects of food dyes, erythrosine (Red 3) and rose Bengal B (Red 105), on thyroid tumors in partially thyroidectomized N-bis(2-hydroxypropyl)-nitrosamine-treated rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 79 (1988) 314-319

Heddle, J.A., E. Stuart, und M.F. Salamone: The bone marrow micronucleus test. In: Kilbey, B.J., M. Legator, W. Nichols und C. Ramels (Hrsg.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. 2. Auflage, Elsevier, North-Holland, Amsterdam (1984) 441-457

Hollstein, M., J. McCann, L. Angelosanto und W. Nichols: Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Res.* 65 (1979) 133-226

Ishidate, M., Jr: *Data Book of Chromosomal Aberration Test in Vitro*. Life-Science Information Center, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1988)

Ishidate, M., Jr. und S. Odashima: Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro - a screening for chemical carcinogens. *Mutation Res.* 48 (1977) 337-354

ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel (1985)

Ishidate, M., Jr., T. Sofuni, K. Yoshikawa, M. Hayashi, T. Nohmi, M. Sawada und A. Matsuoka: Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxicol.* 22 (1984) 623-636

Jennings, A.S., S.L. Schwartz, N.J. Balter, D. Gardner und R.J. Witorsch: Effects of oral erythrosine (2,4,5,7-tetraiodofluorescein) on the pituitary-thyroidaxis in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103 (1990) 549-556

Johnson, P.A., P. Clements, K. Hudson und K.W. Caldecott: A mitotic spindle requirement for DNA-damage induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 55 (1999) 2696-2700

Kaplan, R.W.: Mutationsauslösung bei *Bacterium prodigiosum* durch sichtbares Licht nach Vitalfärbung mit Erythrosin. *Arch. Mikrobiol.* 15 (1950) 152-175

Kilbey, B.J., M. Legator, W. Nichols und C. Ramel (Hrsg.): *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984)

Kinosita, R.: Special report. Studies in the carcinogenic chemical substances. *Trans. Soc. Pathol. Jap.* 27 (1937) 665-725

Kirsch-Volders, M., A. Vanhouwaert, M. de Boeck und I. Decordier: Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat. Res.* 504 (2002) 137-148

König, R.: Chemische Zusatzstoffe. B. Zur Färbung von Lebensmitteln verwendete Farbstoffe. In: Acker, L., K.-G. Bergner, W. Diemair, W. Heimann, F. Kiermeier, J. Schormüller und S.W. Souci (Hrsg.) Handbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1965)

Kopjar, N. and V. Garaj-Vrhovac: Assessment of DNA damage in nuclear medicine personnel – comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 208 (2005) 179-191

Korenberg, J.R., T. Yang Feng, R. Schreck und X.N. Chen: Using fluorescence in situ hybridization (FISH) in genome mapping. *Trends Biotechnol.* 10 (1992) 27-32.

Kornbrust, D. und Th. Barfknecht: Testing 24 food, drug, cosmetic, and fabric dyes in the in vivo/in vitro rat hepatocyte primary culture/DNA repair assays. *Environ. Mutagen.* 7 (1985) 101-120

Kuhn, E.M. und E. Therman: Cytogenetics of Bloom's syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 22 (1986) 1-18

Lakdawalla, A.A. und M.S. Netrawali: Mutagenicity, comutagenicity, and antimutagenicity of erythrosine (FD&C red 3), a food dye, in the Ames/Salmonella assay. *Mutation Res.* 204 (1988a) 131-139

Lakdawalla, A.A. und M.S. Netrawali: Erythrosine, a permitted food dye, is mutagenic in the *Bacillus subtilis* multigene sporulation assay. *Mutation Res.* 206 (1988b) 171-176

Latt, S.A.: Sister chromatid exchange indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3162-3166

Latt, S.A., J. Allan, E.S. Bloom, A. Carrano et al.: Sister chromatid exchanges: A report of the GENE-TOX Program. *Mutation Res.* 87 (1981) 17-62

Laurent, Ch., J. Frederic and A.Y. Leonard: Sister chromatid exchange frequency in workers exposed to high levels of ethylene oxide, in a hospital sterilization service. *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.* 54 (1984) 33-43

