

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

Untersuchung der zonalen Zellproliferation mittels BrdU in der Leber der
B6C3F1 und C57BL Maus nach Verabreichung von drei nicht-genotoxischen
Karzinogenen

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

Eingereicht von
SILKE BURKHARDT

Gießen 2001

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

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

Untersuchung der zonalen Zellproliferation mittels BrdU in der Leber der
B6C3F1 und C57BL Maus nach Verabreichung von drei nicht-genotoxischen
Karzinogenen

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

Eingereicht von
SILKE BURKHARDT
Tierärztin aus Karlsruhe (Baden-Württemberg)

Gießen 2001

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tage der mündlichen Prüfung: 13.06.2001 und 18.06.2001

Meinen Eltern und meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Zellproliferation und chemische Karzinogenese	2
2.1.1	Genotoxische Karzinogene	3
2.1.2	Nicht-genotoxische Karzinogene	3
2.1.3	Zellproliferation und nicht-genotoxische Karzinogene	5
2.1.4	Apoptose und nicht-genotoxische Karzinogene	6
2.2	Chemische Karzinogenese in der Leber	7
2.2.1	Die Leber	7
2.2.2	Tumorentstehung in der Leber	8
2.2.3	Mechanismen nicht-genotoxischer Hepatokarzinogene	9
2.3	Unterschiede in der Tumorraten zwischen der B6C3F1 und C57BL Maus	10
2.3.1	Methylierungsstatus der DNA	11
2.4	Messung der Zellproliferation	11
2.4.1	Der Zellzyklus	11
2.4.2	Methoden zur Messung der Zellproliferation	12
2.4.3	Endogene Marker	12
2.4.4	Exogene Marker	12
2.5	Zellproliferation in der Leber	15
2.5.1	Konzept der „streaming liver“	15
2.5.2	Zonale Unterschiede in der Zellproliferation	16
2.5.3	Auswertungsstrategien in der Leber	16
2.5.3.1	Gesamt-Labelingindex	16
2.5.3.2	Zonale Auswertung	17
2.5.4	Kontrollwerte der Zellproliferation in der Mäuseleber	17
2.5.4.1	B6C3F1 Maus	17
2.5.4.2	C57BL Maus	18
2.5.5	Bewertung von Labelingindizes	19
2.5.5.1	Zellzahl und Gruppengröße	19
2.5.5.2	Alter der Tiere	19

2.5.5.3	Angaben zur Labelingindex-Steigerung	19
2.6	Prüfsubstanzen	20
2.6.1	Phenobarbital	20
2.6.1.1	Phenobarbital und Zellproliferation	21
2.6.1.2	Phenobarbital und Apoptose	22
2.6.2	Chloroform	22
2.6.2.1	Chloroform und Zellproliferation	24
2.6.2.2	Chloroform und Apoptose	25
2.6.3	Wyeth 14,643	26
2.6.3.1	Wyeth 14,643 und Zellproliferation	28
2.6.3.2	Wyeth 14,643 und Apoptose	29
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Tiere	30
3.1.2	Haltungsbedingungen	30
3.1.3	Randomisierung	30
3.2	Versuchsdurchführung	30
3.2.1	Dosisgruppen	30
3.3	Histopathologische Aufarbeitung	32
3.3.1	Sektion	32
3.3.2	Fixierung und Trimmen der Organe	32
3.3.3	Einbetten der Organe	32
3.3.4	Schneiden der Paraffinblöcke	32
3.3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	32
3.3.6	Immunhistologische Färbung	33
3.3.6.1	Entparaffinierung und Rehydrierung	33
3.3.6.2	Antigen-Retrieval	33
3.3.6.3	Immunhistologisches Färbeprotokoll	33
3.4	Auswertung der immunhistologischen Schnitte	35
3.4.1	Hilfsmittel der Auswertung	35
3.4.2	Auswertstrategien	35
3.4.2.1	S-Phasen-Response	36
3.4.2.2	Mitoseindex	36
3.4.2.3	Apoptoseindex	37

3.4.3	Statistische Auswertung	37
3.4.3.1	Vergleich der Pumpenzeiten sowie der Mitose- und Apoptoseindizes	38
3.4.3.2	Vergleich der zonalen und totalen Zellproliferation der behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe	38
3.4.3.3	Körper- und Lebergewichte	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Pumpenzeiten	39
4.1.1	B6C3F1 Maus	39
4.1.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	39
4.1.1.2	Labelingindizes	40
4.1.2	C57BL Maus	41
4.1.2.1	Makroskopische und histologische Befunde	41
4.1.2.2	Labelingindizes	42
4.2	Phenobarbital	44
4.2.1	B6C3F1 Maus	44
4.2.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	44
4.2.1.2	Labelingindizes	45
4.2.1.3	Mitose und Apoptose	46
4.2.2	C57BL Maus	47
4.2.2.1	Makroskopische und histologische Befunde	47
4.2.2.2	Labelingindizes	48
4.2.2.3	Mitose und Apoptose	49
4.3	Chloroform	49
4.3.1	B6C3F1 Maus	50
4.3.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	50
4.3.1.2	Labelingindizes	51
4.3.1.3	Mitose und Apoptose	52
4.3.2	C57BL Maus	53
4.3.2.1	Makroskopische und histologische Befunde	53
4.3.2.2	Labelingindizes	54
4.3.2.3	Mitose und Apoptose	55
4.4	Wyeth 14,643	55
4.4.1	B6C3F1 Maus	56

4.4.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	56
4.4.1.2	Labelingindizes	57
4.4.1.3	Mitose und Apoptose	58
4.4.2	C57BL Maus	59
4.4.2.1	Makroskopische und histologische Befunde	59
4.4.2.2	Labelingindizes	60
4.4.2.3	Mitose und Apoptose	61
5	DISKUSSION	62
5.1	Wahl der Marker	62
5.2	Wahl der Mäusestämme	63
5.3	Pumpenverweildauer	64
5.4	Auswertungsstrategien	65
5.4.1	Labelingindex	65
5.4.2	Mitose- und Apoptoseindex	66
5.5	Vergleich der ermittelten Werte der Kontrollgruppe 3 (7 Tage-Pumpe) mit Literaturangaben	68
5.5.1	B6C3F1 Maus	68
5.5.1.1	Mitoseindex	69
5.5.1.2	Apoptoseindex	69
5.5.2	C57BL Maus	69
5.5.2.1	Mitoseindex	70
5.5.2.2	Apoptoseindex	70
5.5.3	Vergleich der Kontrollwerte beider Mäusestämme	70
5.6	Ermittelte Werte nach Substanzapplikation	72
5.6.1	Phenobarbital	72
5.6.1.1	Labelingindex	73
5.6.1.2	Mitoseindex	74
5.6.1.3	Apoptoseindex	75
5.6.2	Chloroform	75
5.6.2.1	Labelingindex	76
5.6.2.2	Mitoseindex	77
5.6.2.3	Apoptoseindex	78
5.6.3	Wyeth 14,643	78

5.6.3.1	Labelingindex	79
5.6.3.2	Mitoseindex	80
5.6.3.3	Apoptoseindex	81
5.7	Bedeutung der zonalen Zellproliferation	81
5.8	Beurteilung der Mitose- und Apoptoserate	83
5.9	Bedeutung der gesteigerten Zellproliferation und Unterschiede zwischen den Mäusestämmen	84
5.10	Beitrag zu einer Datenbank für Zellproliferationsdaten	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	87
7	SUMMARY	89
8	ANHANG	91
8.1	Abbildungen	91
8.2	B6C3F1 Maus	93
8.2.1	Labelingindizes	93
8.2.2	Mitose- und Apoptoseindizes	97
8.3	C57BL Maus	103
8.3.1	Labelingindizes	103
8.3.2	Mitose- und Apoptoseindizes	108
8.4	Lösungen, Puffer, Bezugsquellen	114
8.4.1	Lösungen und Puffer	114
8.4.2	Bezugsquellen	115
9	LITERATURVERZEICHNIS	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetylcoenzym A
AgNoR	Argyrophlic Nuclear Organizer Regions
AI	Apoptoseindex
ALT	Alanin-Amino-Transferase
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
Chlo	Chloroform
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DEN	Diethylnitrosamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
G-Phase	gap-Phase
GSTP	Glutathion-S-Transferase-P
HCS	hepatocarcinogen sensitivity
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	intraperitoneal
IPCS	International Program on Chemical Safety
ISEL	in situ end-labeling
KGW	Körpergewicht
LD ₅₀	Letaldosis für 50 % der Population
LI	Labelingindex
LSAB	labeled streptavidin-biotin
LZM	lobule-dependent zonal measurement
M-Phase	Mitose-Phase
5MeC	5-Methylcytosin
MI	Mitoseindex
NCI	National Cancer Institute
NTP	National Toxicology Program
Pb	Phenobarbital
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PP	Peroxisomenproliferatoren

PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
Pumpe	osmotische Minipumpe, die subcutan implantiert wird
RNA	Ribonukleinsäure
s	Standardabweichung
SF	Streufaktor
S-Phase	Synthesephase
s.c.	subcutan
SDH	Sorbit-Dehydrogenase
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TGF α	transforming growth factor α
TGF β 1	transforming growth factor β 1
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling
Wyeth 14,643	[4-Chloro-6(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]azetat
\bar{x}	Mittelwert
\bar{x}_g	geometrischer Mittelwert

1 EINLEITUNG

Die Leber ist das Hauptzielorgan der chemisch induzierten Karzinogenese. 57 % der vom National Cancer Institute/National Toxicology Program (NCI/NTP) an Mäusen untersuchten Substanzen führten in der Leber zur Entstehung von Tumoren (GOLD et al., 1991). Der vermehrte Zellproliferation kommt hierbei auf sämtlichen Stufen der chemisch induzierten Karzinogenese eine Schlüsselrolle zu. Dies gilt vor allem für nicht-genotoxische Karzinogene. Dort wird die vermehrte Zellteilungsrate als ein auslösender Faktor der Tumorentstehung diskutiert (AMES und GOLD, 1990). In diesem Zusammenhang finden Zellproliferationsdaten immer häufiger Eingang bei der toxikologischen Beurteilung von Testsubstanzen.

Für die Auswertung von Zellproliferationsstudien kommen verschiedene Methoden zur Anwendung. In den meisten Fällen repräsentieren zufällig ausgewählte Meßfelder in der Leber die Gesamtheit der Zellreplikation. Mit dieser Art der Auswertung wird jedoch der Heterogenität der Leber keine Rechnung getragen. Verschiedene Substanzen rufen zonale Unterschiede in der Zellteilungsrate hervor, oder steigern die Zellteilungsrate nur einer Zone (CHEN et al., 1995; KOLAJA et al., 1996c; BAHNEMANN und MELLERT, 1997; LEE et al., 1998). Eine zonal differenzierte Auswertung erscheint um so sinnvoller, da eine in nur einer Zone erhöhte Zellteilungsrate bei einer zufälligen Wahl der Meßfelder übersehen werden kann (FOX et al., 1993; BAHNEMANN, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluß bekannter nicht-genotoxischer Karzinogene (Phenobarbital, Chloroform und Wyeth 14,643) auf die Zellteilungsrate der Leber zweier unterschiedlich tumoranfälliger Mäusestämme untersucht werden. Zuvor wurde die optimale Verweildauer des Markers 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) für die immunhistochemische Detektion der Zellteilung in der Mäuseleber etabliert. Die Auswertung der Zellteilung erfolgte unter Berücksichtigung der Zonalität der Leber, um etwaige Zielzonen der drei Substanzen oder Unterschiede in der Spontanteilungsrate erkennen zu können.

Mit dieser Arbeit soll die Datenbank für Zellproliferationsdaten erweitert werden und so die Entwicklung eines Kurzzeittestes zur Darstellung von kanzerogenem Potential mit Hilfe von hepatozellulärer Proliferation ermöglicht werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Zellproliferation und chemische Karzinogenese

Die chemische Karzinogenese wird in 3 verschiedene Stadien eingeteilt: Initiation, Promotion und Progression (SCHULTE-HERMANN, 1985; BUTTERWORTH, 1991).

Die Initiation stellt eine persistierende und vererbare Veränderung einer Zelle dar und kann durch eine einmalige Gabe eines Karzinogens ausgelöst werden (SCHULTE-HERMANN, 1985). Sie läuft in zwei Stufen ab: zuerst kommt es zu einer nicht letalen Mutation der DNA, die anschließend durch mindestens eine vollständig vollzogene DNA-Synthese fixiert wird (KLAUNIG und KOLAJA, 1998). Findet eine Mutation von Wachstumsgenen statt oder wird deren Expression verändert, kann es zur Produktion aktiver Onkogene oder zum Verlust oder der Hemmung von Tumorsuppressorgenen kommen (BUTTERWORTH, 1991). Die Veränderungen an der DNA können entweder exogen, z. B. durch DNA-reaktive Substanzen, oder endogen ausgelöst werden. AMES und GOLD (1990) berichten über DNA-Schädigung infolge endogener Oxidantien. Bei der Ratte kommt es dadurch täglich zu ca. 10^5 DNA-Schädigungen, beim Mensch sind es ca. 10^4 . Der Schaden muß jedoch in einer Zelle auftreten, welche die Potenz besitzt, sich weiterhin zu teilen und zur Tumorzelle zu entwickeln. Diesen Zellen im Gewebe stehen häufig ausdifferenzierte Zellen gegenüber, die nach absehbarer Zeit zu Grunde gehen. Dort entstandene Schäden am Genom haben im allgemeinen keinen Einfluß auf die Tumorentstehung (COHEN und ELLWEIN, 1990).

Die Tumorpromotion wird als selektives, klonales Wachstum initiiertes Zellen beschrieben. Sie stellt einen langsamen Prozeß dar, der sich an die Initiation anschließt und Wochen bis Jahre dauern kann (SCHULTE-HERMANN, 1985; PITOT, 1990). Substanzen, die als Tumorpromotoren wirken, sind meist nicht DNA-reaktiv; sie müssen aber über einen längeren Zeitraum und kontinuierlich wirken, um einen promovierenden Effekt zu entfalten (PERAINO et al., 1975). Fällt die Wirkung des Promotors weg, kann es zu einer Regression der präneoplastischen Veränderungen kommen (GRASL-KRAUPP et al., 1994; KOLAJA et al., 1996b).

Die Progression ist weniger gut definiert als die Stadien der Initiation und Promotion. Charakteristisch sind jedoch weitere DNA-Mutationen, eine gesteigerte Zellteilungsrate, histopathologische Veränderungen und Beeinflussbarkeit durch Hormone und Wachstumsfaktoren (PITOT, 1989).

2.1.1. Genotoxische Karzinogene

Unter dem Begriff genotoxische Karzinogene werden Substanzen oder deren reaktive Metaboliten zusammengefaßt, die direkt an die DNA binden, dadurch DNA-Addukte formen, und so zur Schädigung der DNA und schließlich zur Tumorentstehung führen können (COHEN und ELLWEIN, 1991). Zu diesen Veränderungen zählen Punktmutationen, Insertionen und Deletionen. Weiterhin können solche genotoxischen Substanzen die Chromosomenstruktur oder die Chromosomenanzahl beeinflussen (BUTTERWORTH, 1990). Genotoxisch wirkende Substanzen können zusätzlich einen zytotoxischen oder mitogenen Effekt besitzen und werden dann als komplettes Karzinogen bezeichnet (BUTTERWORTH et al., 1992). Diese kompletten Karzinogene führen durch die gesteigerte Zellteilungsrate früher zu Tumoren als ausschließlich genotoxisch wirkende Substanzen (COHEN und ELLWEIN, 1991). Es wird angenommen, daß es bei geringsten Dosen genotoxischer Substanzen zu Interaktionen mit der DNA kommt und somit jeder Kontakt ein generelles karzinogenes Risiko birgt (COHEN und ELLWEIN, 1991). Verfahren, ein vorhandenes mutagenes Potential nachzuweisen, sind meist Bakterien-Mutagenitätstests, wie zum Beispiel der Ames-Test (AMES et al., 1973).

2.1.2. Nicht-genotoxische Karzinogene

Substanzen und deren Metaboliten, die nicht DNA-reaktiv sind, aber dennoch karzinogen wirken, werden als nicht-genotoxische Karzinogene bezeichnet (COHEN und ELLWEIN, 1991; BUTTERWORTH et al., 1995). Ihre Wirkungsweise beruht vor allem auf einer gesteigerten Zellteilungsrate (COHEN und ELLWEIN, 1990). Diese kann entweder, bedingt durch zytotoxisch wirkende Substanzen, regenerativ sein oder aufgrund einer direkten mitogenen Wirkung entstanden sein. Direkt mitogen wirkende Substanzen werden auch häufig als Promotoren bezeichnet (PITOT et al., 1981; SCHULTE-HERMANN, 1985).

Tab. 1: Klassifizierung nicht-genotoxischer Karzinogene aufgrund ihrer Wirkungsweise

zytotoxisch wirkende Substanzen	mitogen wirkende Substanzen
<ul style="list-style-type: none"> - nicht DNA-reaktiv - in karzinogenen Dosen teilweise zytotoxisch - induzieren regeneratives Wachstum - eventuell entzündliche Begleiteffekte - zirkulierende Wachstumsfaktoren können bevorteiltes Wachstum präneoplastischer Zellen bewirken 	<ul style="list-style-type: none"> - nicht DNA-reaktiv - in karzinogenen Dosen nicht zytotoxisch - mitogene Wachstumsstimulation - Wirkung eventuell über spezifischen Rezeptor - können bevorteiltes Wachstum präneoplastischer Zellen direkt stimulieren

nach: BUTTERWORTH et al. (1995)

Beispiele für zytotoxisch wirkende Substanzen sind Tetrachlorkohlenstoff, Furan und Chloroform, für mitogen wirkende Substanzen die Klasse der Peroxisomenproliferatoren (wie z. B. Wyeth 14,643), 1,4-Dichlorbenzen und Phenobarbital (DOOLITTLE et al., 1987; MARSMAN et al., 1988; CORLEY et al., 1990; JIRTLE et al., 1991; WILSON, et al., 1992; LAKE et al., 1997). Bei Gabe von zytotoxischen Substanzen kommt es zum Zellschaden bis hin zum Zelltod und nachfolgend zu einer regenerativen Proliferation. Parallel kann bei auf die Leber zytotoxisch wirkenden Substanzen ein Anstieg der Leberenzyme im Serum beobachtet werden. 48 h nach Verabreichung der Substanz wird das Maximum der Zellteilung erreicht (BUTTERWORTH et al., 1992; LARSON et al., 1993; GEMMA et al., 1996). Für diese Substanzklasse wird das Vorhandensein eines Schwellenwertes diskutiert, da die karzinogene Wirkung stark mit der zytotoxischen Wirkung korreliert (COHEN und ELLWEIN, 1990; BUTTERWORTH et al., 1995).

Mitogen wirkende Substanzen steigern die Zellproliferation, ohne sichtbaren Zelltod hervorzurufen (GOLDSWORTHY et al. 1993). Die Substanzgabe führt zu einer Gewichtszunahme des betroffenen Organs, die über die Dauer der Verabreichung erhalten bleibt (BUTTERWORTH et al., 1992; KOLAJA et al., 1996b; ORTON et al., 1996). Es kommt nach Gabe einer mitogen wirkenden Substanz zu einem anfänglichen Peak (häufig nach einer Woche beobachtet, wenn über mehrere Wochen gemessen wird) und anschließend zu einem Rückgang der LI bis auf Kontrollniveau (ELDRIDGE et al., 1992; KOLAJA et al., 1996c; PLANT et al., 1998; BAHNEMANN, 2000). Mitogene scheinen eine spezielle Wirkung auf präneoplastische Herde zu haben und dort das Verhältnis zwischen Zellteilung und Zelltod zu verändern (CATTLEY und POPP, 1989). Da bei Rezeptor-vermittelter

Wirkung die Schwelle sehr niedrig und somit unter Umständen nicht feststellbar sein kann, ist die Festsetzung eines Schwellenwertes problematisch (ISSEMANN und GREEN, 1990).

2.1.3 Zellproliferation und nicht-genotoxische Karzinogene

Die Zellproliferation spielt eine Schlüsselrolle in allen Stadien der Karzinogenese (AMES und GOLD, 1990; COHEN und ELLWEIN, 1990; SCHULTE-HERMANN et al., 1991; BUTTERWORTH et al., 1992). Treten zum Beispiel in der Leber, einem Organ mit sehr geringer Zellteilungsrate, durch genotoxische Substanzen bedingte DNA-Schäden auf, müssen diese nicht zwangsläufig zur Tumorentstehung führen. Erst durch eine gesteigerte Zellteilungsrate, hervorgerufen zum Beispiel durch nicht-genotoxische Karzinogene, kommt es zur Fixierung der Schäden in Form von Mutationen (CAYAMA et al., 1978; COLUMBANO et al., 1981).

Während der Zellteilung ist die einsträngige DNA besonders empfindlich gegenüber exogenen oder endogenen (s. 2.1) Einflüssen. YANG et al. (1982) zeigten, daß die mutagene Wirkung von Benzpyrenepoxid auf Fibroblasten während der S-Phase viel stärker war als in anderen Zellzyklusstadien. Bei vermehrter Zellteilung liegt die DNA häufiger in einsträngiger Form vor (AMES et al., 1993). Jede Zelle besitzt Möglichkeiten, entstandene DNA-Schäden zu reparieren. Durch eine gesteigerte Zellteilungsrate verkürzt sich die Zeitspanne in der Reparaturen möglich sind. Es erhöht sich somit das Risiko für die Entstehung persistierender DNA-Schäden (AMES et al., 1993; FOSTER, 1997). Somit wirken nicht-genotoxische Karzinogene indirekt mutagen (AMES und GOLD, 1990). Zusätzlich kann der Methylierungsstatus der DNA auf Grund der vermehrten DNA-Synthese oft nicht mehr aufrecht erhalten werden (COLUMBANO et al., 1991). Da der Methylierungsstatus des Cytosins verantwortlich für die Kontrolle der Genexpression z.B. von Onkogenen ist (COUNTS und GOODMAN, 1995a), kann eine Hypomethylierung zur vermehrten Entstehung von Lebertumoren führen (DENDA et al., 1985).

Sind schon präneoplastische Zellen vorhanden und kommt es durch den Einfluss nicht-genotoxischer Substanzen zu einer gesteigerten Zellteilung, führt dies zu einer selektiven Vermehrung dieser Zellen (CATTLEY und POPP, 1989). Durch eine anhaltend gesteigerte Zellteilungsrate erhöht sich die Wahrscheinlichkeit von weiteren Mutationen innerhalb dieser Präneoplasien und es kommt zu einer fortschreitenden Malignität (FOSTER, 1997).

Manche Autoren vertreten die Meinung, daß eine alleinige Erhöhung der Zellproliferation durch eine chemische Substanz nicht mit einer karzinogenen Wirkung gleichgesetzt werden kann (WEINSTEIN, 1991a; HUFF, 1993). WARD et al. (1988) fanden bei Mäusen erhöhte

Zellteilungsrate, die durch die Gabe verschiedener Substanzen induziert worden waren. Sie konnten die gesteigerte Zellproliferation jedoch nur unregelmäßig mit dem Auftreten von Tumoren korrelieren. Ein besseres Verständnis der zellulären und molekularen Vorgänge während der chemischen Karzinogenese ist notwendig und würde eine bessere Risikoabschätzung potentiell kanzerogener Stoffe ermöglichen (MELNICK et al., 1993).

2.1.4 Apoptose und nicht-genotoxische Karzinogene

Der Begriff Apoptose wurde von KERR et al. (1972) geprägt. Sie beschrieben eine Form des Zelltodes, die anhand spezifischer morphologischer Veränderungen identifiziert werden konnte. Im adulten Organismus dient die Apoptose der Erhaltung des zellulären Gleichgewichts und der selektiven Eliminierung geschädigter Zellen (KERR et al., 1972; BURSCH et al., 1994; CONSTAN et al., 1996). Der Prozeß läuft unter genetischer Kontrolle ab und kann entweder endogen initiiert werden oder durch extrazellulär wirkende Faktoren wie Hormone, Zytokine, Futterentzug, chemische und physikalische Agentien sowie Viren eingeleitet werden (MAJNO und JORIS, 1995; KOLAJA et al., 1996a).

Morphologische Merkmale der Apoptose (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980) sind:

- Separation aus dem Zellverband
- Kondensation des Chromatins
- Zerfall in „apoptotische Körperchen“
- Phagozytose der apoptotischen Körperchen durch Nachbarzellen und Makrophagen

Die Apoptose kann in der Leber durch folgende Verfahren detektiert werden:

- lichtmikroskopische Auswertung am Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitt (s. morphologische Merkmale oben)
- Eosinfluoreszenz im UV-Licht (STINCHECOMBE et al., 1995)
- immunhistochemische Anfärbung von transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) (WAKEFIELD et al., 1990)
- Markierung von DNA-Strangbrüchen (in situ end-labeling = ISEL; terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling = TUNEL) (WIJSMAN et al., 1993)

Tab. 2: Kontrollwerte der Apoptoserate in der Mäuseleber

Mäusestamm	Nachweis	Apoptose Index	Referenz
weibliche B6C3F1	HE-Schnitt	~ 0,1 %	GOLDSWORTHY et al. (1996)
männliche B6C3F1	TUNEL	< 0,01 %	JAMES et al. (1998)
männliche B6C3F1	TUNEL	< 0,01 %	MUSKHELISHVILI et al. (1995)

HE = Hämatoxylin-Eosin, TUNEL = transferase-mediated dUTP nick end-labeling

Ebenso wie die Zellproliferation hat die Apoptose Einfluß auf die Tumorentstehung. Es wird angenommen, daß 80-90 % der initiierten Zellen durch Apoptose eliminiert werden (LUEBECK et al., 1991). Verschiedene nicht-genotoxische Substanzen wie Nafenopin oder Phenobarbital hemmen die Apoptose in präneoplastischem Lebergewebe (ROBERTS et al., 1995; KOLAJA et al., 1996b). Dies verschafft initiierten Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber unverändertem Gewebe (SCHULTE-HERMANN et al., 1990). Mitogene Substanzen können so auf zwei Arten die Entstehung von Präneoplasien oder Tumoren beeinflussen: durch eine gesteigerte Zellteilungsrate und durch Hemmung der Apoptose (SCHULTE-HERMANN et al., 1991). Die chemisch induzierte Hemmung der Apoptose ist durch Absetzen der Substanzgabe reversibel (BURSCH et al., 1986).

2.2 Chemische Karzinogenese in der Leber

2.2.1 Die Leber

Die Leber ist ein zentrales Organ im Stoffwechsel (POPPER und SCHAFFNER, 1961). Zu ihren wichtigsten Aufgaben zählen die Aufrechterhaltung der Energieversorgung, die Biosynthese von Proteinen und die Eliminierung von Ammoniak durch Umwandlung in Harnstoff. Ihr kommt eine wichtige Funktion im Endokrinium durch den Abbau zirkulierender Hormone zu. Medikamente und toxische Substanzen werden oft in der Leber durch Biotransformation entgiftet, andere Stoffe, wie zum Beispiel Clofibrat, können jedoch auch bioaktiviert, also in ihre toxische Form überführt werden (KEDDERIS, 1996).

Die Leber besteht sowohl aus Parenchymzellen, den Hepatozyten, als auch aus Stromazellen, den Endothelzellen, Kupfferschen Sternzellen, Itozellen und Pitzellen (JUNGERMANN und KATZ, 1989).

Morphologisch wird die Leber des Schweines in Leberläppchen eingeteilt, die von hexagonal angeordneten Bindegewebssepten begrenzt werden und die Zentralvene im Läppchenzentrum

liegt. Portalgefäße sind im Dreieck um die Zentralvene angeordnet und liegen im Bereich der Bindegewebssepten. RAPPAPORT et al. (1954) teilten die Leber dagegen in eine funktionale Einheit, den Azinus ein. Das Blut fließt demnach über arterielle Äste zuerst parallel zu den Septen und dann über die Sinusoide zur abführenden Vene. Es kommt somit radiär zur Abnahme an Sauerstoff, Substraten und Hormonen. Man unterscheidet Zonen mit hohem O₂-Partialdruck (periportale Zone 1) und Zonen mit geringem O₂-Partialdruck (perivenöse Zone 3). Dazwischen liegt die Zone 2. Zonale Unterschiede findet man auch in der Enzymausstattung, dem Anteil stromaler Zellen und der autonomen Innervierung (JUNGERMANN und KATZ, 1989). So besitzt die Glukose-6-Phosphatase zum Beispiel eine höhere Aktivität im periportalen Bereich, die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase hingegen eine höhere Aktivität im perivenösen Bereich. Auch die Leber schädigende Stoffe zeigen unterschiedliche Wirkorte: so wird durch Allylalkohol vor allem der periportale Bereich geschädigt, wohingegen Ethanol oder Tetrachlorkohlenstoff den perivenösen Bereich schädigen (ISRAEL et al., 1975; JAMES et al., 1981; KLINGER et al., 1986).

2.2.2 Tumorentstehung in der Leber

Die Leber ist eines der Hauptzielorgane in der chemisch induzierten Karzinogenese. Von 354 an Ratten und 299 an Mäusen untersuchten Substanzen führten bei der Ratte 40 % und bei der Maus 57 % zur Tumorentstehung in der Leber (GOLD et al., 1991). Auch hier gilt das Mehrstufenkonzept der Tumorentstehung (SCHULTE-HERMANN, 1985; BUTTERWORTH, 1991). Durch klonales Wachstum initiiertes Zellen entstehen Inseln, die sich morphologisch, in ihrer Enzymaktivität und in der Zellteilungsrate vom umliegenden Gewebe unterscheiden (DIWAN et al., 1991). Diese Läsionen werden als präneoplastische „foci“ bezeichnet. Die veränderte Enzymexpression wurde am besten in der Rattenleber untersucht und stellt sich in Form einer Glutathion-S-Transferase-P(GSTP)-positiven immunhistochemischen Reaktion dar. Das umgebende Lebergewebe stellt sich im Vergleich GSTP negativ dar (SATO, 1989). In der Mäuseleber wird Glukose-6-Phosphatase als häufigster immunhistochemisch nachgewiesener Marker präneoplastischer Herde, so genannter „foci“, verwendet (DRINKWATER et al., 1990).

Die Zellproliferation in der Leber beeinflusst im unveränderten Gewebe die Tumorinitiation, in den „foci“ die Tumorpromotion. STANDEVEN et al. (1995) stellten eine erhöhte Zellteilungsrate in „foci“ im Vergleich zum umgebenden Gewebe fest. Proliferative und neoplastische Läsionen in der Mäuseleber sind eosinophile, basophile, vakuolierte oder gemischtzellige „foci“, Klarzellfoci sowie Adenome und Karzinome (FRITH und WARD, 1980).

2.2.3 Mechanismen nicht-genotoxischer Hepatokarzinogene

Die interzelluläre Kommunikation findet in der Leber durch gap junctions statt. Über diese Zell-zu-Zell Kontakte können niedermolekulare Stoffe zwischen den Hepatozyten ausgetauscht werden, wodurch die Gewebshomöostase, das Zellwachstum und die Zellteilung kontrolliert werden (LOEWENSTEIN, 1979; YAMASAKI, 1991). Die Hemmung dieser Zell-zu-Zell Kommunikation ist möglicherweise ein wichtiger Faktor in der Hepatokarzinogenese (KLAUNIG und KOLAJA, 1998). Nicht-genotoxische Substanzen können gap junctions verändern (NEVEU et al., 1994) und so den hemmende Effekt aufheben, den unveränderte Hepatozyten als Wachstumskontrolle auf initiierte Zellen haben (TROSKO und GOODMAN, 1994).

Onkogene, Tumorsuppressor-Gene und Wachstumsfaktoren haben einen regulierenden Einfluß auf das Organwachstum (z. B. auf Zellproliferation und Apoptose) (KLAUNIG und KOLAJA, 1998). Eine Deregulation oder vermehrte Expression dieser Gene kann zur Tumorentstehung führen (WEINSTEIN, 1991b; BUTTERWORTH et al., 1994; HARRINGTON et al., 1994).

Oxidativer Streß ist eine Imbalance des oxidativen Status der Zelle. Dazu kommt es, wenn das Verhältnis zwischen Produktion und Abbau von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gestört ist (REDDY und RAO, 1986). Aus H_2O_2 entstehen über eine Oxidase-vermittelte Reaktion neben einer Hydroxylgruppe (OH) Hydroxylradikale (OH^*) und Singulett-Sauerstoff (1O_2) (Haber-Weiss-Reaktion). Diese reaktiven Nebenprodukte der Reaktion werden für eine Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden verantwortlich gemacht (CHANCE et al., 1979). Peroxisomenproliferatoren führen zu einer deutlichen Erhöhung der H_2O_2 -generierenden Oxidasen, wohingegen die H_2O_2 -abbauende Katalase nur geringgradig erhöht ist (NEMALI et al., 1989). Dies wird als ein möglicher Weg der Tumorentstehung diskutiert (CERUTTI, 1985; REDDY und RAO, 1986; MACHLIN und BENDICH, 1987; OLSON, 1988). Experimentelle Daten zeigen jedoch, daß dies nicht der alleinige Mechanismus sein kann, über den Peroxisomenproliferatoren karzinogen wirken (MARSMAN et al., 1992). So

rufen z. B. bei der Ratte unterschiedliche Konzentrationen von Wyeth 14,643 gleich starke Oxidierung der DNA hervor, zur Tumorentstehung kommt es jedoch nur in höheren Konzentrationen (CATTLEY und GLOVER, 1993).

Als weitere Wirkweise von hepatokarzinogenen Substanzen wird die induzierte gesteigerte Zellproliferation und veränderte Apoptoserate diskutiert (s. 2.1.3 und 2.1.4).

2.3 Unterschiede in der Tumorrage zwischen der B6C3F1 und C57BL Maus

Die B6C3F1 Maus ist eine Hybridmaus, die durch Kreuzung der beiden Inzuchtstämme C3H/He und C57BL/6 entstanden ist. Der paternale Stamm (C3H/He) ist sehr empfänglich für Tumoren, der maternale Stamm (C57BL/6) gilt dagegen als relativ resistent. Die B6C3F1 Maus ist der meist genutzte Mäusestamm in Kanzerogenitätsstudien und gilt als anfällig für die Entwicklung von Tumoren. Die Lebertumorprävalenz (Adenome und Karzinome), ermittelt aus 2 Jahres Karzinogenitätsstudien im Rahmen des National Toxicology Program (NTP), betrug bei männlichen, über 2 Jahre alten Kontrolltieren der B6C3F1 Maus 30 % (MARONPOT et al., 1987). FRITH et al. (1983) untersuchten die Spontantumorrage in der C57BL/6 Maus. Sie stellten eine Lebertumorprävalenz von 4,7 % bei männlichen, über 500 Tage alten Tieren fest.

Tab. 3: Spontantumorrage in der Mäuseleber

Mäusestamm	Anzahl	Alter	Tumorprävalenz	Referenz
männliche B6C3F1	1784	> 2 Jahre	30 %	MARONPOT et al. (1987)
männliche C57BL/6	215	> 500 Tage	4,7 %	FRITH et al. (1983)

Studien an Inzuchtmäusestämmen und rekombinierten Stämmen zeigen, daß die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Stämme mit Differenzen in Allelen verschiedener Genorte (HCS = hepatocarcinogen sensitivity) in Zusammenhang stehen (DRINKWATER und GINSLER, 1986; HANIGAN et al., 1988; GARIBOLDI et al., 1993). Es konnte jedoch bisher nicht geklärt werden, wo genau diese HCS-Gene liegen. Die HCS-Gene scheinen die Tumorentstehung auf der Ebene der Promotion zu beeinflussen, indem sie die Proliferationsrate präneoplastischer Zellen erhöhen: Mäusestämme mit unterschiedlicher Anfälligkeit für die Tumorentstehung entwickeln alle „foci“. Diese unterscheiden sich aber in der Zellproliferationsrate. Bei dem anfälligeren Stamm ist diese sowohl in den „foci“ als auch

im umgebenden Lebergewebe deutlich höher als bei den anderen Stämmen (HANIGAN et al., 1988). DRINKWATER und GINSLER (1986) zeigten, daß unterschiedlich tumoranfällige Stämme nach Induktion zwar eine ähnliche Tumorprävalenz besaßen, die Gesamtzahl entstandener Tumore in der Leber anfälliger Mäuse jedoch bis um das 20-fache höher gegenüber der des resistenten Stammes war.

2.3.1 Methylierungsstatus der DNA

5-Methylcytosin (5MeC) ist eine im Säugetier vorkommende methylierte Base der DNA und wird vor allem in der Promoterregion verschiedener Gene gefunden (BIRD, 1986). Die Expression eines Gens wird unter anderem durch seinen Methylierungsstatus kontrolliert (JONES und BUCKLEY, 1990). Die Methylgruppe stellt ein chemisches Signal dar, welches von Transkriptions-regulierenden Faktoren erkannt wird (COUNTS und GOODMAN, 1995b). Hypomethylierung eines Gens erhöht die Wahrscheinlichkeit seiner Expression verglichen mit vollständig methylierten Genen (RAZIN und KAFRI, 1994). Wird die Zellproliferation durch Gaben von Phenobarbital oder durch partielle Hepatektomie gesteigert, kommt es bei der B6C3F1 Maus zu einem Abfall des Methylierungsstatus und zur Tumorentstehung. Der Methylierungsstatus der C57BL/6 Maus bleibt unter diesen Behandlungen unbeeinflusst (RAY et al., 1994; COUNTS et al., 1996).

2.4 Messung der Zellproliferation

Die Messung der Zellproliferation dient dem Nachweis von Zellen, die sich gerade in Teilung befinden oder sich auf eine Teilung vorbereiten. Anschließend kann die Zahl der Zellen, die sich in Teilungsphase befinden, in Beziehung zur Gesamtzellzahl oder zu einem Flächen- oder Längenparameter gesetzt werden (GOLDSWORTHY et al., 1991).

2.4.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in folgende Phasen unterteilt (HENKES et al., 1993): in der G₀-Phase (G steht für gap = englisch für Lücke, Intervall) befindet sich die Zelle in der Ruhephase. Daran schließt sich die G₁-Phase, die Wachstumsphase, an. Während dieses Abschnittes werden Proteine, RNA und Membranen synthetisiert. In der S-Phase (S steht für Synthese) wird die DNA repliziert. Die Zelle verbleibt anschließend einige Zeit in der G₂-Phase, bevor sie sich dann in der M-Phase (M steht für Mitose) teilt.

2.4.2 Methoden zur Messung der Zellproliferation

Bei allen verwendeten Methoden zur Messung der Zellproliferation werden biologische Marker detektiert, die während spezifischer Stadien des Zellzyklus exprimiert werden. Messungen können an Zellkulturen oder an histologischen Schnitten vorgenommen werden. Im Folgenden soll nur näher auf Methoden eingegangen werden, die zur Messung der Zellproliferation an histologischen Schnitten verwendet werden:

1. Bestimmung des Mitoseindex (VAN DIEST et al., 1992)
2. Metaphasen-Stop-Methode (FOLEY et al., 1991)
3. AgNoR (Argyrophilic Nuclear Organizer Regions) (MASUDA et al., 1997)
4. Immunhistologischer Nachweis zellzyklusspezifischer Proteine (Ki 67, PCNA) (FOLEY et al., 1991; DIETRICH, 1993; TETER et al., 1995)
5. Nachweis von messenger-RNA bestimmter Histon-Proteine (ALISON et al., 1994; GOWN et al., 1996)
6. Bestimmung der S-Phasen-Fraktion ($[^3\text{H}]$ -Thymidin, BrdU) (GRATZNER, 1982; DeFAZIO et al., 1987; LANIER et al., 1989)

Für die Toxikopathologie haben die Verfahren 4-6 die größte Bedeutung und werden am häufigsten eingesetzt.

2.4.3 Endogene Marker

Die Marker, die in den Verfahren 4 und 5 angewendet werden, zählen zu den endogenen Markern. Es werden immunhistochemisch Proteine detektiert, die während einer oder mehrerer Phasen des Zellzyklus auftreten, nicht aber in der G₀-Phase. Der Vorteil gegenüber exogenen Markern besteht darin, daß diese Methoden auch retrospektiv an archiviertem Material eingesetzt werden können (ELDRIGE et al., 1993).

2.4.4 Exogene Marker

$[^3\text{H}]$ -Thymidin

$[^3\text{H}]$ -Thymidin ist ein radioaktiv markierter DNA-Baustein mit einer hohen Spezifität (GOLDSWORTHY et al., 1991). Er wird ausschließlich in die DNA inkorporiert. Für seine Applikation stehen verschiedene Techniken zur Verfügung (s. Tab. 4). Nachteile dieser Methode sind erstens die radioaktive Kontamination, was ein Arbeiten unter besonderen Schutzmaßnahmen erforderlich macht und dadurch hohe Kosten verursacht. Zweitens sind

lange histoautoradiographische Entwicklungszeiten von Wochen bis Monaten erforderlich (ELDRIDGE et al., 1990).

5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)

Hierbei handelt es sich um ein Thymidinanalogon, welches kompetitiv während der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA inkorporiert wird. Sowohl der erste polyklonale als auch der erste monoklonale Anti-BrdU-Antikörper wurde von GRATZNER et al. (1975 und 1982) entwickelt. Der gebundene Antikörper kann am histologischen Schnitt mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden (De FAZIO et al., 1987).

In der folgenden Tabelle werden verschiedene Applikationsformen für BrdU und deren Vor- und Nachteile aufgeführt:

Tab. 4: Verabreichungsformen von BrdU (FOSTER, 1997; GOLDSWORTHY et al., 1991)

Methoden	Vorteile	Nachteile
einmalige i.p. Injektion (= pulse labeling)	- geringe Kosten, da nur geringer Materialverbrauch	- kleines Zeitfenster
Verabreichung über das Trinkwasser	- geeignet für Langzeitstudien - geringes Intoxikationsrisiko für das Tier	- Aufnahme unterliegt circadianen Einflüssen - nicht geeignet bei Mehrfachbelegung der Käfige
s. c. Implantation von Retardkapseln	- geeignet für Langzeitstudien	- lokale Zytotoxizität - unkontrollierte Substanzabgabe - operativer Eingriff notwendig
osmotische Minipumpe	- konstante Substanzabgabe bis zu 28 Tage - nicht vom circadianen Rhythmus abhängig - gute Untersuchungsmöglichkeit für Organe mit niedrigem Mitoseindex	- Implantation soll laut Autor zu hormonellen Imbalancen führen - operativer Eingriff notwendig

i. p. = intraperitoneal, s. c. = subcutan

Bei der Verwendung der Retardkapseln fanden WEGHORST et al. (1991) eine paradoxerweise geringere Anzahl markierter Zellen nach 7-tägiger Implantation im Vergleich zur 4-tägigen Implantation. Auch kam es zu einem verminderten Leber- zu Körpergewichtsverhältnis. Sie führten dies auf eine inkonstante und zu Beginn zu starke Freisetzung des BrdUs aus den Retardkapseln zurück, da es beim Einsatz der osmotischen Minipumpen zur konstanten Zunahme der gelabelten Zellen und keinen Veränderungen im

Leber- oder Körpergewicht mit längerer Exposition kam. In hohen Dosen fanden sich bei in vitro Versuchen BrdU-assoziierte Mutationen in Säugerzellen in Form eines Austauschs von einzelnen Basenpaaren (DAVIDSON et al., 1988). Bei infantilen Ratten besitzt BrdU eine karzinogene Wirkung (NAPALKOV et al., 1989) und bei der Verabreichung an tragende Mäuse kommt es bei den Feten zu Mißbildungen wie Exenzephalie, Gaumenspalten und abnormaler Gliedmaßenentwicklung (BANNIGAN und LANGMAN, 1979). WEGHORST et al. (1991) applizierten Mäuse BrdU für 7 Tage über eine Minipumpe in einer Konzentration von 35,7 mg/ml und einer durchschnittlichen Ausflußmenge von 0,56 µl/Stunde (entspricht einer Konzentration von 20 µg/Stunde). Sie konnten bei den Tieren keine Abweichung der LI zu Tiere finden, die eine geringere Konzentration BrdU erhielten. Es fand sich auch keine Reduzierung des Körpergewichts oder sonstigen Anzeichen für einen toxischen Effekt. Häufig verwendete BrdU-Konzentrationen für Zellproliferationsstudien liegen bei 20 mg/ml Trägerflüssigkeit in der Minipumpe (De FAZIO et al., 1987; GOLDSWORTHY et al., 1991; ELDRIDGE et al., 1992).

Die ermittelten positiv gelabelten Zellen werden in Beziehung zur Gesamtzellzahl gesetzt und der prozentuale Anteil in Form des Labelingindex (LI) ausgedrückt (ELDRIDGE et al., 1990; GOLDSWORTHY et al., 1991).

Die Wahl der Applikationsform richtet sich nach dem zu untersuchenden Gewebe und der Fragestellung. In sich schnell teilenden Gewebe wie z. B. Darm oder Knochenmark können ausreichend hohe LI mittels der Pulse-Labeling Technik erzielt werden (De FAZIO et al., 1987). Mit Hilfe dieser Technik steht dem Körper nur eine einmalige BrdU-Gabe zur Verfügung. Da die Halbwertszeit von BrdU 0,5-1 h beträgt, stellt dies nur einen sehr kurzen Detektionszeitraum dar (WRIGHT und ALISON, 1984). In sich langsam teilenden Gewebe wie der Leber werden mittels der Pulse-Labeling-Methode nur geringe LI ermittelt. Hierbei kann ein durch eine Substanz hervorgerufener Effekt verdeckt bleiben oder übersehen werden (MARSMAN et al., 1988).

LANIER et al. (1989) und ELDRIDGE et al. (1990) zeigten, daß sich LI, die mit BrdU oder [³H]-Thymidin ermittelt wurden, nicht signifikant unterschieden. Aufgrund dessen hat sich BrdU als exogener Marker durchgesetzt. Dies ist auf die einfachere Handhabung, geringere Kosten und den schnelleren Erhalt der Ergebnisse zurückzuführen (GOLDSWORTHY et al., 1991; FOSTER, 1997).

2.5 Zellproliferation in der Leber

Im ausgewachsenen Organismus zählen die Hepatozyten zu den reversibel postmitotischen Zellen. Sie besitzen eine sehr niedrige basale Zellteilungsrate (0-5,4 Mitosefiguren/1000 Hepatozyten) (SURUR et al., 1985) und einen sehr hohen Differenzierungsgrad (PEREIRA und GROTHAUS, 1997). Werden sie entsprechend stimuliert, können sie erneut eine starke proliferative Aktivität entwickeln (MICHALOPOULOS und De FRANCES, 1997). Die durchschnittliche Lebensspanne eines Hepatozyten beträgt 200 bis 400 Tage (LEDDA-COLUMBANO et al., 1996).

2.5.1 Konzept der „streaming liver“

ZAJICEK et al. (1985) prägten den Begriff „streaming liver“. Ihre Untersuchungen an Ratten zeigten eine Wanderung der Hepatozyten vom Portalfeld zur abführenden Vene innerhalb von 200 Tagen. Hierbei durchlaufen die wandernden Hepatozyten unterschiedliche Differenzierungsstadien in Bezug auf ihre Enzymausstattung. ZAJICEK et al. (1985) gehen von hepatozytären Vorläuferzellen aus, die sich, ähnlich wie in der Epidermis oder in der Darmmukosa, im periportalen Bereich teilen und dann in Richtung Vene ausdifferenzieren. Einige Autoren unterstützen dieses Konzept (GEISLER et al., 1994; WERLICH et al., 1998). Verschiedene Autoren bezeichnen diese Vorläuferzellen als Ovalzellen und gehen davon aus, daß diese Zellen sich sowohl in Hepatozyten als auch in Gallengangsepithelzellen ausdifferenzieren können (SIRICA et al., 1990; SIGAL et al., 1992; SELL, 1994). MELVIN (1968) zeigte bei Mäusen, die mit der zytotoxisch wirkenden Substanz Tetrachlorkohlenstoff behandelt wurden, ein vermehrtes Auftreten von Mitosen und gelabelten Zellen in der Zone 1 nach Rappaport. Sie führten dies auf die bessere Blutversorgung zurück und nicht auf das Vorhandensein von Stammzellen. Andere Untersucher kamen jedoch zu dem Schluß, daß sich Hepatozyten unabhängig von ihrer Position teilen können und anschließend nicht „wandern“ (BRALET et al., 1994; KENNEDY et al., 1995; PONDER, 1996). PONDER et al. (1991) konnten auch zeigen, daß Hepatozyten eine längere Lebensdauer besitzen als die von den Anhängern der „streaming liver“-Theorie angegebenen 200 Tage. LEE et al. (1996) fanden in C57BL Mäusen im Gegensatz zur Ratte nur vereinzelt Ovalzellproliferationen nach dem Auftreten von Allylalkohol-induzierten Nekrosen. Es wurde jedoch eine gesteigerte Zellproliferation im angrenzenden, noch gesunden Gewebe beobachtet.

2.5.2 Zonale Unterschiede in der Zellproliferation

Untersuchungen zeigen, daß es nach Teilhepatektomie bei der Ratte zu unterschiedlichen Zeiten und in unterschiedlichen Zonen zu einer gesteigerten Zellproliferation kommt (RABES et al., 1976). LEE et al. (1998) fanden nach chemisch induziertem Zelltod ebenfalls in der Ratte eine kompensatorische Zellproliferation mit der stärksten Ausprägung im periportalen Bereich. Zu späteren Zeitpunkten findet die vermehrte Zellproliferation in der Mitte des Leberläppchens und perivenös statt. Hervorgerufen durch unterschiedliche mitogen wirksame Substanzen oder andere Stimuli können verschiedene Muster im Proliferationsverhalten der Hepatozyten festgestellt werden. So rufen Peroxisomenproliferatoren wie Wyeth 14,643, Nafenopin, Clofibrat und Ly 171883 (ELDRIDGE et al., 1990; EACHO et al., 1991; TANAKA et al., 1994) oder Tetrachlordibenzo-p-dioxin (FOX et al., 1993) in Ratten ein periportales Labelingmuster hervor. Bei Mäusen wird für Phenobarbital und Dieldrin ein perivenöses Labelingmuster beschrieben (KOLAJA et al., 1996c). Einige Studien zeigen, daß Steigerungen des LI übersehen werden können, wenn zonale Verteilungsmuster bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden (FOX et al., 1993; BAHNEMANN, 2000).