Lewin, B.: The mystique of epigenetics. *Cell* 93 (1998) 301-303

Lin, G. H. Y. und D.J. Brusick: Mutagenicity studies on FD&C Red No.3. *Mutagenesis* 1 (1986) 253-259

Lück, H. und E. Rickerl: Lebensmittelzusatzstoffe und mutagene Wirkung. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 112 (1960) 157-174

Lück, H., P. Wallnöfer und H. Bach: Lebensmittelzusatzstoffe und mutagene Wirkung (Mitteilung VII). *Path. Microbiol.* 26 (1963) 206-224

Maron, D.M. und B.M. Ames: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* 113 (1983) 173-215

Matsushima, T., B. Teichmann, M. Sawamura und T. Sugimura: Mutagenicity of azo-compounds - Improved method for detecting their mutagenicities by the Salmonella mutation test. *Mutation Res.* 54 (1978) 220-221

Matula, T.I. und R.H. Downie: Genetic toxicity of erythrosine in yeast. *Mutation Res.* 138 (1984) 153-156

McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki und B.N. Ames: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test; assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72 (1975) 5135-5139

Miyamoto, K., D. Wakabashi, T. Minamino, M. Nomura, S. Wakusawa und S. Nakamura: Characterization of naturally acquired multiple-drug resistance of Yoshida rat ascites hepatoma AH66 cell line. *Anticancer Res.* 16 (1996) 1235-1240

Miller, K.: Sister-chromatid exchange in human B- and T-lymphocytes exposed to bleomycin, cyclophosphamide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Res.* 247 (1991) 175-182

Mittelman, F.: Patterns of chromosome variation in neoplasia. In: Obe, G und A.T. Natarajan: *Chromosomal Aberrations*. Springer-Verlag (1990) pp. 86-100

Moos, U.: Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Lebensmittelfarbstoffe an Zellen des Chinesischen Hamsters - Einfluss einer Metabolisierung durch Ratten- und Hamster-S9-Fraktion, Diplomarbeit, Giessen (1991)

Müller, D. Untersuchung der toxischen und mutagenen Wirkung von Lebensmittelfarbstoffen an Säugerzellen in vitro. Diplomarbeit, FB Oecotrophologie, Gießen (1988)

National Archives and Records Administration (Hrsg.): *Code of Federal Regulations. Food and Drugs. Band 21, Washington DC (4/1991)*

Nelson, A.A. und E.C. Hagan: Production of fibrosarcomas in rats at site of subcutaneous injection of various food dyes. *Fed. Proc.* 12 (1953) 397-398

Nowak, C.: The use of multiple sampling times in in vitro chromosome assays. *Mutation Res.* 230 (1990) 255-261

Oestreicher, U., G. Stephan und M. Glatzel: Chromosome analyses of persons handling cytostatic drugs with and without safety cover. In: Seemayer, N.H. und W. Hadnagy (Hrsg.) *Environmental Hygiene II*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1990) 165-168

Perry, P. und H.J. Evans: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258 (1975) 121-125

Perry, P. und E.J. Thomson: The methodology of sister chromatid exchanges. In: Kilbey, B.J., M. Legator, W. Nichols und C. Ramels (Hrsg.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2.Auflage, Elsevier, North-Holland, Amsterdam (1984) 495-529

Perry, P. und S. Wolff: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251 (1974) 156-158

Plummer, S.M., A.E. Pheasant, R. Johnson, S.P. Faux, J.K. Chinman und M.A. Hulten: Evaluation of the relative sensitivity of chromosome painting (FISH) as an indicator of radiation-induced damage in human lymphocytes. *Hereditas* 121 (1994) 139-145

Prival, M.J., V.M. Davis, M.D. Peiperl und S.J. Bell: Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 206 (1988) 247-259

Prosser, J.S.: Identification of dicentric chromosomes in irradiated lymphocytes by C-banding. *Mutation Res.* 27 (1975) 131-133

Pschyrembel, W.: *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin, New York (1998)

Ray, J.H. und L.C. Altenburg: Sister-chromatid exchange induction by sodium selenite: Dependence on the presence of red blood cells or red blood cell lysate. *Mutation Res.* 54 (1978) 343-354

Rogers, C.G., B.G. Boyes, T.I. Matula, C. Héroux-Metcalf und D.B. Clayson: A case report: A multiple end-point approach to evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of erythrosine (FD&C red No.3) in a V79 hepatocyte-mediated mutation assay. *Mutation Res.* 205 (1988) 415-423