2.5.3 Auswertungsstrategien in der Leber

2.5.3.1 Gesamt-Labelingindex

Zur Bestimmung des Gesamt-LI gibt es verschiedene Methoden. Es werden in zufällig ausgewählten Feldern der Leber sowohl BrdU-positive als auch -negative Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Die Gesamtzellzahl, die hierbei ausgezählt wird, variiert meist zwischen 1000 und 2000 Zellen (ELDRIDGE et al., 1990; GOLDSWORTHY et al., 1991; MARSMAN et al., 1992; WADA et al., 1992; WILSON et al., 1992; LARSON et al., 1994a; STANDEVEN und GOLDSWORTHY, 1994).

Eine weitere Methode zur Bestimmung des LI ist die Beziehung der positiven Zellen zu einer bestimmten Fläche. Hierbei werden in z. B. 5 zufällig gewählten Arealen je 25 Felder a 1 mm^2 ausgewertet und der LI als Zellen pro mm^2 angegeben (WEGHORST et al., 1991).

DEES und TRAVIS (1993) bezogen die positiven Zellen auf 100 lichtmikroskopisch ausgewertete Felder bei einer 200-fachen Vergrößerung.

2.5.3.2 Zonale Auswertung

Tab. 5: Ermittlung von zonalen Zellproliferationsdaten in der Leber

Methode	Durchführung	Autoren
LI	BrdU-positive Zellen aus mind. 500 periportal oder zentrolobulär gelegenen Hepatozyten.	FOX et al. (1993)
LI	BrdU-positive Zellen aus mind. 500 zufällig gewählten Hepatozyten. Abstand der positiven Zellen zur Zentralvene wurde bestimmt	CHEN et al. (1995)
LI	BrdU-positive Zellen aus mind. 1000 Hepatozyten. Periportal = Abstand von 5 Zellen um Trias; zentrolobulär = Abstand von 5 Zellen um Zentralvene; mittlere Zone = Zellen, die dazwischen liegen.	KOLAJA et al. (1996c)
LI	BrdU-positive Zellen aus mind. 3000 Hepatozyten. Dreiteilung der Strecke Trias-Zentralvene und daraus sich ergebende Zonen 1, 2 und 3 (LZM = lobule-dependent zonal measurement).	BAHNEMANN und MELLERT (1997)

LI = Labelingindex, BrdU = s. Abkürzungen

2.5.4 Kontrollwerte der Zellproliferation in der Mäuseleber

2.5.4.1 B6C3F1 Maus

Tab. 6: Ermittelte Kontrollwerte proliferierender Zellen in der Leber männlicher B6C3F1 Mäuse

Methode	Alter	LI in %	Autoren
BrdU 2 h	10 Wochen	0,20	ELDRIDGE und GOLDSWORTHY (1996)
	20 Wochen	0,08	
BrdU 3 d	8 Wochen	0,11	ELDRIDGE et al. (1992)
	10 Wochen	0,69	ELDRIDGE et al. (1990)
	13 Wochen	0,17	ELDRIDGE et al. (1992)
BrdU 3,5 d	12 Wochen	1,00	LARSON et al. (1996)
	21 Wochen	0,50	
BrdU 6 d	11 Wochen	3,90	ELDRIDGE et al. (1990)
BrdU 7 d	keine Angabe	2,50	COUNTS et al. (1996)
	~28g KGW	3,63	CUNNINGHAM et al. (1994)
[³ H]Thymidin 7 d	9 Wochen	2,50	KOLAJA et al. (1996c)

LI = Labelingindex, h = Anzahl der Stunden, die eine BrdU-Gabe vor der Sektion appliziert wurde, d = Anzahl der Tage, die eine mit BrdU-oder [³H]Thymidin gefüllte Minipumpe appliziert wurde, KGW = Körpergewicht, BrdU = s. Abkürzungen

KOLAJA et al. (1996c) werteten Lebern von 9 Wochen alten B6C3F1 Mäusen zonal aus, nachdem den Tieren für 7 Tage eine mit [³H]Thymidin gefüllte Minipumpe implantiert wurde. Der LI lag für alle 3 Zonen im Bereich von 2,5 %, wobei eine nur sehr geringgradige Abnahme der Werte von der periportal Zone zur perivenösen Zone hin zu beobachten war. Die Kontrollwerte variierten je nach Applikationsform des Labels. Niedrigste Werte wurden mit der Pulse-Labeling-Methode erzielt (0,08 %) (ELDRIDGE und GOLDSWORTHY, 1996). Mit Verlängerung der BrdU-oder [³H]Thymidin-Verabreichung stiegen die LI an und lagen zwischen 2,5 und 3,9 % bei Verwendung einer 6- oder 7-Tage-Pumpe (ELDRIDGE et al., 1990; COUNTS et al., 1996). Mit zunehmendem Alter verringerten sich die LI (12 Wochen: 1,0 %; 21 Wochen 0,5 %) (LARSON et al., 1996). Bei der Verwendung von [³H]Thymidin ergaben sich vergleichbare Kontrollwerte (2,5 %) (KOLAJA et al., 1996c) wie bei der Verwendung von BrdU (2,5 %) (COUNTS et al., 1996).

2.5.4.2 C57BL Maus

Tab. 7: Ermittelte Kontrollwerte proliferierender Zellen in der Leber männlicher C57BL Mäuse

Methode	Alter	LI in %	Autoren
BrdU 7 d	Keine Angabe	4,50	COUNTS et al. (1996)
	6 Wochen	1,80	ORTON et al. (1996)
	10 Wochen	3,80	
	18 Wochen	0,33	

LI = Labelingindex, d = Anzahl der Tage, die eine mit BrdU-oder [³H]Thymidin gefüllte Minipumpe appliziert wurde, BrdU = s. Abkürzungen

Im Gegensatz zu den Kontrollwerten bei der B6C3F1 Maus liegen die LI hier höher (bis zu 4,5 % bei Benutzung einer 7-Tage-Pumpe) (COUNTS et al., 1996). Bei zwischen 6 und 18 Wochen alten Tieren findet sich das Maximum mit einem LI von 3,8 % bei 10 Wochen alten Mäusen (ORTON et al., 1996).

2.5.5 Bewertung von Labelingindizes

2.5.5.1 Zellzahl und Gruppengröße

Um die Varianz klein zu halten, sollten möglichst viele Zellen pro Schnitt ausgezählt werden, bei einer gleichzeitig großen Tierzahl pro Gruppe (möglichst > 10 Tiere) (MORRIS, 1993). Da die Anzahl der Tiere pro Gruppe einen stärkeren Einfluß auf die Varianz hat, sollte die Gruppengröße nicht zu Gunsten einer höheren Zellzahl verringert werden.

Bei einem LI von über 5 % konnte nach 3 ausgezählten Feldern (im Mittel 120 Zellen/Feld) keine Verringerung der Varianz erreicht werden, wenn noch Felder darüber hinaus ausgewertet wurden. Im Gegensatz dazu müssen in der Mäuseleber, wo die LI häufig unter 1 % liegen, deutlich mehr Felder und damit mehr Zellen ausgewertet werden oder es muß eine Mindestzahl an positiv markierten Zellen festgelegt werden, die ausgezählt werden soll (SOAMES et al., 1994).

2.5.5.2 Alter der Tiere

In den ersten 8-10 Lebenswochen kommt es durch das starke Größenwachstum der Organe zu hohen LI. Um Schwankungen in den Kontrolldaten zu vermeiden, sollten deshalb für Zellproliferationsstudien Tiere mit einem Mindestalter von 10-12 Wochen verwendet werden (GOLDSWORTHY et al., 1991).

2.5.5.3 Angaben zur Labelingindex-Steigerung

Wird ein Anstieg des LI bei behandelten Tieren als Vielfaches gegenüber den Kontrolltieren ausgedrückt, sollten auf jeden Fall die Varianz oder die Mittelwerte der Kontrolltiere mit angegeben werden. Bei niedrigen Kontrollwerten kann es zu hohen relativen LI-Steigerungen kommen, bei hohen Kontrollwerten besitzt dieser Faktor jedoch eine wesentlich stärkere Aussagekraft (MORRIS, 1993).

2.6 Prüfsubstanzen

2.6.1 Phenobarbital

Phenobarbital (PB), ein Barbitursäurederivat, wurde vielfach als Sedativum und zur Behandlung von Epilepsie eingesetzt. In der Veterinärmedizin findet es in dieser Form auch heute noch Verwendung (WHYSNER et al., 1996).

Sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen führt eine längerdauernde Gabe von Phenobarbital zur Entstehung von Lebertumoren (ROSSI et al., 1977; BUTLER, 1978; BECKER, 1982; EVANS et al., 1992). Es ist ein typischer Tumorpromoter in der Leber nach vorangegangener Initiation mit verschiedenen genotoxischen Substanzen (PERAINO et al., 1975; WARD et al., 1983; GOLDSWORTHY et al., 1984; DIWAN et al., 1986; PITOT et al., 1987; KOLAJA et al., 1996c). Phenobarbital besitzt ebenfalls eine promovierende Wirkung auf die Schilddrüse (HIASA et al., 1982; McCLAIN et al., 1989; KANNO et al., 1990). In Bakterien-Mutagenitätstests konnte keine mutagene Wirkung nachgewiesen werden (McCANN et al., 1975; MATSUSHIMA et al., 1985).

BECKER (1982) untersuchte die Tumoranfälligkeit verschiedener Mäusestämme nach Phenobarbital Behandlung. B6C3F1 und C57BL Mäuse erhielten hierbei 0,05 % Phenobarbital im Trinkwasser über 18 Monate. Die B6C3F1 Maus entwickelte zu 100 % Lebertumoren (Kontrolltiere 29 %), bei der C57BL Maus traten keine Tumoren auf. DIWAN et al. (1986) verabreichten der C57BL Maus 0,05 % Phenobarbital für bis zu 52 Wochen im Trinkwasser und konnten keine vermehrte Tumorentstehung feststellen. Auch EVANS et al. (1992) fanden keine statistisch signifikante Steigerung der Lebertumorinzidenz in der C57BL Maus nach einer bis zu 100-wöchigen Phenobarbitalgabe.

Die Lebern der mit Phenobarbital behandelten Tiere sind vergrößert, das relative Lebergewicht ist erhöht (LIN et al., 1989; CUNNINGHAM et al., 1991; EVANS et al., 1992; KOLAJA et al., 1996c). Histologisch fällt bei behandelten Tieren eine Hypertrophie und ausgeprägte Eosinophilie der perivenösen Hepatozyten auf (LIN et al., 1989; JIRTLE et al., 1991; EVANS et al., 1992). Ultrastrukturell ist in diesen Zellen eine deutliche Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums zu finden (CUNNINGHAM et al., 1991), und es zeigt sich eine deutliche Induktion mikrosomaler Enzyme, wie zum Beispiel des Cytochroms P450 (LAKE et al., 1986; LIN et al., 1989). Weiterhin kommt es zu einer zonal unterschiedlichen Verteilung von Zytokinen: ORTON et al. (1996) fanden nach 1-wöchiger Phenobarbitalgabe an C57BL Mäuse erhöhte Werte des Wachstumsfaktors „transforming

growth factor α “ (TGF α) und dem korrespondierenden Rezeptor „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) in zentrilobulären Hepatozyten. Dagegen war die Expression des transforming growth factor β 1 (TGF β 1), ein Inhibitor der Zellproliferation, in diesem Bereich erniedrigt.

In der Zellkultur findet nach Zusetzen von Phenobarbital bei Hepatozyten der B6C3F1 Maus eine Hemmung des über gap junctions vermittelten interzellulären Kontaktes statt (RUCH et al., 1987). Es kam hierbei zu einem deutlich geringeren Übertritt von [5-³H]Uridin von Zelle zu Zelle nachdem Phenobarbital zugegeben wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Hemmung der interzellulären Kommunikation unterbleibt jedoch bei Hepatozyten der C57BL Maus (KLAUNIG und RUCH, 1987).

2.6.1.1 Phenobarbital und Zellproliferation

Phenobarbital bewirkt in der Nagerleber eine Steigerung der Zellteilungsrate (WARD und OHSHIMA, 1985; SMITH et al., 1991; JONES und CLARKE, 1993). Bei 8 Wochen alten B6C3F1 Mäusen kam es nach Phenobarbitalgaben zu einer signifikanten Steigerung des LI über 28 Tage mit einem Maximum nach 7 Tagen. Nach 90 Tagen war der LI wieder auf Kontrollniveau gesunken (KOLAJA et al., 1996c). Bei der zonalen Verteilung fiel auf, daß der stärkste Anstieg des LI (> 6,5-fach) nach 7 Tagen perivenös zu finden war und über 28 Tage signifikant erhöht blieb.

SCHAFER und KLAUNIG (1991) behandelten männliche B6C3F1 Mäuse mit 500 mg Phenobarbital/l Trinkwasser. Nach 2 Wochen fand sich mit einer 15-fachen Erhöhung das Maximum der Zellproliferation. Nach 6 und 13 Wochen konnte keine behandlungsabhängige Steigerung der Zellproliferation mehr beobachtet werden.

COUNTS et al. (1996) verglichen die Wirkung von Phenobarbital auf die Zellproliferation in der Leber von B6C3F1 und C57BL Mäusen. Die Tiere erhielten 0,05 % Phenobarbital im Trinkwasser. Die LI wurden nach Einsatz einer 7-Tage BrdU-Pumpe ermittelt. Nach ein und zwei Wochen waren bei beiden Stämmen die LI signifikant erhöht. Das Maximum der LI fand sich nach einer Woche (B6C3F1: 7 %, > 2-fach über Kontrollwert; C57BL: 15 %, > 3-fach über Kontrollwert). Nach zwei Wochen waren die LI der B6C3F1 Maus 3-fach, die der C57BL 1,5-fach über die Kontrollwerte erhöht. Nach 4 Wochen fand sich bei beiden Stämmen keine signifikante Erhöhung mehr gegenüber den Kontrolltieren.

ORTON et al. (1996) verabreichte 5 Wochen alten C57BL Mäusen über 1, 4 und 13 Wochen Phenobarbital (2500 p.p.m. im Futter). Nach 1 Woche war der LI um das 12-fache erhöht, nach 4 Wochen lag er auf Kontrollniveau und nach 13 Wochen sogar geringfügig unter den

Kontrollwerten. Phenobarbital ruft somit eine transiente Steigerung des LI mit dem Maximum nach 1-2 Wochen hervor. Nach 4-6 Wochen befinden sich die LI wieder auf Kontrollniveau.

2.6.1.2 Phenobarbital und Apoptose

Bei Ratten kommt es unter Phenobarbitalbehandlung zu einer Hemmung der Apoptose sowohl im normalen als auch im präneoplastischen Lebergewebe (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1989). KOLAJA et al. (1996b) konnten die Hemmung der Apoptose auch in mit Diethylnitrosamin induzierten „foci“ der Mäuseleber bestätigen. Nach 60 Tagen Phenobarbitalgabe lag der Apoptoseindex in präneoplastischen Herden bei 0,18 % im Vergleich zu 0,65 % in „foci“ von Tieren, die kein Phenobarbital erhielten (B6C3F1 Maus). Ein Vergleich mit nicht-fokalem Lebergewebe wurde nicht durchgeführt.

2.6.2 Chloroform

Chloroform findet Verwendung in Pestiziden, als Lösungsmittel sowie als Anästhetikum. Ferner fallen in der Papierindustrie in Form chemischer Zwischenprodukte und bei der Wasseraufbereitung große Mengen Chloroform an (INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY, 1994).

Wird Chloroform über einen längeren Zeitraum (bis zu 2 Jahren) in einer Konzentration von 138 oder 277 mg/kg Körpergewicht (KGW)/Tag an männliche und 238 oder 477 mg/kg KGW/Tag an weibliche B6C3F1 Mäuse verabreicht, kommt es zur Entstehung von Lebertumoren (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1976). In der Niere männlicher Osborne Mendel Ratten kommt es nach Gaben von 90 oder 180 mg Chloroform/kg KGW/Tag zur Tumorentstehung (JORGENSEN et al., 1985). In niedrigen Dosen (60 mg/kg KGW/Tag) verursacht Chloroform Nierentumoren in männlichen ICI Mäusen, bei C57BL, CBA und CF/1 Mäusen kann jedoch keine Tumorentstehung beobachtet werden (ROE et al., 1979).

Die Verabreichungsform von Chloroform spielt bei der Tumorentstehung eine große Rolle: wird per Schlundsonde appliziert, erhöht sich die Lebertumorprävalenz in männlichen und weiblichen B6C3F1 Mäusen (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1976). Bei der Gabe von vergleichbaren Dosen an weibliche B6C3F1 Mäuse über das Trinkwasser kann keine vermehrte Tumorentstehung festgestellt werden (JORGENSEN et al., 1985). Chloroform besitzt weiterhin eine karzinogene Wirkung auf die Schilddrüse weiblicher Ratten (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1976).

Weder für Chloroform noch für seine Metaboliten konnte eine DNA-Reaktivität *in vitro* oder *in vivo* nachgewiesen werden (REITZ et al., 1982; VAN ABBE et al., 1982; LARSON et al., 1994b).

Unter Chloroformbehandlung kommt es zu einer dosisabhängigen Reduzierung des Körpergewichtes und einer Erhöhung des relativen Lebergewichtes (LARSON et al., 1994a; 1994c; 1994d; 1996).

Histomorphologische Veränderungen sind abhängig von der Applikationsform und der Dosis. Wird Chloroform per Schlundsonde oder per Inhalation an männliche oder weibliche B6C3F1 Mäuse verabreicht, kommt es zur Leberzellschädigung (LARSON et al., 1993; 1994a; 1994c; 1994d; 1996; PEREIRA, 1994). In geringen Dosen (34-90 mg/kg KGW/Tag per Schlundsonde oder bei einer Konzentration von 30 p.p.m. in der Atemluft) findet sich eine Schwellung sowie ein Verlust der Eosinophilie der perivenösen Hepatozyten; in den Zellen der Zone 2 findet sich eine geringe Vakuolisierung. Bei höheren Dosierungen (138-238 mg/kg KGW/Tag oder 100 p.p.m.) kommt es zu vereinzelt Nekrosen im perivenösen Bereich und Degenerationen mit Vakuolenbildung in Zone 2. In hohen Dosierungen (277-477 mg/kg KGW/Tag oder 300 p.p.m.) sind bis zu 50 % der Leber nekrotisch, es kommt zu konfluierenden, perivenösen Nekrosen mit Infiltration von Entzündungszellen; periportal und in der Zone 2 gelegene Zellen weisen eine starke vakuoläre Degeneration auf. Lebern männlicher Tiere weisen im Vergleich zu weiblichen Tieren schon bei geringeren Dosen diese Veränderungen auf.

Wird hingegen Chloroform im Trinkwasser in vergleichbaren Dosen (1800 p.p.m.) verabreicht, kommt es bei einigen Tieren nur zu einem geringen Verlust der Eosinophilie perivenöser Hepatozyten (LARSON et al., 1994d). PEREIRA (1994) fand 5 Tage nach der Chloroformgabe im Trinkwasser (bis zu 1800 p.p.m.) kleine Hepatozyten mit dichtem, basophilem Zytoplasma. Zu späteren Zeitpunkten konnten keine Abweichungen gegenüber Lebern der Kontrolltieren beobachtet werden.

PEREIRA und GROTHAUS (1997) verabreichten männlichen B6C3F1 Mäusen für 33 Tage Chloroform (1800 p.p.m.) über das Trinkwasser. Anschließend erhielten die Tiere für 3 Tage 263 mg Chloroform/kg KGW per Schlundsonde, worauf geringere histopathologische Veränderungen auftraten als bei Tieren, die Chloroform ausschließlich per Schlundsonde erhielten. GEMMA et al. (1996) konnten keine morphologischen Veränderungen in Lebern männlicher B6C3F1 Mäuse feststellen, die eine einmalige Gabe von 150 mg Chloroform/kg KGW per Schlundsonde erhielten. Allerdings waren die Serumwerte der Alanin-Amino-

Transferase (ALT) und der Sorbit-Dehydrogenase (SDH) deutlich erhöht, was auf eine Zellschädigung in der Leber hindeuten könnte.

PERICIN und THOMANN (1979) testeten die akute Toxizität von Chloroform durch Ermittlung der LD₅₀ (Letaldosis) bei verschiedenen Mäusestämmen. Die männliche C57BL Maus war von allen Stämmen am wenigsten anfällig für die letalen Effekte. HILL et al. (1975) fanden in C57BL Mäusen, die nach einer Chloroformgabe verstorben waren, perivenöse Nekrosen in der Leber sowie Tubulusnekrosen in der Niere.

Chloroform hat in vitro keinen Einfluß auf gap junctions in Hepatozyten der B6C3F1 Maus und scheint so die interzelluläre Kommunikation auf diesem Wege nicht zu stören (RUCH et al., 1987).

Die durch Chloroform induzierte Hepatotoxizität wird mit seiner Metabolisierung durch ein Cytochrom P450 in Verbindung gebracht (MANSUY et al., 1977; SMITH und HOOK, 1984). CONSTAN et al. (1999) zeigten, daß das Cytochrom P450 2E1 verantwortlich ist für die Bildung toxischer Metabolite in der Leber von B6C3F1 Mäusen nach Chloroform Exposition. In der Leber kommt es durch Biotransformation von Chloroform zur Bildung der toxischen Metabolite Phosgen und Salzsäure (MANSUY et al., 1977; POHL et al., 1977). Das entstandene Phosgen wird für die zytotoxische Wirkung des Chloroforms verantwortlich gemacht (SMITH et al., 1983; COWLEN et al., 1984). Das Ausmaß der Organschädigung scheint abhängig zu sein von der Menge der gebildeten toxischen Metaboliten und der Fähigkeit der Zelle, entstandene Schäden zu reparieren (CONOLLY und BUTTERWORTH, 1995). PEREIRA (1994) vertritt die Ansicht, daß es durch die Applikation per Schlundsonde zu sehr hohen Konzentrationen in der Leber kommt, denen die zellulären Entgiftungsmechanismen nicht gewachsen sind. Wird dagegen Chloroform kontinuierlich über das Trinkwasser aufgenommen fehlen diese Konzentrationsspitzen und dementsprechend die nekrotischen Veränderungen.

2.6.2.1 Chloroform und Zellproliferation

Verschiedene Studien demonstrieren, daß die toxisch bedingten Veränderungen in der Leber eine regenerative Zellproliferation hervorrufen, es aber zu keiner Erhöhung des LI kommt, wenn eine Schädigung der Zellen unterbleibt. LARSON et al. (1994d) und PEREIRA (1994) zeigten, daß erst in Dosierungen, in denen Leberzellveränderungen auftraten, es zu einer Steigerung des LI in Abhängigkeit der verabreichten Dosis kam. Bei Tieren, die Chloroform

im Trinkwasser erhielten, fanden sich keine erhöhten LI. Der LI war im Gegenteil nach 4 Tagen gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigt.

Bei 9 Wochen alten männlichen B6C3F1 Mäusen fand sich ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung des LI bei Chloroformgaben per Schlundsonde über 4 Tage oder 3 Wochen (LARSON et al., 1994a). Die Maxima der LI (30,3 % und 29,3 % gemessen mit einer 3,5 Tage BrdU-Pumpe) lagen zu beiden Zeitpunkten in der höchsten Dosisgruppe (277 mg/kg KGW/Tag).

GEMMA et al. (1996) konnten im Gegensatz dazu in männlichen B6C3F1 Mäusen keine morphologischen Veränderungen nach einer einmaligen Gabe von 150 mg Chloroform/kg KGW feststellen, fand jedoch eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate nach 24 und 48 h. Die Serumwerte von ALT und SDH waren jedoch deutlich erhöht, was auf eine histomorphologisch noch nicht sichtbare Zellschädigung der Hepatozyten hindeuten könnte.

Nach einmaliger Chloroform-Applikation befanden sich nach 48 h die meisten Hepatozyten in der S-Phase (LARSON et al., 1993; GEMMA et al., 1996).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse gehen viele Autoren bei Chloroform von einem zytotoxischen Mechanismus aus. Darauf folgend kommt es zu einer regenerativen Zellproliferation, welche zur Tumorentstehung führt (REITZ et al., 1982; REITZ et al., 1990; BUTTERWORTH et al., 1995).

2.6.2.2 Chloroform und Apoptose

Bei Fischer-344 Ratten fand sich nach Verabreichung einer Mischung von Grundwasser-Verunreinigungen, die unter anderem auch Chloroform enthielt, nach einmonatiger Behandlung eine geringgradig gesteigerte Apoptoserate (CONSTAN et al., 1996). Aufgrund der verschiedenen Substanzen konnte die Steigerung der Apoptose nicht eindeutig der Wirkung des Chloroforms zugeordnet werden. Die Autoren gingen von einer kompensatorisch erhöhten Apoptoserate in Folge der gesteigerten Zellproliferation aus.

GUASTADISEGNI et al. (1999) fanden in Lebern von Sprague-Dawley Ratten elektronenmikroskopische Änderungen an Mitochondrien nachdem den Tieren Chloroform in unterschiedlichen Dosen verabreicht wurde. Es kam zu einem Anschwellen der Mitochondrien bis hin zur Entstehung von Megamitochondrien. Ab einer Dosierung von 300 mg Chloroform/kg KGW konnte Zelltod in Form von Nekrose und Apoptose beobachtet werden.

Einige Autoren beobachteten jedoch ausschließlich das Auftreten von Nekrosen bei mit Chloroform-behandelten Mäusen (HILL et al., 1975; LARSON et al., 1993; 1994a; 1994c; 1994d; 1996; PEREIRA, 1994)

2.6.3 Wyeth 14,643

Wyeth 14,643 ([4-Chloro-6(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]azetat) gehört zur Gruppe der Peroxisomenproliferatoren (PP). Diese Stoffe finden vor allem als Weichmacher, Herbizide, Lösungsmittel und Lipidsenker Verwendung (REDDY und LAWANI, 1983; MARSMAN et al., 1988; EACHO et al., 1991). Sie führen zu einer starken Vermehrung und Vergrößerung der Peroxisomen in den Lebern behandelter Tiere (LOCK et al., 1989). Unter physiologischen Bedingungen nehmen Peroxisomen ca. 2 % des Zytoplasmavolumens ein (REDDY und LAWANI, 1983); nach der Behandlung mit PP können die Peroxisomen bis zu 25 % des Zytoplasmavolumens einnehmen (KOLDE et al., 1976; MOODY und REDDY, 1976). Dadurch kommt es zu einer Vergrößerung der Leber in Folge von Hepatozytenhypertrophie und -hyperplasie sowie zu einer transkriptionalen Erhöhung von Enzymen, die in den Fettsäurestoffwechsel eingreifen. Bei Mäusen kommt es zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung der Carnitinacetyltransferase im Zusammenhang mit einem gesteigerten Metabolismus von Acetylcoenzym A (Acetyl-CoA) sowie zu einer Senkung der Serumspiegel von Cholesterol und Triglyzeriden (REDDY et al., 1977; MOODY und REDDY, 1978).

Gaben von PP führen zur Entstehung von Lebertumoren bei Ratten und Mäusen (LAWANI et al., 1982; REDDY und LAWANI, 1983; RAO et al., 1988b). ISENBERG et al. (1997) initiierte B6C3F1 Mäuse mit Diethylnitrosamin (DEN) und fand in anschließend mit Wyeth 14,643 behandelten Tieren eine höhere Tumorprävalenz als in den ausschließlich initiierten Kontrolltieren. Für Wyeth 14,643 liegen keine Daten zur kanzerogenen Wirkung bei den von uns benutzten, nicht initiierten Mäusestämmen vor. REDDY et al. (1979) verabreichten Wyeth 14,643 in Konzentrationen von 0,05-0,1 % für bis zu 16 Monate an CS^b Mäuse und F344 Ratten. Sie stellten in beiden Spezies bei allen Tieren Lebertumoren fest. Bei den Kontrollgruppen kam es dagegen nicht zu einer Entstehung von Tumoren. Die PP erweisen sich im Salmonella-Mutagenitätstest als nicht mutagen und es kann auch keine Bindung an die DNA oder deren Schädigung beobachtet werden (WARREN et al., 1980; GOEL et al., 1985).

Der Mechanismus der Tumorentstehung ist bis jetzt noch nicht entgültig geklärt (REDDY und LAWANI, 1983). Es bestehen jedoch verschiedene Hypothesen: aufgrund der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren, hervorgerufen durch PP, kommt es zu einer starken Bildung von

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (REDDY und RAO, 1989). Die H_2O_2 -abbauenden Enzyme (z. B. Katalase) sind nur wenig erhöht, wodurch es zu einem Überschuß an H_2O_2 kommt, dem sogenannten oxidativen Streß (s. 2.2.3) (REDDY und RAO, 1986). Infolge des oxidativen Stresses kann es entweder direkt oder durch die Peroxidation von Lipiden zu DNA-Schäden kommen (CERUTTI, 1985; MACHLIN und BENDICH, 1987; OLSON, 1988).

Eine Rezeptor-vermittelte Reaktion stellt einen weiteren möglichen Wirkmechanismus dar. Es wurden Mitglieder der Familie der Steroidhormonrezeptoren identifiziert, welche durch PP aktiviert werden können (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) (ISSEMAN und GREEN, 1990). Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es bei Ratten und Mäusen zu einer veränderten Expression von PPAR-Zielgenen und so zu Störungen im Zellzyklus, wodurch ihre karzinogene Wirkung erklärt wird (PETERS et al., 1998; ANDERSON, et al., 1999). Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß Mäuse, denen genotypisch der PPAR-Rezeptor fehlt, unter einer Behandlung mit Wyeth 14,643 weder gesteigerte LI zeigten noch, im Unterschied zu den PPAR tragenden Wildtypen, Tumoren entwickelten (LEE et al., 1995; PETERS et al., 1997).

Andere Autoren machen die erhöhte Zellproliferation für die Tumorentstehung verantwortlich. So zeigten MARSMAN et al. (1988) an Ratten, daß sowohl Wyeth 14,643 als auch Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) eine gleichartige Peroxisomenproliferation induzieren. Zur Entwicklung von Tumoren kommt es allerdings nur unter Wyeth 14,643-Gaben. Hier waren die LI anhaltend um das 5 bis 10-fache erhöht, wohingegen es unter der DEHP-Behandlung zu keiner anhaltend gesteigerten Zellteilungsrate kam. Werden B6C3F1 Mäuse gleichzeitig mit Wyeth 14,643 und dem Antikarzinogen Rotenon behandelt, sind sowohl der LI als auch die Entstehung von Tumoren signifikant niedriger als bei den allein mit Wyeth 14,643 behandelten Tieren (CUNNINGHAM et al., 1995; ISENBERG et al., 1997).

ROSE et al. (1997) machen aktivierte Kupffersche Sternzellen für den mitogenen Effekt der PP in der Leber verantwortlich. Kupffersche Sternzellen enthalten große Mengen an mitogen wirksamen Zytokinen, wie z. B. Tumor Nekrose Faktor α ($TNF\alpha$) (DECKER, 1990; BOJES et al., 1997). Werden Kupffersche Sternzellen durch Wyeth 14,643 aktiviert, kommt es zu einem deutlichen Anstieg von $TNF\alpha$ und somit zur vermehrten DNA-Synthese in Hepatozyten (ROSE et al., 1997). Werden die Kupfferschen Sternzellen jedoch vor der Wyeth 14,643-Gabe mit der nicht verstoffwechselbaren Fettsäure Methylpalmitat inaktiviert, kann kein durch Wyeth 14,643 hervorgerufener mitogener Effekt beobachtet werden (ROSE et al., 1997).

Bei der Verabreichung von Wyeth 14,643 an B6C3F1 und C57BL Mäusen kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des absoluten sowie auch des relativen Lebergewichtes (LANIER et al., 1989; ELDRIDGE et al., 1990; LUNDGREN et al., 1990; ISENBERG et al., 1997). In Lebern von Swiss-Webster Mäusen kommt es nach der Behandlung mit Wyeth 14,643 ebenfalls zu einem deutlich erhöhten relativen Organgewicht (REDDY et al., 1977; MOODY und REDDY, 1978). Die Hepatozyten erscheinen vergrößert und enthalten zahlreiche eosinophile Granula. Ultrastrukturell fällt die stark erhöhte Anzahl an Peroxisomen und eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums auf (MOODY und REDDY, 1978).

2.6.3.1 Wyeth 14,643 und Zellproliferation

CUNNINGHAM et al. (1995) behandelten männliche B6C3F1 Mäuse (keine Altersangabe) über 7 Tage mit 100 p.p.m. Wyeth 14,643 im Futter und implantierten den Tieren zur selben Zeit eine 7-Tage osmotische Minipumpe, die mit BrdU gefüllt war. Der LI lag bei 67,6 % und war auf mehr als das 4-fache über die Kontrollwerte erhöht.

ELDRIDGE et al. (1990) verabreichten Wyeth 14,643 in einer Konzentration von 0,1 % über 5 Tage im Futter an 10 Wochen alte, männliche B6C3F1 Mäuse. Der LI wurde nach Einsatz einer 6-Tage BrdU-Minipumpe ermittelt und lag bei 28 %; dies entsprach ebenfalls einer 4-fachen Steigerung. Die markierten Zellen wiesen kein zonales Verteilungsmuster auf, im Gegensatz zur ebenso behandelten F344 Ratte, die ein periportales Labelingmuster zeigte. SMITH et al. (1991) fanden ebenfalls ein panlobuläres Verteilungsmuster der markierten Zellen bei CD-1 Mäusen und das Vorkommen von markierten Zellen vor allem im periportalen Bereich bei SD Ratten. Die Tiere wurden über 1 oder 5 Wochen mit 0,1 % Wyeth 14,643 im Futter behandelt und es wurde eine BrdU-gefüllte Minipumpe 7 Tage vor der Tötung implantiert. Männliche Mäuse wiesen einen LI von 40 % nach 1 und 60 % nach 5 Wochen auf. Die LI der Kontrolltiere lagen zu beiden Zeitpunkten bei ca. 3 %.

Bei weiblichen B6C3F1 Mäusen, die ebenfalls mit 0,1 % Wyeth 14,643 über das Futter für 5 Tage behandelt wurden und an den Tagen 2 bis 5 jeweils eine einmalige i. p. Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht BrdU erhielten, fand sich ein 14-fach höherer LI bei den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle (LANIER et al., 1989).

Wyeth 14,643 ruft somit in Mäusen anhaltend erhöhte LI (ermittelt bis zu 5 Wochen) hervor.

2.3.6.2 Wyeth 14,643 und Apoptose

Als weiterer kanzerogener Wirkmechanismus der PP wird eine Hemmung der Apoptose diskutiert. In den Lebern von Ratten, sowie in Zellkulturen von Mäuse- und Rattenhepatozyten konnte eine Verringerung der Apoptoserate in Folge von PP-Gaben nachgewiesen werden (BAYLY et al., 1994; ROBERTS et al., 1995; JAMES und ROBERTS, 1996).

MARSMAN et al. (1992) fanden jedoch in Ratten nach der Gabe von Wyeth 14,643 über 22 Wochen eine erhöhte Apoptoserate. ISENBERG et al. (1997) konnten in mit Diethylnitrosamin (DEN) initiierten B6C3F1 Mäusen sowohl im fokalen als auch im nicht-fokalen Lebergewebe nach Wyeth 14,643-Gaben ebenfalls einen Anstieg der Apoptoserate nachweisen.

Initiierte Zellen sollen jedoch eine selektive Resistenz gegenüber Apoptosesignalen aufweisen (SCHULTE-HERMANN et al., 1990; KOLAJA et al., 1996b). Im Fall von Wyeth 14,643 schrieben MARSMAN und BARRETT (1994) apoptoseresistenten Hepatozyten einen doppelten Wachstumsvorteil zu: eine passive Resistenz gegenüber induziertem Zelluntergang und eine vermehrte Zellteilung dieser resistenten Zellen, um den Verlust der umgebenden Zellen auszugleichen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

Es wurden je 180 männliche B6C3F1 und C57BL/6 Mäuse (Centre d'Élevage R. Janvier, Frankreich) eingesetzt. Bei Ankunft waren die Tiere 8 Wochen alt und gewöhnten sich in einer 2-wöchigen Adaptationsperiode an die Umgebungsbedingungen.

3.1.2 Haltungsbedingungen

Die Mäuse wurden einzeln in Makrolonkäfigen, Typ MI (Becker und Co., Castrop-Rauxel) gehalten. Die Räum waren zentral klimatisiert mit einem Temperaturbereich von 20-24° C und einer Luftfeuchte von 30-70 %. Es herrschte ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Den Tieren stand Futter (Kliba-Haltungsdiät, Firma Kliba Mühlen, Schweiz) und Trinkwasser ad libitum zur Verfügung.

3.1.3 Randomisierung

Die Tiere wurden vor Studienbeginn auf Gruppen zu je 10 Tiere verteilt. Die Liste der Randomisierungsanweisungen wurde mit einem Personal Computer erstellt (Labordatenverarbeitung, BASF AG). Die Mäuse wurden mit fortlaufenden Nummern durch eine Ohrtätowierung gekennzeichnet.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Dosisgruppen

Die Tiere beider Mäusestämme wurden in je 3 unbehandelte Kontrollgruppen (á 30 Tiere) und 3 mit Substanz behandelte Gruppen (á 30 Tiere) aufgeteilt. Die Tiere wurden 1, 4 und 13 Wochen nach Versuchsbeginn getötet (jeweils 10 Tiere/Gruppe).

Tab. 8: Mäusestamm, Substanz und Applikation

Stamm	Substanz	Dosis	Art der Applikation	Frequenz der Applikation	Vehikel
B6C3F1	Phenobarbital	500 ppm	oral	täglich	Futter
B6C3F1	Chloroform	120 mg/kg KGW	via Schlundsonde	5 x pro Woche	10 ml/kg KGW Olivenöl DAB
B6C3F1	Wyeth 14,643	100 ppm	oral	täglich	Futter
C57BL	Phenobarbital	500 ppm	oral	täglich	Futter
C57BL	Chloroform	238-120* mg/kg KGW	via Schlundsonde	5 x pro Woche	10 ml/kg KGW Olivenöl DAB
C57BL	Wyeth 14,643	100 ppm	oral	täglich	Futter

KGW = Körpergewicht

*nach dem Tod von 3 Tieren wurde die Dosis auf 160 mg/kg KGW und nach dem Tod von 2 weiteren Tieren auf 120 mg/kg KGW reduziert.

Den ersten Kontrollgruppen (Kontrolle 1) beider Stämme wurde 2 h vor der Tötung 100 mg 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) pro kg Körpergewicht in physiologischer Kochsalzlösung (20 mg/ml) intraperitoneal injiziert.

Den zweiten Kontrollgruppen (Kontrolle 2) wurde am 3. Tag vor der Tötung, den verbleibenden Kontrollgruppen (Kontrolle 3) und den behandelten Gruppen am 7. Tag vor der Tötung unter Methoxyfluran-Narkose (Metofane[®], Janssen Cilag GmbH, Neuss) eine osmotische Minipumpe (Alzet Osmotic Pump, Modell 2001, Alza Corporation, Palo Alto, USA) subcutan im Lendenbereich implantiert. Die Minipumpen wurden zuvor mit 200 µl physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, die BrdU in einer Konzentration von 20 mg/ml enthielt. Der kontinuierliche Ausfluß aus der Pumpe betrug 1 µl/h.

Tab. 9: Pumpenverweildauern bei beiden Mäusestämmen vor der Tötung

Behandlungsdauer	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Phenobarbital	Chloroform	Wyeth 14,643
1 Woche	2 h i.p. Injektion	3 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe
4 Wochen	2 h i.p. Injektion	3 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe
13 Wochen	2 h i.p. Injektion	3 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe	7 d-Pumpe

i.p. = intraperitoneal, d = Tag

3.3 Histopathologische Aufarbeitung

3.3.1 Sektion

Zur Organentnahme wurden die Tiere unter CO₂-Narkose dekapitiert. Nach Entblutung wurden die Tiere sezirt sowie die Lebern entnommen und gewogen.

3.3.2 Fixierung und Trimmen der Organe

Aus dem Lobus dexter lateralis und dem Lobus dexter medialis der Leber wurden sofort nach der Sektion ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Leberscheiben wurden zusammen mit einer ca. 2 mm langen Dünndarmprobe in einer Einbettungskapsel zusammengebracht und für 24 bis 48 Stunden in 4 % Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Gewebeprobe in 70 % Ethanollösung überführt und dort für mindestens 24 Stunden belassen.

3.3.3 Einbetten der Organe

Die Gewebeprobe wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 70 %, 2 x 96 % und 2 x 100 %) sowie in reinem Xylol (2 x) entwässert und entfettet. In einem Einbettautomaten (Shandon 2L Prozessor MK II) wurden die Proben bei 60° C in Paraplast eingebettet.

3.3.4 Schneiden der Paraffinblöcke

Die Paraffinblöcke wurden auf -2° C gekühlt und mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM 355) wurden 3-4 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS, Sigma) beschichtet waren. Von jedem Block wurden mindestens 5 Schnitte angefertigt, die für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung, eine immunhistologische BrdU-Färbung, sowie als Reserve und zur Etablierung von Inkubationsprotokollen verwandt wurden. Bei jedem Färbedurchlauf wurde pro Tier ein Schnitt als Negativkontrolle mit Kontrollantikörper Super Sensitive Negative Control HK 119-7M (BioGenex) anstelle des primären Antikörpers 247-5M (BioGenex) inkubiert.

3.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für 10 Minuten. Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 100 %, 96 % und 70 % Ethanol).
- Färben mit Hämatoxylin nach Ehrlich (sauer) für 3 Minuten.

- Kurzes Eintauchen in fließendes Leitungswasser zum Bläuen der Kerne.
- Eintauchen in Differenzierungsmedium (0,5 % Salzsäure in 70 % Alkohol) für 5 Sekunden, wässern in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten.
- Gegenfärben in Eosin für 1 Minute.
- Eintauchen in Differenzierungsmedium (0,1 % Essigsäure) für 5 Sekunden.
- Dehydrieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 %) mit abschließendem Xylolbad.
- Eindecken der Schnitte mit Eindeckmedium Pertex im Eindeckautomaten Promounter RCM 90.

3.3.6 Immunhistologische Färbung

3.3.6.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für 2 x 5 Minuten.
- Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe (je 2 x 5 Minuten in 100 %, 96 % und 70 % Ethanol).
- Wässern in destilliertem Wasser und PBS (0,1 M, pH 7,4, BioGenex) für je 5 Minuten.

3.3.6.2 Antigen-Retrieval

- Vorverdauung in 0,1 % Protease P6911 (Sigma) in PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex) für 2 Minuten bei 37° C.
- Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils einige Sekunden (2x).
- Hydrolyse in 4 N Salzsäure (pH 0,8) für 30 Minuten.
- Waschen in destilliertem Wasser für jeweils einige Sekunden (4x).

3.3.6.3 Immunhistologisches Färbeprotokoll

- Zur Verkleinerung der Fläche, die mit Antikörper benetzt werden soll, wird das Organ mit einem Fettstift umfahren (Pap-Pen, Biogenex XT001 PP).
- Einsetzen der Schnitte in eine feuchte Kammer.
- Waschen mit PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex) für 5 Minuten.
- Absaugen des Puffers.

- Auftragen von 300 µl des primären Antikörpers Mouse-anti-BrdU (Verdünnung 1:800, 247-5M, BioGenex). Inkubation bei + 4° C für 24 Stunden.
- Umsetzen der Schnitte in ein automatisches Färbegerät (OptiMax™ Automated Cell Staining System, BioGenex). Einfüllen der errechneten Volumina der verwendeten Lösungen (300 µl/Schnitt) vor jedem Durchlauf.
- Waschen mit PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex) für einige Sekunden.
- Auftragen des sekundären Antikörpers Multilink Anti-Ig for Mouse, Rabbit, Guinea Pig and Rat Antibodies HK 268-UK (Verdünnung 1:20, BioGenex) und Inkubation für 20 Minuten.
- Waschen mit PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex).
- Auftragen des Alkalische-Phosphatase-konjugierten Streptavidins in PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex, Verdünnung 1:20, BioGenex, LSAB-Methode: labeled streptavidin-biotin) und Inkubation für 20 Minuten.
- Waschen mit PBS (0,1 M, pH 7,4, Biogenex) für einige Sekunden.
- Herausnehmen der Schnitte aus dem Färbeautomaten. Lösen einer Tablette Chromogens Fast Red (5 mg) in Naphthol-Phosphat und Tris-Puffer (5 ml) (BioGenex) nach Anweisung des Herstellers. Fast Red ist in Lösung instabil und muß deshalb vor jeder Anwendung unmittelbar frisch angesetzt werden.
- Auftragen von je 300 µl der Fast Red Lösung für 5-10 Minuten. Die Zeitspanne, die das Chromogen auf den Organschnitten belassen wurde, richtete sich nach dem Grad der Anfärbung, die mikroskopisch kontrolliert wurde.
- Waschen mit destilliertem Wasser für einige Sekunden.
- Gegenfärben mit Hämatoxylin nach Mayer für 5 Minuten.
- Bläuen in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten.
- Eindecken mit erwärmter (45° C) Kaisers Glyceringelatine und Deckgläschen.
- Versiegeln der Deckgläschen mit Pertex-Eindeckmedium nach 24 Stunden.

3.4 Auswertung der immunhistologischen Schnitte

3.4.1 Hilfsmittel der Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines rechnergestützten Bildanalyse-Systems der Firma Zeiss (Axioskop 2, KS 400/3.0, Farbkamera Sony 3CCD Typ MC-3250, INTEL Pentium II). Das Okular vergrößerte 20-fach und das Objektiv 10-fach, das heißt, es wurde mit einer 200-fachen Vergrößerung gearbeitet. Zur Bildbearbeitung wurde das Programm „Prolcount.MCR“ der Firma Zeiss Vision verwendet.

3.4.2 Auswertestrategien

Pro Tier wurden 2 verschiedene Leberlappen untersucht, um eine genügend große Anzahl an auswertbaren Meßfeldern und eine bessere Repräsentation der gesamten Leber zu erhalten. In jedem Leberlappen wurden 5 Areale (mit Portalgefäßen und Zentralvene) gewählt, die in 3 Meßfelder mit je ca. 100 Zellen unterteilt wurden. Insgesamt wurden so ca. 3000 Zellen pro Tier ausgezählt. Die Unterteilung der Meßfelder erfolgte nach der lobule-dependent zonal measurement Methode (LZM; BAHNEMANN und MELLERT, 1997). Hierbei wurde die Strecke zwischen Portalgefäßen und Zentralvene in drei gleich große Abschnitte geteilt (Zone 1, Zone 2 und Zone 3). Zone 1 ist hierbei portalnahe, Zone 3 liegt venennah und Zone 2 in der Mitte zwischen den Gefäßen. Die drei Zonen wurden am Bildschirm umfahren und so die zu messenden Abschnitte festgelegt. Der durchschnittliche Abstand zwischen Portalgefäß und Zentralvene betrug 350 µm.

BrdU-positive Zellkerne konnten durch den inkorporierten roten Farbstoff detektiert werden. BrdU-negative Zellkerne stellten sich auf Grund der Gegenfärbung blau dar.

Um repräsentative Werte zu erhalten, wurden die Lebern von 10 Mäusen pro Gruppe ausgewertet.

3.4.2.1 S-Phasen-Response

Zur Bestimmung des Labelingindex (LI) wurden sowohl BrdU-positive (Hepatozyten in S-Phase) als auch die BrdU-negative Hepatozyten gezählt. Der Labelingindex wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{LI (\%)} = \frac{\text{positive Zellen}}{\text{positive + negative Zellen}} \times 100$$

Der Gesamtlabelingindex (Gesamt-LI) berechnete sich aus dem Anteil der positiven Zellen aller 3 Zonen an der Gesamtzellzahl.

3.4.2.2 Mitoseindex

Der LI ist ein Indikator für Zellen in der S-Phase. Zur Kontrolle ob die markierten Zellen anschließend die Mitose-Phase durchlaufen, wurde der Mitoseindex (MI) bestimmt. Die lichtmikroskopische Auswertung (Axioskop, Zeiss) erfolgte ebenfalls bei einer 200-fachen Vergrößerung am Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitt. Bei fraglichen Strukturen wurde zur Überprüfung der Mitosefigur eine Kontrolle bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Wie schon bei der Bestimmung des LI wurden je Leberlappen 5 Areale mit je 3 Meßfeldern (Zone 1, Zone 2 und Zone 3) zwischen Portalfeld und Zentralvene gewählt. Der Mitoseindex (MI) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{MI (\%)} = \frac{\text{Mitosefiguren}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Da die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten und immunhistologischen Schnitte in Serie hergestellt wurden und wir somit von einer annähernd gleichen Zellverteilung und -zahl ausgingen, wurde die Gesamtzellzahl zur Vereinfachung aus der Berechnung des LI übernommen. Hierbei wurde entweder die Zellzahl der einzelnen Zonen oder die Zellzahl aus der Berechnung des Gesamt-LI zur Bestimmung der zonalen MI oder des Gesamt-MI verwendet.

3.4.2.3 Apoptoseindex

Zur Überprüfung eines Effektes der Substanzen auf die Apoptoserate wurden nach demselben Schema, das zur Mitoseauswertung (s. 3.4.2.3) angewandt wurde, auch apoptotische Zellen in Form von Apoptosekörperchen im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitt gezählt. Die apoptotischen Körperchen wurden anhand morphologischer Kriterien im Lichtmikroskop detektiert (s. 2.1.4). In Gruppen liegende apoptotische Körperchen wurden als einzelnes Ereignis gewertet, da deren Ursprung aus einer Zelle angenommen wird (BURSCH et al., 1985; GOLDSWORTHY et al., 1996). Der Apoptoseindex (AI) wurde wie folgt berechnet:

$$\text{AI (\%)} = \frac{\text{apoptotische Körperchen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Die Gesamtzellzahl wurde zur Vereinfachung aus der Berechnung des LI übernommen (s. 3.4.2.2). Hierbei wurde entweder die Zellzahl der einzelnen Zonen oder die Zellzahl aus der Berechnung des Gesamt-LI zur Bestimmung des zonalen AI oder Gesamt-AI verwendet.