Rosenkranz, H.S. und L.A. Poirier: Evaluation of the mutagenicity and DNA-modifying activity of carcinogens and non-carcinogens in microbial systems. *J. Natl. Cancer Inst.* 62 (1979) 873-892

Sankaranarayanan, N. und M.S.S. Murthy: Testing of some permitted food colours for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mutation Res.* 67 (1979) 309-314

Sasaki, Y., S. Kawaguchi, A. Kamaya, M. Ohshita, K. Kabasawa, K. Iwama, K. Taniguchi und S. Tsuda: The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Res.* 519 (2002) 103-119

Schmid, W.: The micronucleus test. *Mutation Res.* 31 (1975) 9-15

Sega, G.A.: A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Res.* 134 (1984) 113-142

Speit, G.: Der Schwesterchromatidenaustausch als Indikator für genotoxische Effekte. In: Fahrigh, R. (Hrsg.) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie.* Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt (1993) 199-206

Stegemann, W.: *Aktuelle Begriffe Biowissenschaften.* Orbis Verlag GmbH, München (1981)

Stetka, D.G. und S. Wolff: Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. I. In vivo test for compounds requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 41 (1976a) 333-342

Stetka, D.G. und S. Wolff: Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 41 (1976b) 343-350

Strachan, T. und A.P.Reed: *Molekulare Humangenetik.* Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)

Tanaka, N. und K. Kitahara: Cytogenetic effect of food dyes on cultured human cells. *Jap. J. Hyg.* 30 (1975) 574-578

Tarjan, V. und M. Kürti: Mutagenicity testing of several food colourants certified for use in Hungary. *Mutation Res.* 97 (1982) 228

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

Trask, B.J.: Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet.* 7 (1991) 149-154

Trosko, J.E. und B.L. Upham: The emperor wears no clothes in the field of carcinogen risk assessment: ignored concepts in cancer risk assessment. *Mutagenesis* 20 (2005) 81-92

Tripathy, N.K., M.J. Nabi, G.P. Sahu und A.A. Kumar: Genotoxicity testing of two red dyes in the somatic and germ line cells of *Drosophila*. *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 923-927

Tsuda, S., M. Murakami, N. Matsusaka, K. Kano, K. Taniguchi und Y.F. Sasaki: DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicol. Sci.* 61 (2001) 92-99

Turner, N.T., A.G. Batson und D. Clive: Procedures for the Kilbey, B.J., M. Legator, W. Nichols und C. Ramels (Hrsg.) Handbook of L5178Y/TK^{+/-}/TK^{-/-} -mouse lymphoma cell mutagenicity assay. In: *Mutagenicity Test Procedures*. 2. Auflage, Elsevier, North-Holland, Amsterdam (1984) 239-268

Umeda, M.: Experimental studies of xanthene dyes as carcinogenic agents. *Jpn. J. Cancer Res.* 47 (1956) 51-78

Verma, R.S. und A. Babu: Human Chromosomes. Manual of Basic Technique. Pergamon Press (1989)

Vijayalaxmi und H.J. Evans: Induction of 6-thioguanine-resistant mutants and SCEs by 3 chemical mutagens (EMS, ENU and MMC) in cultured human blood lymphocytes. *Mutation Res.* 129 (1984) 283-289

Wagner, E.D., D. Anderson, A. Dhawan, A.L. Rayburn und M.J. Plewa: Evaluation of EMS-induced DNA damage in the single cell gel electrophoresis (Comet) assay and with flow cytometric analysis of micronuclei. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen. Suppl.* 2 (2003) 1-11

Watabe, H.: Early appearance of embryonic-globulin in rat serum during carcinogenesis with 4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 31 (1971) 1192-1194

Waterman, N. und G.O.E. Lignac: The influence of the feeding of a number of food colours on the occurrence of tumors in mice. *Acta physiol. pharmacol. Nederlandica* 7 (1958) 35-55

Wellhausen, F.: Induktion von Schwesterchromatidaustauschen an Säugerzellen *in vitro* durch Lebensmittelfarbstoffe. Diplomarbeit, FB Oecotrophologie, Gießen (1989)