3.4.3 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung erfolgte mit Ausnahme der Daten der Körper- und Lebergewichte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMPD/Dynamic, Release 7.0 durchgeführt. Die graphischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT, Version 2.0 erzeugt.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, das heißt Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.4.3.1 Vergleich der Pumpenzeiten sowie der Mitose- und Apoptoseindizes

Bei den semiquantitativen Variablen der unterschiedlichen Pumpenverweildauern erfolgte die Datenbeschreibung durch die Angabe der Mediane (\tilde{x}) und der Quartile (Q1 und Q3). Zur statistischen Prüfung kam aufgrund der semiquantitativen Merkmale der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz.

3.4.3.2 Vergleich der zonalen und totalen Zellproliferation der behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe

Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Daten wurde eine logarithmische Transformation durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten (\bar{x}_g) und der Streufaktoren (SF) vorgenommen. Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Zeiteinflusses wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Da statistisch signifikante Unterschiede und Wechselwirkungen auftraten, wurden die Gruppen mit den Kontrollen im Anschluß paarweise getrennt nach Behandlungszeitpunkten mit dem Dunnett-Test verglichen.

3.4.3.3 Körper- und Lebergewichte

Die Auswertung der Körper- sowie der relativen und absoluten Lebergewichte wurde auf Rechnern der Abteilung Toxikologie der BASF AG im Rahmen von Zellproliferationsstudien (S-Phasen-Response-Studien) durchgeführt. Zur Datenbeschreibung wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) berechnet. Die behandelten Gruppen wurden mit den unbehandelten Kontrollgruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test und im Anschluß paarweise mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test verglichen. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau wie oben zugrunde gelegt (s.3.4.3).

4 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, die zonale Zellproliferation in der Leber unbehandelter Mäuse zweier unterschiedlich tumoranfälliger Mäusestämme zu untersuchen, sowie den Einfluß dreier nicht-genotoxischer Substanzen (Phenobarbital, Chloroform und Wyeth 14,643) auf die Zellteilungsrate zu ermitteln und zu bewerten. Zuvor sollte die optimale Verweildauer einer osmotischen Minipumpe zur immunhistologischen Ermittlung des S-Phasen-Response in der Leber von Mäusen etabliert werden. Das vorliegende Material stammt aus Studien der Abteilung Toxikologie der BASF-AG.

Der S-Phasen-Response wurde für beide Stämme zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Es wurde in 3 verschiedenen Zonen ausgewertet, um etwaige zonale Unterschiede sowohl in der unbehandelten Leber als auch als substanzbedingte Veränderungen detektieren zu können. Zusätzlich wurde, ebenfalls zonal, die Mitose- und Apoptoserate bestimmt. Die Mitoserate wurde untersucht, um die Messung des S-Phasen-Response zu validieren. Bei der Apoptose, dem für die Nettoproliferation wesentlichen Gegenspieler der Zellteilung, interessierte der Einfluß der verschiedenen Substanzen auf die Apoptoserate.

Die Einzeltierdaten befinden sich im Anhang in den Tabellen 22-105.

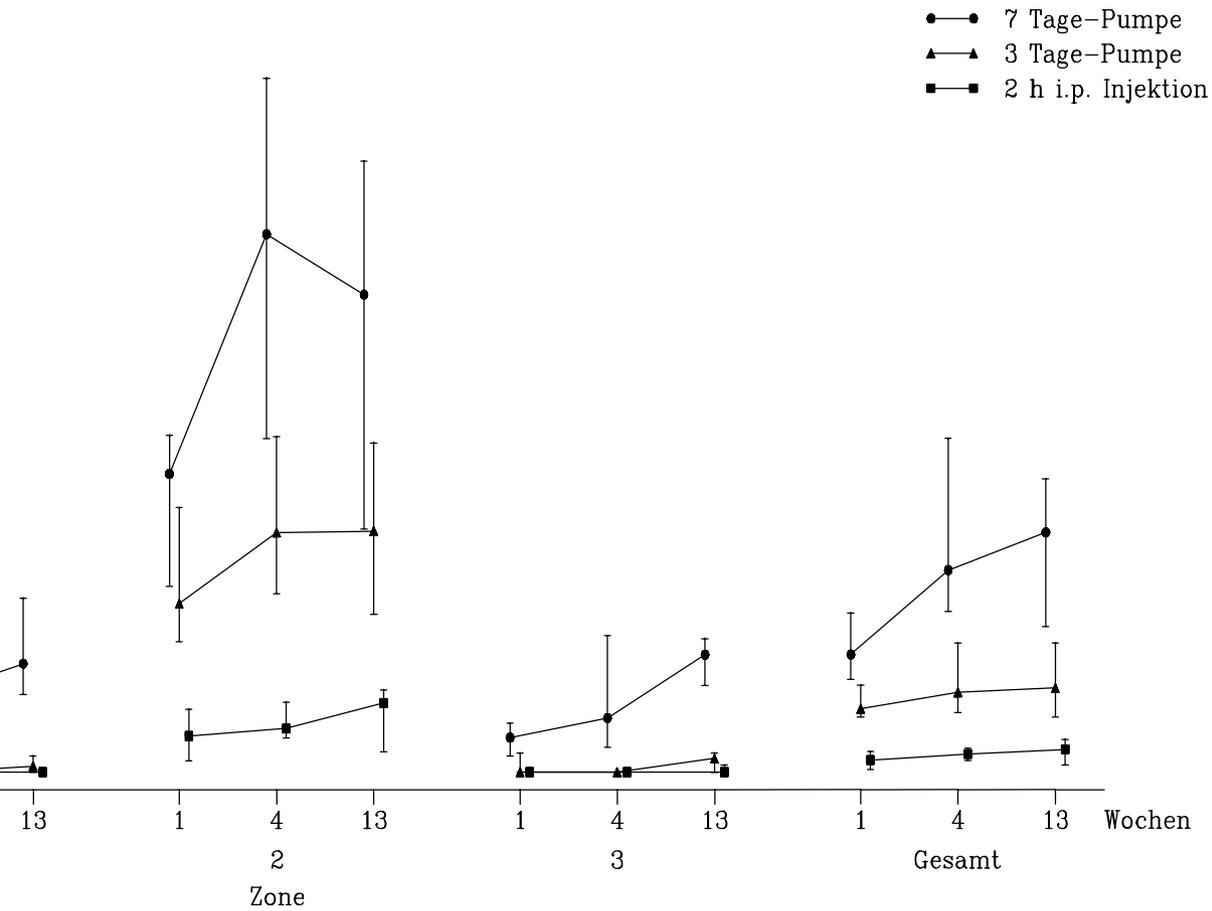
4.1 Pumpenzeiten

Um die am besten geeignete Methode für die Detektion sich teilender Zellen in der Leber zu evaluieren, wurden je Mäusestamm 90 männliche Tiere (zu Versuchsbeginn 10 Wochen alt) eingesetzt. Die Tiere erhielten über die gesamte Versuchsdauer das BASF AG-übliche Diätfuttermittel. Zur Ermittlung des S-Phasen-Response wurden je 10 Tieren 7 Tage (Kontrollgruppe 3) bzw. 3 Tage (Kontrollgruppe 2) vor der Tötung eine mit BrdU gefüllte osmotische Minipumpe subcutan implantiert, die letzte Gruppe erhielt eine intraperitoneale BrdU-Injektion 2 Stunden vor der Tötung (Kontrollgruppe 1).

4.1.1 B6C3F1 Maus

4.1.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

Die Tiere zeigten weder makroskopisch noch histologisch Leberveränderungen.



tunde, i. p. = intraperitoneal, Wochen = Versuchsdauer, 7 Tage-Pumpe = BrdU-Applikation via osmotischer Minipumpe
 3), 3 Tage-Pumpe = BrdU-Applikation via osmotischer Minipumpe über 3 Tage (Kontrolle 2), 2 h i. p. Injektion =
 on von BrdU 2 h vor der Tötung (Kontrolle 1)

res (%) (Mediane sowie 1. und 3. Quartil) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der B6C3F1 Maus
 langer BrdU-Applikation

Woche	1	4	13
Zone 1	** °	** °°	** °°
Zone 2	**	**	**
Zone 3	**	** °°	** °°
Gesamt	**	**	** °

Signifikanzen zu Abb. 1:

** statistisch signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe 1 gegenüber der Kontrollgruppe 3
 °° und ° statistisch signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe 2 gegenüber der Kontrollgruppe 3
 mit ** und °° = $p \leq 0,01$; ° = $p \leq 0,05$ (Kruskall-Wallis-Test)

In Zone 2 fanden sich bei allen 3 Kontrollgruppen zu allen Zeitpunkten die höchsten LI, wobei die Kontrollgruppe 3 (7 Tage-Pumpe) die höchsten Werte aufwies. Die Werte der Kontrollgruppe 1 (2 h vor der Tötung i. p. Injektion) waren zu allen 3 Zeitpunkten und in allen 3 Zonen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe 3 erniedrigt.

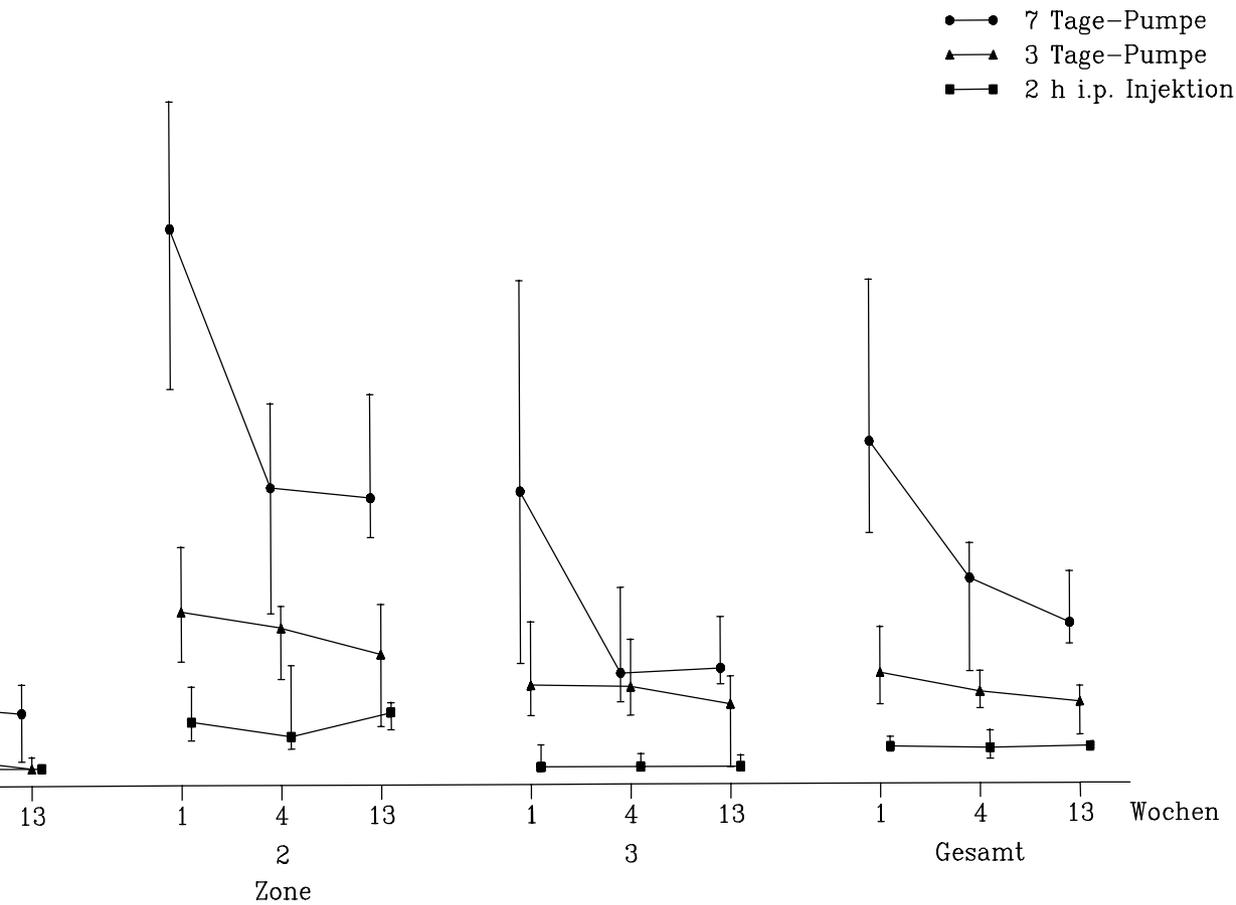
Im zeitlichen Verlauf kam es in der Kontrollgruppe 3 in den Zonen 1, 3 und bei der nicht-zonalen Messung (Gesamt) zu einer kontinuierlichen Zunahme der LI-Werte. In der Zone 2 wurde das Maximum nach 4 Wochen erreicht (3,57 %). Die Kontrollgruppen 1 (2 h intra-peritoneale Injektion) und 2 (3 Tage-Pumpe) zeigten ebenfalls eine Zunahme des LI in der Zone 2, die übrigen Zonen konnten aufgrund der niedrigen Werte im zeitlichen Verlauf nicht beurteilt werden.

4.1.2 C57BL Maus

4.1.2.1 Makroskopische und histologische Befunde

Alle Lebern waren makroskopisch ohne besonderen Befund.

Ein Tier aus der Kontrollgruppe 3 (7 Tage-Pumpe) wies eine einzelne herdförmige Nekrose (5 Zellen) mit gemischtzelliger Infiltration auf. Die übrigen Lebern wiesen keine histologischen Veränderungen auf.



unde, i. p. = intraperitoneal, Wochen = Versuchsdauer, 7 Tage-Pumpe = BrdU-Applikation via osmotischer Minipumpe über 7 Tage (Kontrolle 2), 3 Tage-Pumpe = BrdU-Applikation via osmotischer Minipumpe über 3 Tage (Kontrolle 2), 2 h i. p. Injektion = intraperitoneale Injektion 2 Stunden vor der Tötung (Kontrolle 1)

1. und 3. Quartil) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der C57BL Maus nach BrdU-Applikation

Woche	1	4	13
Zone 1	** °°	** °	** °°
Zone 2	** °	**	** °°
Zone 3	**	**	**
Gesamt	** °	**	** °°

Signifikanzen zu Abb. 2:

** statistisch signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe 1 gegenüber der Kontrollgruppe 3
 °° und ° statistisch signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe 2 gegenüber der Kontrollgruppe 3
 mit ** und °° = $p \leq 0,01$; ° = $p \leq 0,05$ (Kruskall-Wallis-Test)

Bei allen 3 Kontrollgruppen wies die Zone 2 zu jedem Zeitpunkt die höchsten Werte auf. Die LI der Kontrollgruppe 1 (7 Tage-Pumpe) waren in jeder Zone und zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant erniedrigt gegenüber den LI der Kontrollgruppe 3 (2 h vor der Tötung i. p. Injektion). Die Kontrollgruppe 2 (3 Tage-Pumpe) zeigte statistisch signifikant erniedrigte Werte gegenüber der Kontrollgruppe 3 zu allen Zeitpunkten in Zone 1, in Zone 2 nach 1 und 13 Wochen und in Zone 3 zu keinem Zeitpunkt.

Alle Tiere wiesen nach 1 Woche in allen 3 Zonen und im Gesamt-LI die höchsten Werte auf. Zu den späteren Versuchszeitpunkten (4 und 13 Wochen) fiel ein kontinuierlicher Abfall der LI auf.

4.2 Phenobarbital

Je Mäusestamm erhielten 30 Tiere 500 ppm Phenobarbital für 1, 4 oder 13 Wochen (10 Tiere pro Gruppe) über das Futter. Allen Tieren wurde 7 Tage vor der Tötung eine mit BrdU gefüllte osmotische Minipumpe subcutan implantiert. Die Kontrollgruppe 3 aus der Studie der verschiedenen Pumpenzeiten (s. 4.1) diente jeweils als Kontrolle.

4.2.1 B6C3F1 Maus

Tab. 10: Körper- und Lebergewichte der B6C3F1 Maus nach Phenobarbitalbehandlung

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Pb	Kontrolle	Pb	Kontrolle	Pb
1 Wo (n = 10)	25,60±1,70	26,66±0,93	1,12±0,19	1,53±0,10**	4,35±0,53	5,73±0,26**
4 Wo (n = 10)	27,58±0,84	28,00±1,43	1,28±0,08	1,58±0,21**	4,64±0,21	5,64±0,58**
13 Wo (n = 9)	30,66±1,53	30,90±2,01	1,34±0,11	1,61±0,15**	4,35±0,19	5,21±0,33**

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Pb = Phenobarbital

Sowohl die absoluten als auch die relativen Lebergewichte waren unter Phenobarbitalbehandlung zu allen Zeitpunkten um 19,8 % bis 36,6 % statistisch signifikant erhöht, wobei das Maximum nach 1 Woche zu finden war. Das Körpergewicht war zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle verändert.

4.2.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

Makroskopie:

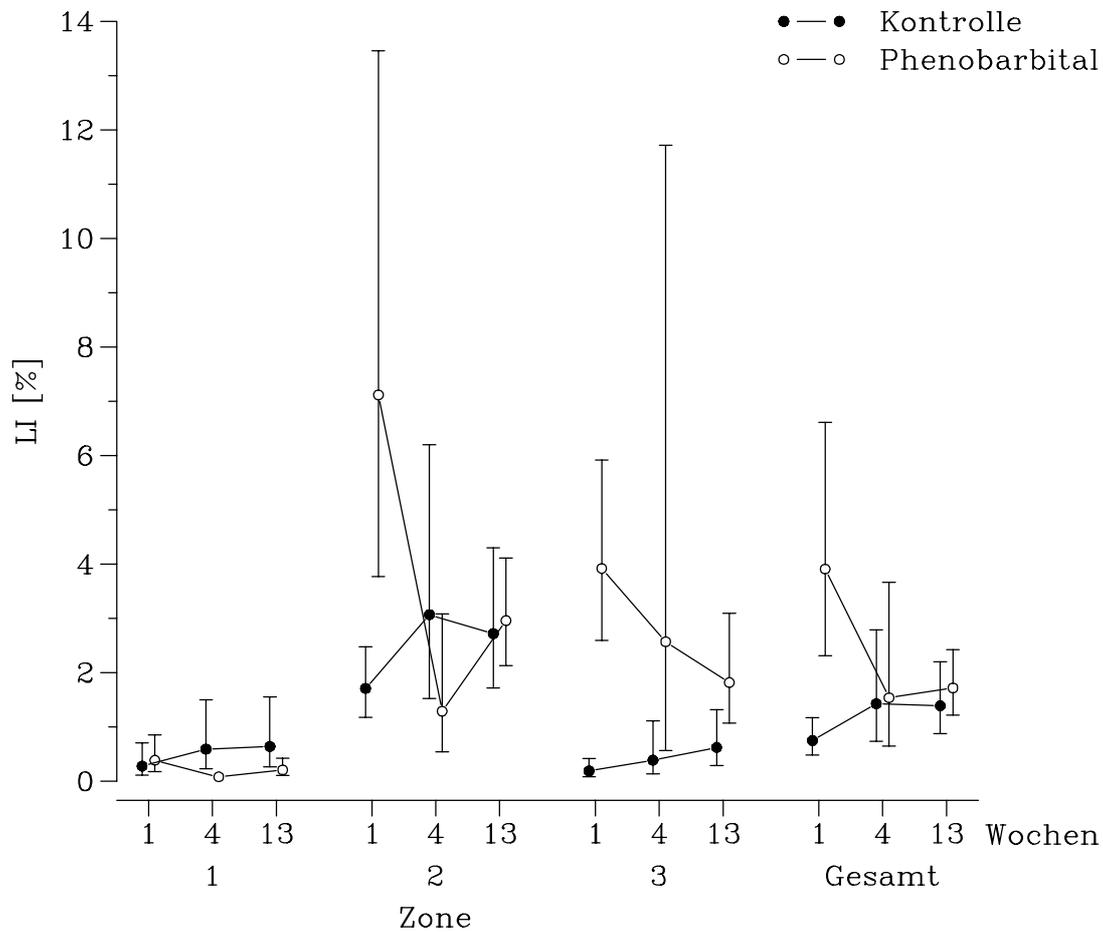
Nach 1 Woche waren die Lebern der mit Phenobarbital behandelten Tiere ohne besonderen Befund. Nach 4 und 13 Wochen waren je 4 Lebern geringgradig vergrößert. Ein Tier aus der 13 Wochen-Gruppe war verstorben und wurde von der Befundung ausgeschlossen.

Histopathologie:

In 9 Lebern fiel nach 1 Woche eine deutliche, in 1 Leber eine geringgradige Hypertrophie und vermehrte Eosinophilie der Hepatozyten in Zone 3 auf.

Nach 4 und 13 Wochen war jeweils noch bei 8 Tieren eine deutliche, bei den restlichen eine geringgradige oder keine Hypertrophie mehr zu sehen.

4.2.1.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 3: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der B6C3F1 Maus nach Verabreichung von Phenobarbital

Woche	1	4	13
Zone 1		**	**
Zone 2	**	*	
Zone 3	**	**	**
Gesamt	**		

Signifikanzen zu Abb. 3:

** und * statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ und * = $p \leq 0,05$ (Dunnett-Test)

Die LI in Zone 1 waren nach 1 Woche gegenüber den Kontrollen nicht statistisch signifikant verändert, nach 4 und 13 Wochen waren sie jedoch signifikant um das 7,4- und 3-fache erniedrigt. Die LI der Zonen 2 und 3 sowie der Gesamt-LI waren nach 1-wöchiger Behandlung alle statistisch signifikant erhöht, wobei das Maximum mit einer 20,6-fachen Steigerung in Zone 3 lag. Dort fanden sich auch nach 4 und 13 Wochen noch signifikant

höhere Werte als in der Kontrollgruppe (6,6- und 3-fach). In Zone 2 war der LI nach 4 Wochen signifikant um das 2,4-fache verringert. Der LI zum Zeitpunkt von 13 Wochen sowie der Gesamt-LI nach 4 und 13 Wochen waren gegenüber der Kontrolle nicht statistisch signifikant verändert.

4.2.1.3 Mitose und Apoptose

Tab. 11: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der B6C3F1 Maus nach Phenobarbitalgaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)						
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,33**	0,00	0,00	0,00	0,13**	0,00
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00

** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Pb = Phenobarbital

Das Maximum der Mitoserate lag zu allen Zeitpunkten sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den behandelten Tieren in Zone 2 (zwischen 0,09 % und 0,33 %). Signifikant erhöhte Mitoseraten fanden sich nur nach 1-wöchiger Applikation in Zone 2 (3,7-fach) und in der Gesamt-Mitoserate (4,3-fach). Die Mediane der Apoptoserate waren sowohl in der Kontrolle als auch bei den behandelten Tieren gleich 0.

4.2.2 C57BL Maus

Tab. 12: Körper- und Lebergewichte der C57BL Maus nach Phenobarbitalbehandlung

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Pb	Kontrolle	Pb	Kontrolle	Pb
1 Wo (n = 10)	25,32±1,05	24,57±2,32	1,21±0,15	1,35±0,21	4,76±0,47	5,47±0,56*
4 Wo (n = 10)	24,98±1,96	24,07±2,18	1,05±0,21	1,21±0,31	4,18±0,70	4,98±1,00
13 Wo (n = 10)	28,19±1,28	26,39±1,04**	1,16±0,09	1,29±0,08**	4,13±0,27	4,89±0,27**

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Pb = Phenobarbital

Die Körpergewichte der 13 Wochen-Behandlungs-Gruppe waren um 6,4 % statistisch signifikant verringert, das absolute Lebergewicht dagegen um 11,2 % statistisch signifikant erhöht. Das relative Lebergewicht war nach 1 und 13 Wochen um 14,9 % und 18,4 % statistisch signifikant erhöht.

4.2.2.1 Makroskopische und histologische Befunde

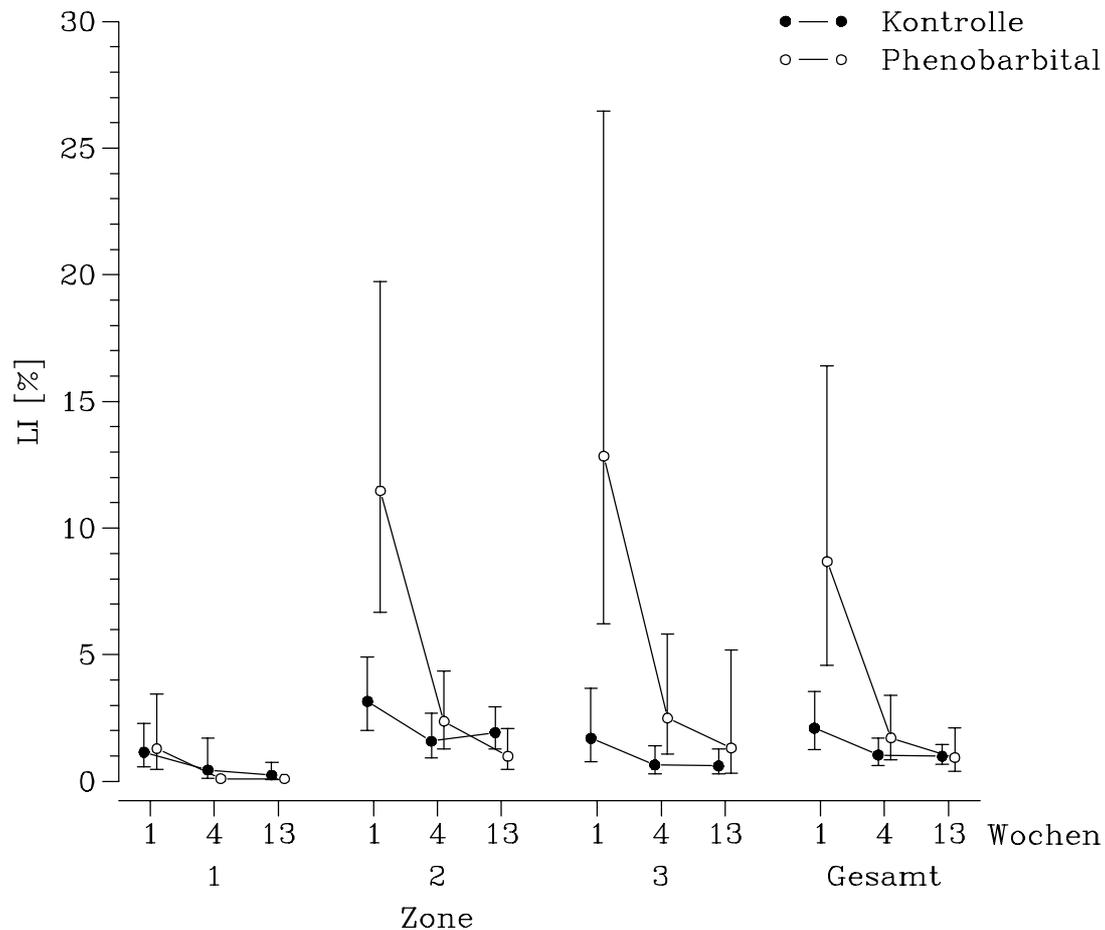
Makroskopie:

Nach 1 Woche wies ein mit Phenobarbital behandeltes Tier eine hochgradig vergrößerte Leber auf, die restlichen Tiere waren ohne besonderen Befund. Alle Tiere der 4 und der 13 Wochen-Gruppe waren ohne besonderen Befund.

Histopathologie:

3 Tiere wiesen eine deutliche, 7 Tiere eine geringgradige Hypertrophie der in Zone 3 gelegenen Hepatozyten nach 1 Woche auf. Nach 4 Wochen waren die Zellen der Zone 3 bei einem Tier geringgradig, bei den restlichen 9 Tieren deutlich hypertroph. Nach 13 Wochen zeigte die Hälfte der Tiere eine deutliche, die andere Hälfte eine geringgradige Hypertrophie der Hepatozyten in Zone 3.

4.2.2.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 4: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der C57BL Maus nach Verabreichung von Phenobarbital

Woche	1	4	13
Zone 1		**	*
Zone 2	**		*
Zone 3	**	*	
Gesamt	**		

Signifikanzen zu Abb. 4:

** und * statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ und * = $p \leq 0,05$ (Dunnett-Test)

In Zone 1 lagen die LI nach 1 Woche auf Kontrollniveau, zu den späteren Zeitpunkten waren sie signifikant 4,1- und 2,5-fach gegenüber der Kontrolle verringert. Die LI in den Zonen 2 und 3 und der Gesamt-LI waren nach 1 Woche statistisch signifikant erhöht mit einem maximalen Anstieg (7,6-fach) in Zone 3. In der Zone 2 war der LI nach 4 Wochen, der Gesamt-LI war nach 4 und 13 Wochen nicht signifikant gegenüber der Kontrolle verändert.

Nach 13 Wochen lagen die Werte in Zone 2 sogar 1,9-fach unter den Kontrolltieren. In Zone 3 war der LI nach 4 Wochen noch 3,8-fach gegenüber der Kontrolle erhöht, zum Zeitpunkt von 13 Wochen fanden sich keine signifikante Unterschiede.

4.2.2.3 Mitose und Apoptose

Tab. 13: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der C57BL Maus nach Phenobarbitalgaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)						
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,19	0,02
	Pb	0,00	0,00	0,70	0,00	0,19**	0,00	0,28	0,00
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	Pb	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Pb = Phenobarbital

Die höchsten MI der Kontrolltiere fanden sich in Zone 2 mit einem Peak nach 1 Woche (0,52 %) und dem niedrigsten Wert zum Zeitpunkt von 4 Wochen (0,05 %). In den Zonen 1 und 3 waren die Mediane der MI gleich 0.

Die behandelten Tiere wiesen ebenfalls die höchsten MI nach 1 und 4 Wochen in Zone 2 auf, wobei sie geringgradig, jedoch nicht signifikant, über den Kontrollwerten lagen (1,3- und 2,8-fach). In der Zone 3 war die Mitoserate nach 1 Woche signifikant erhöht. Nach 13 Wochen waren in allen Zonen der behandelten Tiere die Mediane gleich 0.

Die Apoptoserate war bei allen Tieren bis auf die Gesamt-Apoptoserate zum 1 Wochen-Zeitpunkt der Kontrolltiere (0,02 %) gleich 0.

4.3 Chloroform

Der C57BL Maus wurde zu Beginn der Studie 5 x wöchentlich 238 mg Chloroform/kg Körpergewicht per Schlundsonde verabreicht. Da mehrere Tiere ein reduziertes Allgemein-

befinden zeigten und 5 Tiere verstarben, wurde die Dosierung auf 120 mg/kg Körpergewicht ab dem 9. Studientag reduziert. Da die Studie mit der B6C3F1 Maus zeitlich versetzt zur C57BL Maus stattfand, erhielten die B6C3F1 Mäuse von Beginn an die reduzierte Dosis von 120 mg/kg. Den Tieren wurde jeweils 7 Tage vor der Tötung eine osmotische Minipumpe implantiert. Der Applikationszeitraum betrug auch hier 1, 4 und 13 Wochen.

Die Kontrollgruppe 3 aus der Studie der verschiedenen Pumpenzeiten (s. 4.1) diene jeweils als Kontrolle.

4.3.1 B6C3F1 Maus

Tab. 14: Körper- und Lebergewichte der B6C3F1 Maus nach Chloroformbehandlung

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Chlo	Kontrolle	Chlo	Kontrolle	Chlo
1 Wo (n = 10)	25,60±1,70	25,16±1,18	1,12±0,19	1,18±0,11	4,35±0,53	4,69±0,26
4 Wo (n = 10)	27,58±0,84	26,96±0,71	1,28±0,08	1,43±0,07**	4,64±0,21	5,29±0,21**
13 Wo (n = 10)	30,66±1,53	29,23±1,39*	1,34±0,11	1,55±0,15**	4,35±0,19	5,30±0,36**

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Chlo = Chloroform

Bei den Tieren der 4 und 13 Wochen-Gruppen waren sowohl die absoluten als auch die relativen Lebergewichte zwischen 11,7 % und 21,6 % statistisch signifikant erhöht. Bei Tieren, die 13 Wochen behandelt wurden, war das Körpergewicht um 4,7 % statistisch signifikant verringert.

4.3.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

Makroskopie:

Nach 1 und 4 Wochen waren die Lebern ohne besonderen Befund. Sechs Lebern der 13 Wochen-Gruppe waren ebenfalls unverändert, die restlichen 4 Tiere wiesen geringgradig vergrößerte Lebern auf.

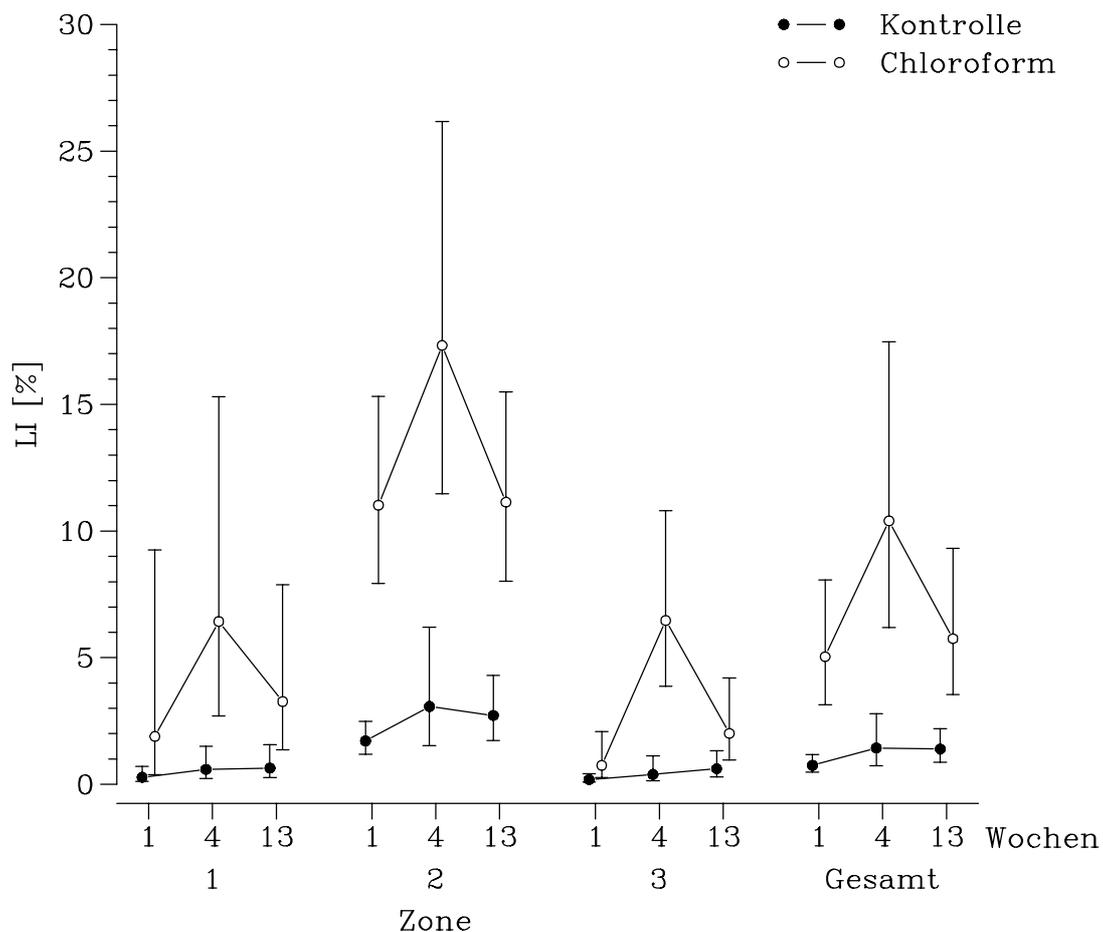
Histopathologie:

Nach 1 Woche wiesen 4 Lebern eine geringgradige gemischtropfige Verfettung der Zone 2 auf. Nach 4 Wochen zeigte eine Leber eine geringgradige gemischtropfige Verfettung in Zone 2, die übrigen Lebern waren ohne besonderen Befund. Bei 6 Tieren der 13 Wochen-Gruppe erschien das Zytoplasma der Hepatozyten in Zone 3 helleosinophil, und die

Zellgrenzen waren nur undeutlich zu erkennen. Es fanden sich einige Einzelzellnekrosen und 2 Tiere wiesen eine gering- bis mittelgradige Gallenpigmentspeicherung auf. Bei einem Tier fanden sich subcapsulär gelegene multiple Verkalkungsherde. 5 Lebern wiesen eine geringgradige gemischttröpfige Verfettung der Zonen 2 und 3 auf.

Die Lebern der übrigen Tiere waren ohne besonderen Befund.

4.3.1.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 5: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der B6C3F1 Maus nach Verabreichung von Chloroform

Woche	1	4	13
Zone 1	**	**	**
Zone 2	**	**	**
Zone 3	**	**	**
Gesamt	**	**	**

Signifikanzen zu Abb. .5

** statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ (Dunnett-Test)

In allen Zonen war der LI zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht, wobei in allen Zonen dasselbe Muster auftrat: es fand sich das Maximum nach 4-wöchiger Behandlung, wobei die Zone 3 den relativ höchsten Anstieg aufwies (16,6-fach). Der absolut höchste Wert war in Zone 2 zu finden (17,33 %). Die LI zum Zeitpunkt von 1 und 13 Wochen befanden sich in allen Zonen und im Gesamt-LI auf nahezu einem Niveau und lagen zwischen 3,9- und 10,9-fach über den Kontrollwerten.

4.3.1.3 Mitose und Apoptose

Tab. 15: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der B6C3F1 Maus nach Chloroformgaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)						
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,55**	0,00	0,11**	0,00	0,24**	0,00
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,23	0,12*	0,00	0,00	0,08	0,04*

* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Chlo = Chloroform

Nach 1 Woche war die Mitoserate in Zone 2 als einzige Zone geringgradig, aber nicht signifikant erhöht. Zum Zeitpunkt von 4 Wochen fand sich eine signifikante 5-fache Steigerung in Zone 2 und in Zone 3 betrug der MI 0,11 % im Vergleich zu 0 % bei den Kontrolltieren. Der Gesamtmitoseindex (Gesamt-MI) war signifikant um das 8-fache erhöht. Nach 13 Wochen war nur noch in Zone 2 der MI geringgradig, aber nicht statistisch signifikant erhöht.

Apoptosen traten vermehrt nur in Zone 2 nach 13 Wochen auf. Dadurch war auch der Gesamtapoptoseindex (Gesamt-AI) zu diesem Zeitpunkt statistisch signifikant erhöht.

4.3.2 C57BL Maus

Tab. 16: Körper- und Lebergewichte der C57BL Maus nach Chloroformbehandlung

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Chlo	Kontrolle	Chlo	Kontrolle	Chlo
1 Wo (n = 9)	25,32±1,05	22,89±1,29**	1,21±0,15	1,13±0,14	4,76±0,47	4,92±0,42
4 Wo (n = 7)	24,98±1,96	24,71±1,16	1,05±0,21	1,32±0,14**	4,18±0,70	5,35±0,48**
13 Wo (n = 5)	28,19±1,28	25,50±1,41**	1,16±0,09	1,22±0,14	4,13±0,27	4,76±0,38**

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Chlo = Chloroform

Das Körpergewicht war nach 1 und 13 Wochen statistisch signifikant um 9,6 % und 9,5 % verringert. Das absolute Lebergewicht war nach 4 Wochen um 25,7 %, das relative Lebergewicht nach 4 und 13 Wochen um 28 % bzw. 15,3 % statistisch signifikant erhöht.

4.3.2.1 Makroskopische und histologische Befunde

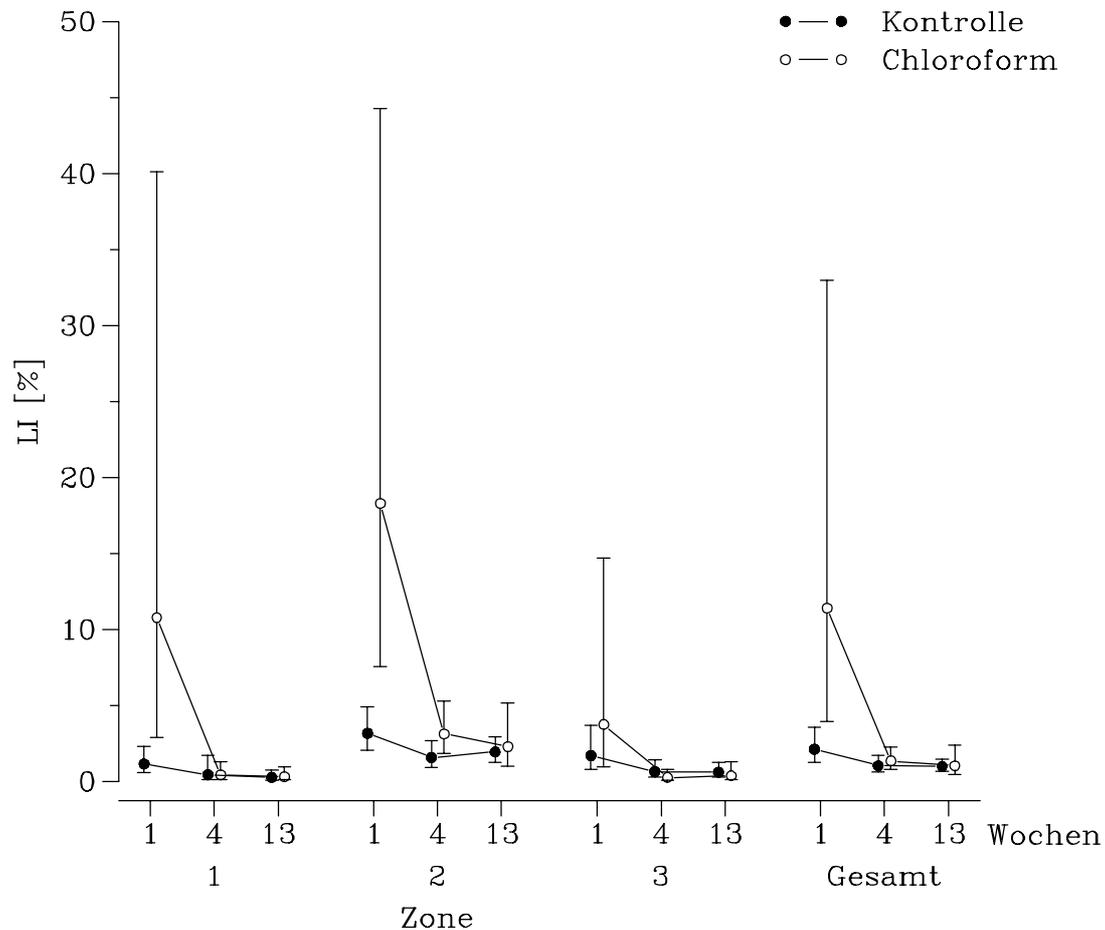
Makroskopie:

Nach 1 Woche war ein Tier verstorben. Acht Lebern waren unverändert. Auf einer Leber fand sich ein 12 mm großer, gelber Herd. Nach 4 Wochen waren 3 Tiere verstorben, die Lebern der überlebenden Tiere waren ohne besondere Befunde. Fünf Tiere der 13 Wochen-Behandlungs-Gruppe waren verstorben. Zwei Lebern der überlebenden Tiere wiesen eine verstärkte Läppchenzeichnung auf, an den restlichen 3 Lebern fanden sich keine Veränderungen. Die verstorbenen Tiere wurden von der Befundung ausgeschlossen.

Histopathologie:

Bei jeweils 4 Tieren war nach 1 Woche das Zytoplasma der Hepatozyten in Zone 3 diffus helleosinophil gefärbt und es fanden sich Einzelzellnekrosen. Ein Tier zeigte eine konfluierende subcapsulär gelegene Nekrose. Nach 4 Wochen wiesen 5 der überlebenden 7 Tiere eine geringgradige gemischtropfige Verfettung im Bereich der Zonen 2 und 3 auf. Bei 4 Tieren zeigte sich ein deutlicher Verlust der Eosinophilie des Zytoplasmas in Zone 3. In der 13 Wochen-Gruppe fand sich in einer Leber eine ausgedehnte, straßenförmig verlaufende Koagulationsnekrose. Drei der 5 überlebenden Tiere zeigten eine geringgradige bis deutliche gemischtropfige Verfettung in Zone 2.

4.3.2.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 6: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der C57BL Maus nach Verabreichung von Chloroform

Woche	1	4	13
Zone 1	**		
Zone 2	**		
Zone 3			
Gesamt	**		

Signifikanzen zu Abb. 6:

** statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ (Dunnnett-Test)

Die LI waren nach einer Woche bis auf die Zone 3 alle statistisch signifikant erhöht. Der relativ höchste Anstieg fand sich in Zone 1 (9,4-fach), der absolut größte Wert lag mit 18,29 % in Zone 2. Nach 4 und 13 Wochen wichen die LI in allen Zonen nicht statistisch

signifikant von den Kontrolltieren ab. In Zone 2 waren sie jedoch nach 4 Wochen noch 2-fach erhöht.

4.3.2.3 Mitose und Apoptose

Tab. 17: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der C57BL Maus nach Chloroformgaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)						
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,19	0,02
	Chlo	0,00	0,00	0,61	0,53**	0,00	0,09	0,15	0,20**
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	Chlo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03

** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Chlo= Chloroform

Die Mitoserate der behandelten Tiere war zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant gegenüber den Kontrolltieren verändert. In Zone 2 lag sie nach 4 Wochen 3,8-fach über den Kontrollwerten, nach 13 Wochen (0 %) jedoch unter den Werten der Kontrolltiere (0,16 %). Eine statistisch signifikant erhöhte Apoptoserate fand sich nach 1-wöchiger Behandlung in Zone 2 (0,53 %) und im Gesamt-LI (0,20 %, 10-fach erhöht).

4.4 Wyeth 14,643

Die Mäuse beider Stämme erhielten 100 p.p.m. Wyeth 14,643 über 1, 4 oder 13 Wochen im Futter. Die Pumpenimplantation fand jeweils 7 Tage vor der Tötung statt.

Die Kontrollgruppe 3 aus der Studie der verschiedenen Pumpenzeiten (s. 4.1) diene jeweils als Kontrolle.

4.4.1 B6C3F1 Maus

Tab. 18: Körper- und Lebergewichte der B6C3F1 Maus nach Behandlung mit Wyeth 14,643

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Wy	Kontrolle	Wy	Kontrolle	Wy
1 Wo (n = 9)	25,60±1,70	26,23±1,41	1,12±0,19	2,29±0,23**	4,35±0,53	8,70±0,52**
4 Wo (n = 10)	27,58±0,84	27,86±1,23	1,28±0,08	2,79±0,20**	4,64±0,21	10,02±0,32**
13 Wo (n = 10)	30,66±1,53	30,09±1,28	1,34±0,11	3,17±0,26**	4,35±0,19	10,51±0,50**

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Wy = Wyeth 14,643

Sowohl die absoluten als auch die relativen Lebergewichte waren zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant auf mehr als das Doppelte erhöht (zwischen 100 % und 141,6 %). Es konnte eine kontinuierliche Steigerung im Verlauf der Behandlung beobachtet werden.

4.4.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

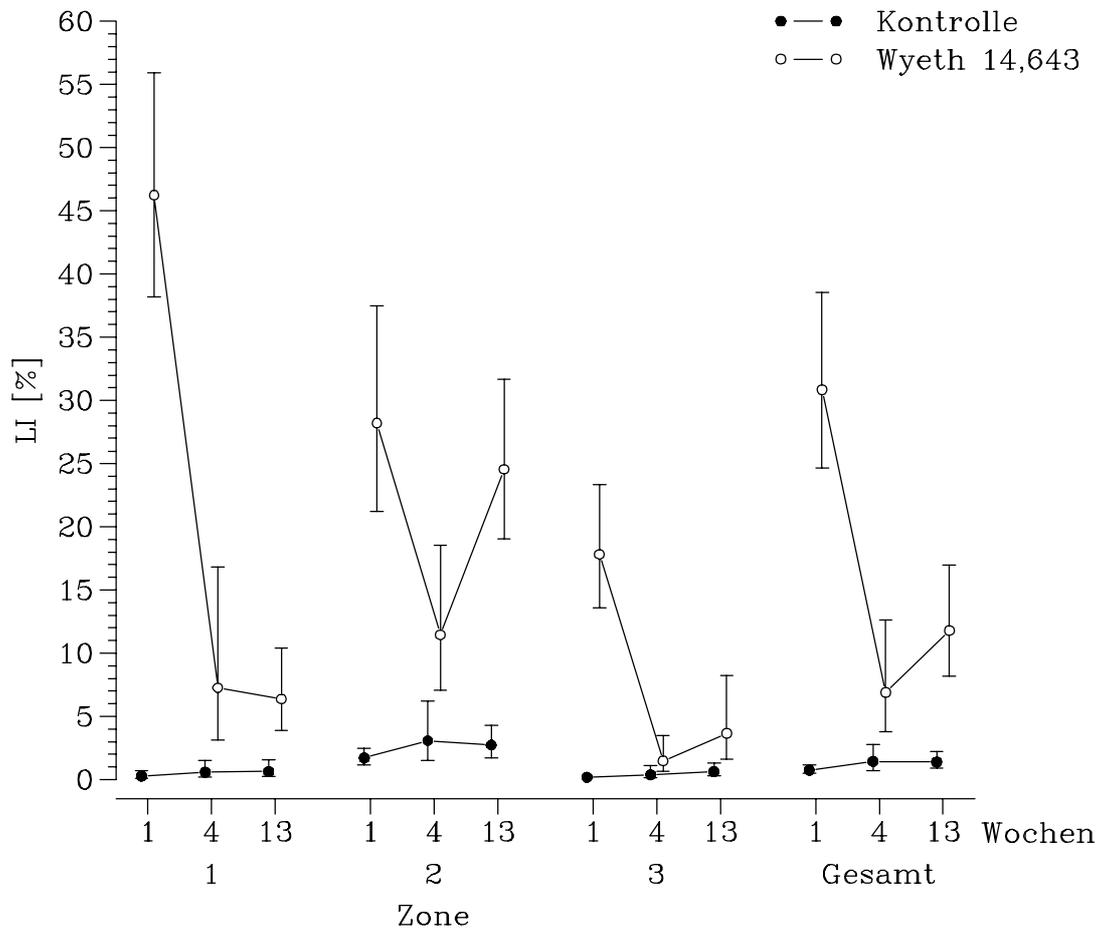
Makroskopie:

Ein Tier der 1 Wochen-Gruppe war verstorben. Nach 1 und 4 Wochen waren die Lebern mittel- bis hochgradig vergrößert. Bei 4 Tieren der 4 Wochen-Gruppe fanden sich multiple, zwischen 1 und 5 mm große gelbe Herde auf der Leber. Nach 13 Wochen wiesen alle Tiere hochgradig vergrößerte Lebern auf.