Westendorf, J.: Außerplanmäßige DNA-Synthese. In: Fahrig, R. (Hrsg.) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt (1993) 199-206

Wilhelm, R. und A.C. Ivy: A preliminary study concerning the possibility of dietary carcinogenesis. *Gastroenterology* 23 (1953) 1-19

Witorsch: Effects of oral erythrosine (2,4,5,7-tetraiodofluorescein) on the pituitary-thyroid axis in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103 (1990) 549-556

Yoshikawa, K., H. Kurata, S. Iwahara und T. Kada: Photodynamic action of fluorescein dyes in DNA - damage and *in vitro* inactivation of transforming DNA in bacteria. *Mutation Res.* 56 (1978) 359-362

Zhurkov, V.S.: Investigation of the mutagenic activity of drug preparations and food additives in a culture of human lymphocytes. Soviet Genetics 11 (1975) 528-530

Zhurkov, V.S. und K.N. Yakovenko: The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity of chemicals. Mutation Res. 41 (1976) 107-112

8 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1.	BrdU-Inkorporation und Entstehung von Schwesterchromatidaustauschen	21
Abbildung 2.	Beispiele für Chromosomen mit und ohne Schwesterchromatidaustausche	22
Abbildung 3.	Darstellung der Mitoseausbeute in Humanlymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit Phytohämagglutinin	23
Abbildung 4.	Karyotyp einer normalen weiblichen menschlichen Zelle	30
Abbildung 5.	Beispiele für strukturelle Aberrationen	41
Abbildung 6.	Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Erythrosin B	47
Abbildung 7.	Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Amaranth	51
Abbildung 8.	Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Dimethylaminoazobenzol (DAB)	54
Abbildung 9.	Induktion von Schwesterchromatidaustauschen durch Ethylmethansulfonat (EMS)	55

9 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1.	Tägliche Aufnahme von Lebensmittelfarbstoffen	3
Tabelle 2.	Verwendete Konzentrationen der Testsubstanzen in Mol/l	34
Tabelle 3.	Induktion von Aberrationen durch Erythrosin B	42
Tabelle 4.	Induktion von Aberrationen durch Amaranth	43
Tabelle 5.	Induktion von Aberrationen durch Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb)	44
Tabelle 6.	Induktion von Aberrationen durch Ethylmethansulfonat (EMS)	45
Tabelle 7.	Einfluss von Erythrosin B auf die Raten von 1., 2. und 3. Mitosen nach der Zugabe von BrdU	46
Tabelle 8.	Protokoll der SCE-Auszählung bei Erythrosin B	48
Tabelle 9.	Einfluss von Amaranth auf die Raten von 1., 2. und 3. Mitosen nach der Zugabe von BrdU	49
Tabelle 10.	Protokoll der SCE-Auszählung bei Amaranth	50

Tabelle 11.	Einfluss von Dimethylaminoazobenzol auf die Raten von 1., 2. und 3. Mitosen nach der Zugabe von BrdU	52
Tabelle 12.	Protokoll der SCE-Auszählung bei Dimethylaminoazobenzol	53
Tabelle 13.	Einfluss von Ethylmethansulfonat auf die Raten von 1., 2. und 3. Mitosen nach der Zugabe von BrdU	55
Tabelle 14.	Protokoll der SCE-Auszählung bei Ethylmethansulfonat	56

Erklärung

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Professor Dr. med E. G. Beck

für die Unterstützung dieser Arbeit und die Bereitstellung der
Institutseinrichtungen.

Frau Professor Dr. rer. nat. A. B. Fischer

für die Überlassung des Themas, für viele hilfreiche Anregungen
und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. R.-H. Bödeker

für die statistische Auswertung.

Frau I. Seewald

für die Entwicklung der Fotos.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, meinem
Ehemann, meinem Bruder Detlef Scholz und Dr. Tanja Galal, die
mich bei der Realisation dieser Arbeit in verschiedenster Hinsicht
unterstützt und motiviert haben.