Histopathologie:

Bei allen Tieren fand sich nach 1, 4 und 13 Wochen eine panlobuläre Hypertrophie der Hepatozyten. Das Zytoplasma war stark eosinophil gefärbt und von körniger Beschaffenheit. In einer Leber der 1 Wochen-Gruppe fand sich ein Nekroseherd von 5 Zellen mit Infiltration von Granulozyten und Makrophagen. In 3 Lebern fand sich eine geringgrade Gallengangsproliferation. Nach 4 Wochen wiesen 6 Lebern mehrere Einzelzellnekrosen, 3 Lebern bis zu 7 herdförmige Nekrosen mit bis zu 30 beteiligten Zellen und eine Leber eine ausgedehnte Koagulationsnekrose auf, was vermutlich makroskopisch als gelbe Herde angesprochen wurde. In 5 Lebern fand sich eine geringgradige diffuse gemischttröpfige Verfettung. Nach 13 Wochen wiesen 2 Tiere 1-5 herdförmige Nekrosen mit bis zu 40 beteiligten Zellen auf. Alle Lebern wiesen eine gering- bis mittelgradige gemischttröpfige Verfettung in Zone 1 auf.

4.4.1.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 7: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der B6C3F1 Maus nach Verabreichung von Wyeth 14,643

Woche	1	4	13
Zone 1	**	**	**
Zone 2	**	**	**
Zone 3	**	*	**
Gesamt	**	**	**

Signifikanzen zu Abb. 7:

** und * statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ und * = $p \leq 0,05$ (Dunnett-Test)

Zone 1 war zu allen 3 Zeitpunkten die Zone mit der stärksten proliferativen Aktivität. Es fand sich im zeitlichen Verlauf ein Abfall der LI mit dem Maximum nach 1 Woche (165,1-fach). Die Zonen 2 und 3 und der Gesamt-LI wiesen ebenfalls die höchsten Werte nach 1 Behandlungswoche auf (16,5- bis 93,8-fach gegenüber den Kontrollwerten erhöht). Nach einem Rückgang der LI zum 4-Wochen-Termin (3,7- bis 12,3-fach erhöhte Werte) kam es nach 13 Wochen zu einem erneuten Anstieg (5,9- bis 10-fach).

4.4.1.3 Mitose und Apoptose

Tab. 19: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der B6C3F1 Maus nach Wyeth 14,643-Gaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)						
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Wy	0,23**	0,00	0,30**	0,10**	0,00	0,19**	0,26**	0,06*
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Wy	0,09	0,00	0,10	0,15	0,00	0,40**	0,06	0,18**
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	Wy	0,00	0,00	0,24	0,29**	0,00	0,64**	0,08	0,29**

* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Wy = Wyeth 14,643

Nach 1 Woche waren die Mitoseraten in den Zonen 1 und 2 statistisch signifikant erhöht. Hierbei war die Zone 1 (0,23 %) am stärksten betroffen war. In Zone 1 war die Mitoserate noch nach 4 Wochen (0,09 %), in Zone 2 nach 13 Wochen (0,24 %) deutlich, jedoch nicht mehr statistisch signifikant gegenüber den Kontrollwerten erhöht.

Die Apoptoserate war in allen Zonen bis auf die Zone 1 zu allen Zeitpunkten deutlich erhöht. Es fand sich im zeitlichen Verlauf eine kontinuierliche Steigerung (Zone 2: 0,10 %, 0,15 % und 0,29 %; Zone 3: 0,19%, 0,40 % und 0,64 %; Gesamt-AI: 0,06 %, 0,18 % und 0,29 %), die bis auf den 4 Wochen-Termin in Zone 2 von statistischer Signifikanz war.

4.4.2 C57BL Maus

Tab. 20: Körper- und Lebergewichte der C57BL Maus nach Behandlung mit Wyeth 14,643

	Körpergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		abs. Lebergewicht (g) ($\bar{x} \pm s$)		rel. Lebergewicht (%) ($\bar{x} \pm s$)	
	Kontrolle	Wy	Kontrolle	Wy	Kontrolle	Wy
1 Wo (n = 10)	25,32±1,05	25,26±0,89	1,21±0,15	2,41±0,25**	4,76±0,47	9,53±0,85**
4 Wo (n = 10)	24,98±1,96	24,91±1,72	1,05±0,21	2,54±0,43**	4,18±0,70	10,31±1,24**
13 Wo (n = 10)	28,19±1,28	26,38±1,25**	1,16±0,09	2,75±0,23**	4,13±0,27	10,41±0,63**

** = $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test, 2-seitig)

abs. = absolut, rel. = relativ, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, Wo = Wochen, n = Anzahl der behandelten Tiere, Wy = Wyeth 14,643

Die absoluten und relativen Lebergewichte der C57BL Maus waren zu allen 3 Behandlungszeitpunkten statistisch signifikant zwischen 99,2 % und 152,1 % erhöht.

Nach 13 Wochen war das Körpergewicht um 6,4 % statistisch signifikant verringert.

4.4.2.1 Makroskopische und histologische Befunde

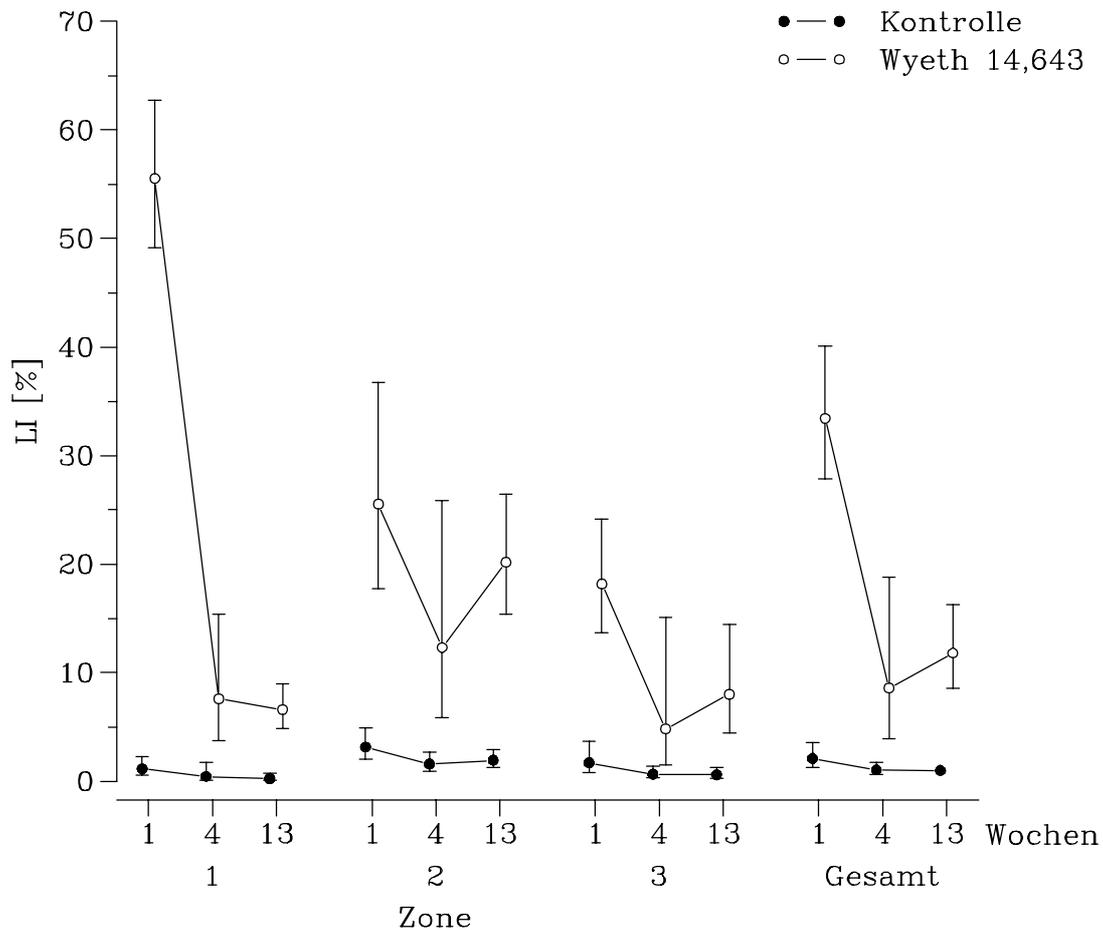
Makroskopie:

Bei allen Tieren waren die Lebern zu allen 3 Zeitpunkten hochgradig vergrößert. Ein Tier der 4-Wochen-Gruppe wies einen gelben, 2 mm großen Herd in der Leber auf.

Histopathologie:

Bei allen Tieren fand sich nach 1 Woche eine panlobuläre Hypertrophie der Hepatozyten. Das Zytoplasma war stark eosinophil gefärbt und von körniger Beschaffenheit. Nach 4 und 13 Wochen war die Hypertrophie vor allem auf die Zone 1 beschränkt. In 7 Lebern fanden sich zwischen 1 und 19 herdförmige Nekrosen, wovon bis zu 100 Zellen betroffen waren. Ein Tier wies weiterhin mehrere konfluierende Nekrosen auf, die ca. 1/3 des Leberlappens einnahmen, was sich makroskopisch vermutlich als gelber Herd in der Leber darstellte. In der 4 Wochen-Gruppe wiesen 7 Lebern zwischen 1 und 7 herdförmige Nekrosen mit bis zu 50 Zellen auf. In 8 Lebern fand sich eine gering- bis mittelgradige gemischttröpfige Verfettung in Zone 1. In je 2 Lebern fand sich eine geringgradige Gallengangsproliferation. Nach 13 Wochen wiesen 2 Lebern 1-2 herdförmige Nekrosen mit bis zu 20 Zellen auf. Die Zone 1 zeigte bei allen Tieren eine geringgradige bis deutliche gemischttröpfige Verfettung. Bei 2 Tieren fand sich weiterhin eine geringgradige Gallengangsproliferation.

4.4.2.2 Labelingindizes



LI = Labelingindex, Wochen = Behandlungsdauer

Abb. 8: LI (%) (geometrische Mittelwerte und Streufaktoren) der 3 Zonen sowie Gesamt-LI in der Leber der C57BL Maus nach Verabreichung von Wyeth 14,643

Woche	1	4	13
Zone 1	**	**	**
Zone 2	**	**	**
Zone 3	**	**	**
Gesamt	**	**	**

Signifikanzen zu Abb. 8:

** statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe mit ** = $p \leq 0,01$ (Dunnnett-Test)

Alle LI der behandelten Tiere waren statistisch signifikant gegenüber den Kontrollwerten erhöht. In der Zone 1 fanden sich zu allen 3 Zeitpunkten die relativ größten LI-Anstiege mit dem Maximum (48,3-fache Erhöhung) nach 1 Woche. Die LI der Zonen 2 und 3 sowie der Gesamt-LI waren zu allen Zeitpunkten zwischen 7,4- und 15,9-fach gegenüber den Werten

der Kontrolltiere erhöht. Maximale Werte fanden sich in den Zonen 2 und 3 der 13-Wochen-Gruppe, beim Gesamt-LI fand sich das Maximum zum 1 Wochen-Zeitpunkt. Die geringsten Anstiege des LI wurden in allen Zonen nach 4-wöchiger Behandlung gefunden.

4.4.2.3 Mitose und Apoptose

Tab. 21: Mediane der Mitose- und Apoptoseindizes in der Leber der C57BL Maus nach Wyeth 14,643-Gaben

	Substanz	Zone 1		Zone 2		Zone 3		Gesamt	
		MI (%)	AI (%)						
1 Woche	Kontrolle	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,19	0,02
	Wy	0,17**	0,00	1,75**	0,00	0,00	0,00	0,56**	0,05
4 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	Wy	0,09	0,00	0,53	0,28**	0,00	1,02**	0,19	0,42**
13 Wochen	Kontrolle	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	Wy	0,09**	0,00	0,71**	0,24**	0,09**	1,20**	0,32**	0,50**

** = $p \leq 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test)

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex, Wy = Wyeth 14,643

Zum Zeitpunkt von 1 Woche waren die MI in den Zonen 1 und 2 sowie der Gesamt-LI statistisch signifikant gegenüber den Kontrollwerten erhöht (0,17 %, 1,75 % und 0,56 %). Der absolut höchste Wert wurde in Zone 2 erreicht. In diesen 3 Zonen waren die LI auch nach 4 Wochen noch gegenüber den Kontrollwerten erhöht, was jedoch nicht von statistischer Signifikanz war. Nach 13 Wochen lagen alle MI zwischen 0,09 % und 0,71 % und waren statistisch signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht, der absolut höchste Wert lag auch hier wieder in Zone 2.

Der AI war in der Zone 1 zu keinem Behandlungszeitpunkt gegenüber den Kontrolltieren verändert und lag bei 0. In Zone 2 war der AI nur nach 4 und 13 Wochen deutlich und statistisch signifikant erhöht (0,28 % und 0,24 %). Der AI der Zone 3 sowie der Gesamt-AI waren ebenfalls statistisch signifikant während der letzten beiden Zeitpunkte gegenüber den Kontrolltieren erhöht (0,42 % und 1,20 %), wobei das Maximum jeweils zum Zeitpunkt von 13 Wochen erreicht wurde.

5 DISKUSSION

Zellproliferationsdaten haben in den letzten Jahren bei der Beurteilung von kanzerogenem Potential stark an Bedeutung gewonnen (AMES und GOLD, 1990; COHEN und ELLWEIN, 1990; SCHULTE-HERMANN et al., 1991; BUTTERWORTH et al., 1992). In dieser Arbeit wurde im Rahmen von Zellproliferationsstudien (S-Phasen-Response-Studien) der Abteilung Toxikologie der BASF AG die osmotische Minipumpe und deren optimale Verweildauer in der Maus etabliert. Anschließend wurden bei 2 Mäusestämmen, die eine unterschiedliche Spontantumorraterate sowie eine unterschiedliche Tumorfrequenz nach chemischer Tumorinduktion besitzen, die Spontanzellteilungsrate sowie die durch 3 bekannte nicht-genotoxische Karzinogene hervorgerufene Zellteilungsrate in der Leber bestimmt. Besonderes Augenmerk legten wir hierbei auf die zonale Verteilung der sich teilenden Zellen, da in der Literatur von zonal differenzierten, durch unterschiedliche Substanzen hervorgerufene hepatozelluläre Proliferationsmuster berichtet wird (FOX et al., 1993; CHEN et al., 1995; CONSTAN et al., 1995; BAHNEMANN, 2000).

Zur Zeit ist es aufgrund der uneinheitlichen und geringen Datenbasis nicht möglich, Zellproliferationsstudien als Kurzzeittest zur Bestimmung eines kanzerogenen Potentials zu verwenden. Diese Arbeit soll der Erweiterung dieser Datenbasis dienen und somit eine Grundlage für die Entwicklung eines Kurzzeittestes zur Detektierung kanzerogenen Potentials schaffen.

5.1 Wahl des Marker

Da es sich in diesem Falle um prospektive Zellproliferationsstudien handelte, wurde BrdU als Marker gewählt. BrdU, ein Thymidinanalogon, zeichnet sich durch seine geringe Toxizität und gute immunhistochemische Detektierbarkeit aus. Mit Hilfe osmotischer Minipumpen oder einer Verabreichung über Infusionen können kumulative Messungen durchgeführt werden, was speziell für Gewebe mit geringer mitotischer Aktivität von Vorteil ist. Bei der Verwendung von BrdU muß im Gegensatz zu [³H]Thymidin nicht mit radioaktivem Material gearbeitet werden und lange Entwicklungszeiten von Wochen bis Monate entfallen. Als Nachteil von sowohl BrdU als auch [³H]Thymidin ist jedoch aufzuführen, daß Studien nicht retrospektiv ausgewertet werden können.

Ein anderer Marker zur Erfassung der Zellteilungsrate ist das endogen produzierte Protein PCNA. Ein endogener Marker wie PCNA erfäßt nur Zellen aus einem Teilungszyklus und es kann deshalb nur eine geringe Anzahl positiver Zellen detektiert werden (SWENBERG und MARONPOT, 1991). Vor allem in postmitotischem Gewebe mit einer niedrigen Zellteilungsrate, wie z. B. der Leber, werden so nur wenige Zellen detektiert, was zu einer erschwerten statistischen Auswertung führt (MORRIS, 1993). Als Vorteil der PCNA-Methode gilt, die unterschiedlichen Zellzyklusphasen unterscheiden zu können (GOLDSWORTHY et al., 1991; FOSTER, 1997). So können eventuelle Effekte einer Substanz auf Zellen in bestimmten Abschnitten des Zellzyklus detektiert werden (GOLDSWORTHY et al., 1993). Diese Unterscheidung fällt jedoch im Einzelfall schwer (GOTTSCHLING, 1999; STEPHAN, 1999). Ein eindeutiger Vorteil der PCNA-Methode gegenüber dem Markieren mit Hilfe von DNA-Vorläufern ist die Möglichkeit einer retrospektiven Verwendung, was auch an Gewebe, das bis zu 28 Jahre gelagert war, noch möglich ist (GOTTSCHLING, 1999; STEPHAN, 1999).

Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Zellproliferationsstudien wird die Verwendung einheitlicher Versuchs- und Färbeprotokolle gefordert (GOLDSWORTHY et al., 1991).

5.2 Wahl der Mäusestämme

Die B6C3F1 Maus ist der am häufigsten für chemischen Karzinogenitätsstudien genutzte Stamm (GOLD et al., 1991). Im Rahmen eines Workshop wurde die Frage diskutiert, welcher Mäusestamm für weitere Studien der am besten geeignete sei (RAO et al., 1988a): die Wahl fiel auf die B6C3F1 Maus, da für diesen Stamm schon eine sehr große Datenmenge vorlag, die für einen anderen Stamm erst hätte ermittelt werden müssen. Außerdem wiesen andere, bis dahin verwendete Mäusestämme, entweder eine kürzere Lebenspanne oder eine höhere Prävalenz für Lymphome und Gefäßtumore auf. Argumente gegen einen Inzuchtstamm wie die C57BL Maus waren deren geringe genotypische Variabilität, die als nicht repräsentativ für die gesamte Spezies Maus galt.

Für unsere Studie entschieden wir uns für die B6C3F1 Maus, da sie noch immer einer der meist verwendeten Mäusestämme in Kanzerogenitätsstudien ist. Es liegen viele Daten zur Häufigkeit von spontan auftretenden oder chemisch induzierten Lebertumoren vor. Die C57BL Maus wählten wir aufgrund ihrer geringeren Anfälligkeit für Lebertumore (FRITH et

al., 1983). Unsere Untersuchungen sollten auch zeigen, ob die Zellproliferation ein möglicher Faktor in der unterschiedlichen Prävalenz von Lebertumoren beider Stämme darstellt.

5.3 Pumpenverweildauer

Für Zellproliferationsstudien werden in der Literatur unterschiedliche Pumpenverweildauern angegeben (s. Tab. 6). GÖTTEL (1997) testete in verschiedenen Geweben der Ratte die optimale Pumpenverweildauer. Für die Leber erwies sich die 7 Tage-Pumpe als geeignetes Verfahren, um stabile Daten zu erhalten. Mit Hilfe einer BrdU-Pulse-Injektion 2 h vor Tötung der Tiere fanden ELDRIDGE und GOLDSWORTHY (1996) in männlichen, 10 bis 20 Wochen alten B6C3F1 Mäusen LI zwischen 0,08 % und 0,20 %. Hierbei wurde keine zonale Differenzierung vorgenommen. Diese Daten decken sich mit dem von uns ermittelten Gesamt-LI (B6C3F1 Maus: 0,08-0,15 % und C57BL Maus: 0,12-0,13 %). Es fällt jedoch auf, daß sich alle Werte auf sehr niedrigen Niveau bewegen.

Bei der Verwendung einer 3 Tage BrdU-Pumpe lagen die Werte zwischen 0,11 % (ELDRIDGE et al., 1992; männliche B6C3F1 Mäuse, 8 Wochen) und 0,69 % (ELDRIDGE et al., 1990; männliche B6C3F1 Mäuse, 10 Wochen). LARSON et al. (1996) ermittelten LI zwischen 1,0 % und 0,5 % mit einer 3,5 Tage BrdU-Pumpe in männlichen B6C3F1 Mäusen (12 und 21 Wochen). Die eigenen Untersuchungen des Gesamt-LI mit Hilfe einer 3 Tage BrdU-Pumpe ergaben bei der B6C3F1 Maus Werte zwischen 0,42 % und 0,56 %. Bei der C57BL Maus fanden sich LI zwischen 0,43 % und 0,63 %. Die von uns ermittelten Werte lagen alle im Rahmen der in der Literatur beschriebenen LI. Insgesamt bewegen sich die Werte jedoch auf einem sehr niedrigen Niveau (≤ 1 %). Stehen zur Bewertung von substanzinduzierten Zellproliferationssteigerungen nur relativ niedrige Kontrollwerte zur Verfügung, führen geringgradige Proliferationsschwankungen, die nur durch 1 oder 2 positive Zellen ausgelöst werden können, zu einem vielfachen Anstieg oder Abfall des LI, was eher zu einer falschen Bewertung als bei höheren Kontrollwerten führen kann (GOLDSWORTHY et al., 1991; GOODMAN et al., 1991). Um stabilere, für Ausreißer weniger anfällige Kontrollwerte zu erhalten, entschieden wir uns für die Verwendung einer 7 Tage BrdU-Pumpe (s. 5.5).

5.4 Auswertungsstrategien

5.4.1 Labelingindex

Verschiedene Substanzen verursachen Zellproliferationssteigerungen in der Leber vor allem in bestimmten Populationen von Hepatozyten. Es ist bekannt, daß Phenobarbital sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen zu einer Erhöhung des LI der zentrolobulär gelegenen Hepatozyten führt (WARD und OHSHIMA, 1985; SMITH et al., 1991; JONES und CLARKE, 1993; KOLAJA et al., 1996c). Bei der Verabreichung von Trichlorethylen an B6C3F1 Mäuse fanden DEES und TRAVIS (1993) einen gesteigerten LI und eine gesteigerte Mitoserate in der „intermediären“ Zone der Leber. Nach der Gabe von Wyeth 14,643 an Ratten kam es, im Gegensatz zu Mäusen, welche ein panlobuläres Proliferationsmuster aufwiesen, zu einer Proliferationssteigerung in der periportalen Zone (MARSMAN et al., 1988; ELDRIDGE et al., 1990; SMITH et al., 1991; STEPHAN, 2001). Um auch in unserer Studie etwaige zonale Effekte verschiedener Substanzen auf den LI beurteilen zu können, kam für die Auswertung der S-Phasen-Response die lobule-dependent zonal measurement Methode (LZM-Methode) nach BAHNEMANN und MELLERT (1997) zur Anwendung. Die Strecke zwischen Portalgefäßen und abführender Vene wurde hierbei in 3 gleichgroße Zonen eingeteilt, wobei jede Zone ca. 100 Zellen umfaßte. Diese differenzierte Auszählung in 3 verschiedenen Zonen hat den Vorteil, daß geringe Änderungen im LI einer Zone erfaßt werden können und dieser Effekt nicht bei der Verrechnung über das gesamte Organ verloren geht. Durch die Messung von je 5 Feldern in 2 Leberlappen und die dadurch bedingte Erfassung von ca. 3000 Hepatozyten pro Tier erlangten wir einen repräsentativen Ausschnitt der gesamten Leber. SOAMES et al. (1994) fanden bei der Auswertung von 5 Feldern in der Mäuseleber mit Hilfe einer 5 Tage BrdU-Pumpe im Gegensatz zur Ratte nur relativ kleine LI (< 1 %). Es sollte deshalb eine deutlich größere Anzahl an Feldern ausgewertet werden, was wir mit 10 Feldern pro Tier erfüllten.