Lebenslauf

Geboren am: 8.2.1966 in Göttingen

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schule:

1972-1986 Grundschole, Gymnasium Großburgwedel;
Abschluss: Abitur

1982-1983 Clovis High School, California/USA; Abschluss:
Diploma

Studium:

1986-1992 Humanmedizin in Göttingen, Giessen und
Frankfurt/M, Praktisches Jahr an den
Städtischen Kliniken Darmstadt

20.10.1992 III. Staatsexamen

Arzt im Praktikum:

3/93-9/94 ÄIP in Praxis Dr. Hartmuth/Dr. Heil in Rossdorf,
Kinderheilkunde, und in Praxis Dr. Enger in Bie-
besheim, Allgemeinmedizin mit Schwerpunkt
Angiologie

Assistenz:

9/94-3/95 Weiterbildungsassistentz in der Praxis Dr. Enger

3/95-9/95 Assistenzärztin im Theresienkrankenhaus
Mannheim, Gefäßchirurgie, PD Dr. Hoffmeister

1/96-11/98 Assistenzärztin in der Praxis Dr. Enger in
Biebesheim, Weiterbildung Phlebologie

Berufsbezeichnung:

1.1 2.1995 Praktische Ärztin

6/1998 A-Diplom Akupunktur der Dt. Ges. f.
Akupunktur

Zusammenfassung

Die Mutagenität der Lebensmittelfarbstoffe Erythrosin B (Xanthenfarbstoff) und Amaranth (Azofarbstoff) wurden an Humanlymphozyten *in vitro* ohne metabolische Aktivierung untersucht. Als Positivkontrollen gelangten der kanzerogene Azofarbstoff Diaminoazobenzol (Buttergelb) und die mutagene und kanzerogene alkylierende Substanz Ethylmethansulfonat zum Einsatz. Zur Prüfung wurden zwei Testverfahren verwendet, die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen und die Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (SCEs).

Beide getesteten Lebensmittelfarbstoffe zeigten einen leichten dosisabhängigen Anstieg der SCEs, der sich bei Amaranth als signifikant erwies, ohne dass eine Verdopplung der bei den unbehandelten Kontrollen ermittelten Werte erreicht wurde, die als beweisend angesehen wird. Bei beiden Farbstoffen konnte keine Zunahme von Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Bei den Zellen, die mit Amaranth behandelt worden waren, fanden sich vor allem Gaps und wenige Brüche, bei Erythrosin B wurden einige Gaps sowie ein einzelner Chromatidbruch in sämtlichen Versuchsgruppen registriert. Die kanzerogene Substanz Buttergelb führte, sehr wahrscheinlich aufgrund der fehlenden metabolischen Aktivierung, zu keinem signifikanten Anstieg an Schwesterchromatidaustauschen oder Aberrationen. Die mutagene Verbindung Ethylmethansulfonat induzierte keine erhöhten SCEs, zeigte aber eine deutliche Klastogenität, charakterisiert durch das dosisabhängige Auftreten von Chromatid- und Chromosomenbrüchen.

Unsere Ergebnisse, die bei beiden zugelassenen Farbstoffen keinen eindeutigen Hinweis auf Mutagenität ergaben, wurden mit früheren Arbeiten über die Mutagenität und Kanzerogenität dieser Farbstoffe verglichen.

Summary

The mutagenicity of the food dyes erythrosine B (xanthene dye) and amaranth (azo dye) was determined in human lymphocytes *in vitro* without metabolic activation. The carcinogenic azo dye diaminoazobenzene (butter yellow) and the mutagenic and carcinogenic alkylating compound ethylmethane sulfonate served as positive control substances. Two different test procedures were employed: the induction of structural chromosome aberrations and the induction of sister chromatid exchanges (SCEs).

Both tested food dyes showed a slight dose-dependent increase of SCEs. This increase was significant for amaranth, although the doubling of SCE rates compared to the negative controls, which is considered as proof of mutagenicity, was not reached. For both dyes no significant increases in chromosome aberrations could be detected. There were mostly gaps and a few breaks noted in the cells treated with amaranth, whereas few gaps and one chromatid break was found in all experimental groups treated with erythrosine B. There was no increase in the rates of sister chromatid exchanges or chromosome aberrations following the application of the carcinogen diaminoazobenzene, probably due to lacking metabolic activation. The mutagenic compound ethylmethane sulfonate showed no enhanced SCE rates, but proved clearly clastogenic with dose-dependent chromosome and chromatid breaks.

Our results with the two certified dyes, which gave no clear indication of mutagenicity, were compared with findings obtained in earlier studies of the mutagenicity and carcinogenicity of these dyes.