In unserer Studie wurden zum ersten Mal zonale Zellproliferationsdaten mit Hilfe der LZM-Methode in der Mäuseleber ausgewertet. Die am häufigsten verwendete Auswertstrategie ist die zufällige Auswahl von Messfeldern (5-10), wobei insgesamt 1000-2000 Zellen gezählt werden und der Mittelwert dieser Felder als repräsentativ für die gesamte Leber angesehen wird (ELDRIDGE et al., 1990; MARSMAN et al., 1992; WADA et al., 1992; WILSON et al., 1992; LARSON et al., 1994a; STANDEVEN und GOLDSWORTHY, 1994). Hierbei besteht die Gefahr, daß nur zonal auftretende Änderungen des LI nicht erfaßt werden (FOX et al., 1993). BAHNEMANN (2000) konnte im direkten Vergleich der beiden Methoden zeigen,

daß die zufällige Auswahl von Feldern sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, wenn ein zonal unterschiedliches Proliferationsmuster vorliegt und in diesem Fall mehr als die Hälfte der gewählten Meßfelder in dieser oder einer anderen Zone gemessen werden. Mit Hilfe der LZM Methode wird gewährleistet, daß alle 3 Zonen gleichmäßig berücksichtigt werden und hier pro Zone die sonst oft für die gesamte Leber üblichen 1000 Zellen gezählt werden. Da der Abstand zwischen Portalfeld (Zone 1) und abführender Vene (Zone 3) in jedem zu messenden Feld ca. 350 µm beträgt, erhält man für alle gemessenen Felder vergleichbare Daten.

In der Literatur wurde bisher nur eine Zellproliferationsstudie mit Mäusen beschrieben, in der zonal ausgewertet wurde (KOLAJA et al., 1996c). Das unterschiedliche Studiendesign (Gruppengröße, Alter der Tiere, ausgewertete Gesamtzellzahl) erschwert jedoch den Vergleich mit unseren Daten. KOLAJA et al. (1996c) nahmen die zonale Einteilung in der Leber männlicher B6C3F1 Mäuse vor, indem sie jeweils 5 Hepatozyten im Radius um ein Portalfeld zur periportal Zone und jeweils 5 Hepatozyten im Radius um eine abführende Vene zur zentrolobulären Zone erklärten. Die dazwischen liegenden Hepatozyten wurden als „mid-zonal“ bezeichnet. Mit Hilfe einer 7 Tage [³H]Thymidin-Pumpe stellten sie keine deutliche Unterschiede zwischen dem „Totalen-LI“ und dem der einzelnen Zonen fest (zu allen Zeitpunkten ~2,5 %).

5.4.2 Mitose- und Apoptoseindex

Mit Hilfe der Inkorporation von BrdU in die DNA werden Zellen detektiert, die sich in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzykluses befinden, oder, bei längerdauernder BrdU-Gabe, während der Verabreichungsdauer befanden. Da die Synthese-Phase im Zellzyklus zeitlich gesehen vor der eigentlichen Zellteilung, der Mitose, liegt, kann mit der S-Phasen-Response keine Aussage darüber getroffen werden, ob die markierten Zellen auch die Mitosephase durchlaufen. Aus diesem Grund werteten wir an Hand von morphologischen Kriterien (Mitosefiguren) den Mitoseindex ebenfalls mit der LZM-Methode aus. Als Nachteil dieser Methode ist anzuführen, daß in Organen mit geringer mitotischer Aktivität wie der Leber nur sehr niedrige Werte ermittelt werden und so kleine Änderungen leicht übersehen werden können (FOSTER, 1997). Die niedrigen Mitoseindizes sind zum anderen bedingt durch die kurze Zeitspanne, in der sich die Zelle in der Mitose-Phase befindet (~1 Stunde) (CHEVILLE, 1983).

Die Apoptose gilt neben der Zellproliferation als weiterer wichtiger Faktor im Rahmen der Hepatokarzinogenese (SCHULTE-HERMANN et al., 1990; LUEBECK et al., 1991; SCHULTE-HERMANN et al., 1991). In gesundem Gewebe ist sie für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase verantwortlich (FERGUSON und ANDERSON, 1981). Präkanzeröse und kanzeröse Zellen können eine verminderte Sensibilität gegenüber Apoptosesignalen und damit eine geringere Apoptoserate als das unveränderte, umliegende Gewebe aufweisen, was schließlich zu einem größeren Risiko der Tumorentstehung führt (SCHULTE-HERMANN et al., 1990). Aus diesem Grund sollte in unserer Studie neben dem Einfluß verschiedener Substanzen auf die S-Phasen-Response auch deren Auswirkung auf die Apoptose überprüft werden.

BLAZEY (2001) verglich an Rattenlebern die verschiedenen Möglichkeiten des Nachweises von Apoptosen. Die Auswertung am H&E gefärbten Schnitt erwies sich als sehr sensitiv und es kam nur zu geringen Schwankungen innerhalb der AI. Als weiterer Vorteil dieser Methode galten die geringen Materialkosten und die gute Differenzierbarkeit der Apoptose von Nekrosen oder Strukturen, die mit Apoptosen verwechselt werden können (z. B. zytoplasmatische Einschlüsse). Mit Hilfe der TUNEL-Methode wurden im Vergleich zur HE-Methode zwar höhere Apoptoseindizes ermittelt, es kam jedoch häufiger zu falsch positiven Ergebnissen, die dann am HE-Schnitt an Hand morphologischer Kriterien überprüft werden mußten. Mit der Fluoreszenz-Methode (Eosin-Fluoreszenz) wurden wie bei der TUNEL-Methode andere Ereignisse (z. B. nekrotische Zellen) mitdetektiert, die nicht apoptotischen Vorgängen zugeordnet werden konnten. Weiterhin kam es nach längeren Fixationszeiten (> 7 Tage) zu einer erheblichen Reduktion der feststellbaren Apoptosen.

Wegen des geringeren zeitlichen Aufwands, der geringeren Kosten und vor allem aufgrund der höheren Sensitivität entschieden wir uns für die HE-Methode. Um korrespondierende Ergebnisse zur S-Phasen-Response zu erlangen, wurde hier ebenfalls mittels der LZM-Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) ausgewertet. BLAZEY (2001) forderte eine Auszählung von 15000 Zellen pro Leber, um stabile Daten zu erhalten. Sie bevorzugte eine meanderförmige Auswertung innerhalb des Leberlappens, da somit, im Gegensatz zur LZM-Methode, die Anzahl der auswertbaren Felder nicht beschränkt wurde. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, werteten wir die Zellproliferation, den Mitoseindex und auch den Apoptoseindex mit Hilfe der selben Methode (LZM-Methode) aus und nahmen so die eventuell aufgrund der geringeren ausgewerteten Zellzahl etwas instabileren Daten zu Gunsten der besseren Übertragbarkeit in Kauf.

5.5 Vergleich der ermittelten Werte der Kontrollgruppe 3 (7 Tage-Pumpe) mit Literaturangaben

Die in der Literatur gefundenen Kontrollwerte unterliegen zum Teil großen Schwankungen. Dies ist auf das uneinheitliche Alter der Tiere oder die unterschiedlichen Techniken der einzelnen Labors zurückzuführen. Weiterhin liegen nur wenige Daten zu S-Phasen-Response Studien mit Mäusen und nur ganz vereinzelt mit C57BL Mäusen vor. Es konnten deshalb nur wenige Daten zum Vergleich herangezogen werden.

5.5.1 B6C3F1 Maus

Werte aus Zellproliferationsstudien in der Leber männlicher B6C3F1 Mäuse, die mit einer 7 Tage [³H]Thymidin- oder BrdU-Pumpe ermittelt wurden, reichen von 2,50 % (COUNTS et al., 1996; KOLAJA et al., 1996c) bis 3,63 % (CUNNINGHAM et al., 1994). ELDRIDGE et al. (1990) ermittelten mit Hilfe einer 6 Tage BrdU-Pumpe sogar Werte von 3,90 % (männliche B6C3F1 Mäuse, 11 Wochen). COUNTS et al. (1996) und CUNNINGHAM et al. (1994) machten in ihrer Studie keine Angabe zum Alter der Tiere. Dadurch wird der Vergleich der Daten zusätzlich erschwert, da das Alter einen nicht unerheblichen Einfluß auf den LI hat (GOLDSWORTHY et al., 1991).

Die Kontrollwerte (geometrischer Mittelwert) der eigenen Untersuchung (Gesamt-LI) lagen bei 11 Wochen alten Tieren bei 0,75 %, im Alter von 14 Wochen bei 1,43 % und bei 24 Wochen alten Tieren bei 1,39 %. Die von uns ermittelten Werte liegen somit zu allen 3 Zeitpunkten unter den in der Literatur beschriebenen Werten. Hierfür kommen ursächlich verschiedene Faktoren in Betracht. Durch die LZM-Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) werden alle 3 Zonen der Leber in gleichem Maße ausgewertet. Werden hingegen zufällig Felder zur Auswertung aufgesucht, besteht die Gefahr, daß vermehrt in Feldern mit hoher Zellteilungsrate gemessen wird und man so zu hohe Ergebnisse ermittelt. Der LI der Zone 2 aus unseren Auswertungen lag zwischen 1,71 % und 3,07 %, somit also im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte für die gesamte Leber. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß in anderen Studien mit zufälliger Meßfeldauswahl vermehrt Felder mit höheren LI aufgesucht wurden. Weiterhin wurden oft nur 1000 Zellen/Leber ausgewertet (ELDRIDGE et al., 1990; KOLAJA et al., 1996c). Dies stellt nur ein Drittel der von uns ausgewerteten Gesamtzellzahl dar. Hierdurch erhält man einen weniger repräsentativen Ausschnitt des Proliferationsverhaltens der gesamten Leber.

5.5.1.1 Mitoseindex

In der Literatur liegen nur sehr wenige Werte zur Berechnung des MI in der Mäuseleber vor. Ein Vergleich fällt weiterhin sehr schwer, da unterschiedliche Mäusestämme, teilweise Tumor-tragende Mäuse und unterschiedliche Methoden (Colchizin-Applikation) verwendet wurden (THEOLOGIDES und ZAKI, 1969; SURUR et al., 1985). Insgesamt bewegen sich die gefundenen MI auf sehr niedrigem Niveau, so daß zum Teil der MI nicht bestimmt wurde, sondern nur die Region mit auffällig vielen Mitosefiguren beschrieben wurde (DEES und TRAVIS, 1993). SURUR et al. (1985) ermittelte in C3HS Mäusen Werte zwischen 0 und 5,4 Mitosefiguren/1000 Hepatozyten.

Die eigenen Messungen ergaben ebenfalls nur sehr geringe Werte, wobei der Median oft bei 0 lag. Dies trifft vor allem auf die Zonen 1 und 3 zu, wo die MI der Einzeltiere zwischen 0 % und 0,1 % lagen (s. Tab. 40-42). Wie auch schon bei der Bestimmung der S-Phasen-Response wies die Zone 2 zu allen 3 Zeitpunkten den höchsten MI auf (0,09-0,14 %).

5.5.1.2 Apoptoseindex

Die in der Literatur für Mäuse beschriebenen AI liegen auf einem sehr niedrigen Niveau (0,01-0,1 %) (MUSKHELISHVILI et al., 1995; GOLDSWORTHY et al., 1996, JAMES et al., 1998). Es wurden 2000-50000 Hepatozyten pro Leber ausgewertet. BLAZEY (2001) fand bei der Auswertung der Apoptoserate bei Ratten am H&E-Schnitt Werte von 0,013-0,033 %. Die Mediane des AI der eigenen Untersuchungen liegen zum größten Teil bei 0 %. Die Werte der Einzeltiere (s. Tab. 43-45) variieren zwischen 0 % und 0,12 %. Ein möglicher Grund für diese niedrigen AI könnte die Auswertung von nur 3000 Zellen sein. Dies entspricht nur 6-20 % der von anderen Autoren ausgewerteten Anzahl von Hepatozyten. GOLDSWORTHY et al. (1996) fand AI von 0,1 % bei einer ausgewerteten Gesamtzellzahl von 2000 Hepatozyten. Die Untersuchungen wurden jedoch an weiblichen Tieren durchgeführt, was eine Übertragbarkeit der Ergebnisse erschwert.

5.5.2 C57BL Maus

In S-Phasen-Response-Studien, die an C57BL Mäusen mit Hilfe einer 7 Tage-Pumpe durchgeführt wurden, variieren die LI zwischen 0,33 % und 4,5 % (COUNTS et al., 1996; ORTON et al., 1996). Der relativ hohe Wert (4,5 %) bei COUNTS et al. (1996) könnte durch das geringe Alter der Tiere bedingt sein. Es ist bekannt, daß Mäuse während der ersten 8 Lebenswochen größere Schwankungen im LI aufweisen, bedingt durch das starke Größenwachstum der Organe (GOLDSWORTHY et al., 1991). Ob die von COUNTS et al.

(1996) gefundenen relativ hohen LI altersbedingt sind, bleibt in diesem Fall rein spekulativ, da keine Altersangabe zu den Tieren gemacht wurde. ORTON et al. (1996) fanden in 6 Wochen alten Tieren einen LI von 1,8 %, dann das Maximum im Alter von 10 Wochen (3,8 %) und danach einen Rückgang des LI im Alter von 18 Wochen auf 0,33 %.

Die LI der eigenen Untersuchungen lagen mit 2,10 % (11 Wochen), 1,04 % (14 Wochen) und 0,99 % (23 Wochen) zum Teil unter den in der Literatur beschriebenen Werten, mit Zunahme des Alters jedoch auch darüber. Als Begründung hierfür kommen wieder ähnliche Faktoren in Betracht wie schon unter 5.5.1 aufgeführt.

5.5.2.1 Mitoseindex

Es wurden ähnliche MI wie für die B6C3F1 Maus ermittelt (s. 5.5.1.1). Auch hier fanden sich die meisten Mitosefiguren in Zone 2.

5.5.2.2 Apoptoseindex

Die AI entsprachen weitgehend denen der B6C3F1 Maus. Die Einzeltierwerte variierten zwischen 0 % und 0,12 % (s. Tab. 85-87).

5.5.3 Vergleich der Kontrollwerte beider Mäusestämme

Beim Vergleich des Gesamt-LI beider Stämme wies die C57BL Maus zu Beginn 2,8-fach höhere Werte auf als die B6C3F1 Maus. Im zeitlichen Verlauf kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der LI der C57BL Maus. Im Gegensatz dazu zeigte die B6C3F1 Maus erhöhte LI nach 4 Wochen, die auch nach 13 Wochen noch bestanden und somit 1,4-fach über denen der C57BL Maus lagen. Die gegenüber der C57BL Maus im Alter (14 Wochen und 23 Wochen) zunehmende Zellproliferationsrate der B6C3F1 Maus könnte ein wichtiger Faktor für die höhere Tumorprävalenz bei diesem Mäusestamm darstellen (30 % gegenüber 4,7 %, s. 2.3). Eine konstant hohe Zellteilungsrate erhöht das Risiko des Entstehens endogener Mutationen (s. 2.1).

KOLAJA et al. (1996c) fielen bei der zonalen Auswertung keine Unterschiede im LI zwischen den verschiedenen Zonen auf. In unserer Studie wurden im Gegensatz dazu bei beiden Stämmen zu allen 3 Meßzeitpunkten und bei unterschiedlich langer BrdU-Verabreichung in Zone 2 die höchsten LI gefunden (mit 7 Tage-Pumpe: B6C3F1: 4,3- bis 9,0-fach gegenüber den Zonen 1 und 3; C57BL: 1,9- bis 7,7-fach gegenüber den Zonen 1 und 3). Diese Beobachtung ist in sofern bemerkenswert, da für die Leber die Theorie der "streaming liver" (s. 2.5.1) diskutiert wird (ZAJICEK et al., 1985). Die Autoren verabreichten 20 Ratten

eine einmalige intraperitoneale [³H]Thymidin-Injektion. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion (1 h, 1, 3 und 5 Wochen) wurden die Tiere getötet und der Abstand der markierten Zellen zu den portalen Gefäßen bestimmt. Nach 1 h fanden sich die meisten gelabelten Zellen im periportalen Bereich, zu späteren Zeitpunkten vergrößerte sich der Abstand der gelabelten Zellen zum Portalfeld zunehmend. Basierend auf diesen Beobachtungen entwickelten die Autoren das Modell der "streaming liver", wonach die Hepatozyten am Rand der Portalgefäße entstehen und dann im Zellverband zur Zentralvene wandern, wo sie mittels Apoptose eliminiert werden.

Unsere Beobachtungen stützen dieses Konzept nicht. Wir konnten in Zone 2 die stärkste proliferative Aktivität messen. Da dies auch für Tiere zutraf, die eine intraperitoneale Injektion 2 h vor der Tötung erhielten, kann ausgeschlossen werden, daß während der kumulativen Messungen (7 Tage BrdU-Pumpe) die Hepatozyten von Zone 1 nach Zone 2 wanderten. Weiterhin findet sich auch bei beiden untersuchten Mäusestämmen die höchste Mitoserate in Zone 2, was somit unsere Ergebnisse der S-Phasen-Response bestätigte. Als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Proliferationsmuster kommen auch Speziesunterschiede in der Stammzellpopulation in Frage, da ZAJICEK et al. (1985) ihre Untersuchungen an Ratten durchführten. Es muß in Betracht gezogen werden, daß in der Mäuseleber keine der Ratte vergleichbare Stammzellpopulation existiert, was verschiedene Autoren aufgrund von Studien mit genetischer Markierung der sich teilenden Hepatozyten ebenfalls vermuten (BRALET et al., 1994; KENNEDY et al., 1995; PONDER, 1996).

Da wir mit unserer Auswertstrategie nur sehr niedrige AI ermitteln konnten, fällt ein Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Daten schwer. Diese Studie diente hauptsächlich der Ermittlung zonaler Zellproliferationsdaten, weshalb die LZM-Methode zur Anwendung kam. Für die Ermittlung von AI stellt sie jedoch keine geeignete Methode dar, da die von uns ermittelten AI sehr häufig bei 0 % lagen. Studien, die vorrangig die Erfassung der Apoptose zum Ziel haben, sollten ein abgewandeltes Auswertverfahren gewählt werden (deutlich größere ausgewertete Zellzahl, keine Festlegung auf eine bestimmte Anzahl an Meßfeldern), wie etwa von MUSKHELISHVILI et al. (1995), JAMES et al. (1998) oder BLAZEY (2001) beschrieben.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die von uns erhobenen Daten die Forderung von GOLDSWORTHY et al. (1991) zur Messung von Zellproliferation in verschiedenen Geweben weitgehend erfüllen. Es wurden mit Hilfe der LZM-Methode solide Daten erhoben, die aufgrund der zonalen Auswertung eine gezielte Betrachtung der unterschiedlichen

Zellpopulationen in der Leber ermöglichen und Unterschiede in der zonalen Zellteilungsrate aufzeigen. Im Gesamt-LI lagen die Werte mit einer Ausnahme $> 1 \%$. Dies läßt eine sichere statistische Aussage zu Zellproliferationssteigerungen zu. Bei der zonalen Auswertung liegen die LI vor allem der Zonen 1 und 3 auf einem etwas niedrigeren Niveau. Dadurch wird deutlich, daß eine zonale Auswertung unerlässlich ist, um eine gleichmäßige Verteilung der Meßfelder zu gewährleisten. So kann ausgeschlossen werden, daß Messungen überwiegend in einer bestimmten Zone stattfinden, was zu einer Verschleierung des wirklichen Geschehens in der Leber führen kann. Der Gesamt-LI erhält damit eine stärkere Aussagekraft gegenüber einem aus zufällig gewählten Meßfeldern ermittelten LI, da unter Verwendung der LZM-Methode jeweils ähnliche Felder ausgewertet wurden und dadurch ein repräsentativer Durchschnitt der Zellteilungsrate der gesamten Leber erlangt wurde.

5.6 Ermittelte Werte nach Substanzapplikation

5.6.1 Phenobarbital

Phenobarbital ruft sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten Lebertumoren hervor (ROSSI et al., 1977; BUTLER, 1978; BECKER, 1982; DIWAN et al., 1986; EVANS et al., 1992). Die von uns verwendeten Mäusestämme zeigen jedoch eine unterschiedliche Anfälligkeit für Lebertumoren nach Phenobarbitalgaben. So kommt es bei der C57BL Maus im Gegensatz zur B6C3F1 Maus nicht zur Tumorentstehung (BECKER, 1982; DIWAN et al., 1986; EVANS et al., 1992). Als allgemeine Wirkung von Phenobarbital auf die Mäuseleber wird eine Vergrößerung des Organs von bis zu 38 % beschrieben (LIN et al., 1989; CUNNINGHAM et al., 1991; EVANS et al., 1992; KOLAJA et al., 1996c). Histologisch fällt eine Hypertrophie und deutliche Eosinophilie vor allem der perivenös liegenden Hepatozyten auf (LIN et al., 1989; JIRTLE et al., 1991; EVANS et al., 1992). Diese Veränderungen werden einer mikrosomalen Enzyminduktion (CUNNINGHAM et al., 1991), einer Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (LAKE et al., 1986; LIN et al., 1989) sowie einer vermehrten Induktion von Wachstumsfaktoren in diesem Bereich (ORTON et al., 1996) zugeschrieben. Beide von uns untersuchten Stämme wiesen ein erhöhtes relatives Lebergewicht zwischen 14,9 % und 36,6 % auf, wobei bei der B6C3F1 Maus die stärkeren Anstiege zu beobachten waren. Ebenso fanden sich bei beiden Stämme die in der Literatur beschriebenen histologischen Veränderungen.

5.6.1.1 Labelingindex

In der Literatur wird für beide von uns untersuchten Mäusestämme eine gesteigerte hepatozytäre Proliferation nach Phenobarbital-Applikation beschrieben, welche ihr Maximum nach 7-14 Tagen erreicht (SCHAFER und KLAUNIG, 1991; COUNTS et al., 1996; KOLAJA et al., 1996c; ORTON et al., 1996). Die maximale Proliferationsrate lag 2- bis 15-fach über den Kontrollwerten. Nach 4 Wochen (COUNTS et al., 1996; ORTON et al., 1996) fanden sich keine signifikanten Unterschiede im LI behandelter und unbehandelter Tieren. KOLAJA et al. (1996c) bestimmten den LI nach Phenobarbital-Gabe zonal und fanden die höchsten LI in der perivenösen Zone mit einem Maximum nach 1 Woche (> 6,5-fach). In dieser Zone war der LI auch nach 28 Tagen noch statistisch signifikant erhöht. WARD et al. (1988) konnten dagegen bei B6C3F1 Mäusen, die mit Phenobarbital (500 p.p.m.) behandelt wurden, keine erhöhte Zellproliferation feststellen, worauf sie die Zellteilungsrate als ungeeignetes Kriterium zur Beurteilung der Tumorgenese bewerteten.

Unsere Untersuchungen zeigten eine deutliche LI-Steigerung nach 1 Woche in allen Zonen und bei beiden Stämmen, wobei das Maximum mit 20,6-fach (B6C3F1 Maus) und 7,6-fach (C57BL Maus) erhöhten Werten in Zone 3 zu finden war. Nach 4 und 13 Wochen lagen die Gesamt-LI, zum größten Teil übereinstimmend mit der Literatur, wieder auf Kontrollniveau. Die von KOLAJA et al. (1996c) nach 4 Wochen beschriebenen noch erhöhten Werte in Zone 3 konnten für beide Stämme bestätigt werden (B6C3F1: 2,57 %; C57BL: 2,5 %). Nach 13 Wochen wurden keine erhöhten LI mehr in der Literatur beschrieben. Auch KOLAJA et al. (1996c) konnten keine zonal erhöhten LI nach 13 Wochen mehr feststellen. Unsere B6C3F1 Mäuse hingegen wiesen zu diesem Zeitpunkt ausschließlich in Zone 3 noch statistisch signifikante, 3-fach höhere Werte als die Kontrolltiere auf. Der LI der C57BL Maus war noch 2-fach über die Kontrollwerte erhöht, was jedoch nicht von statistischer Signifikanz war. Durch die zonale Auswertung konnten proliferationssteigernde Effekte auf bestimmte Hepatozytenpopulationen detektiert werden, die bei der Bestimmung des Gesamt-LI nicht aufgefallen waren. Dieser Effekt wurde wesentlich durch die deutlich verringerten LI in den Zonen 1 und 2 mit bedingt. Als mögliche Erklärung für die Abweichung zu den von KOLAJA et al. (1996c) ermittelten Werten kommen die oben beschriebenen Unterschiede in der zonalen Einteilung und die geringere ausgewertete Zellzahl in Betracht (s. 5.4.1). Jedoch fanden auch diese Autoren ebenso wie wir mit Hilfe der zonalen Auswertung nach 4 Wochen noch erhöhte LI, die von anderen Autoren bei zufälliger Meßfeldwahl nicht beschrieben wurden. Eine Ursache für das von WARD et al. (1988) beschriebene Ausbleiben einer Erhöhung des LI nach Phenobarbital-Gaben könnte in der Auswertstrategie gelegen haben.

Den Tieren wurden eine Stunde vor der Tötung intraperitoneal BrdU appliziert. Weiterhin wurden nur 1000 Zellen/Tier ausgewertet. Wie unsere Ergebnisse zeigen, werden mit Hilfe der einmaligen Pulse-Injektion nur sehr niedrige LI in der Leber erzielt. Werden dann bei einem geringen LI nur relativ wenige Zellen ausgewertet, erhöht sich die Gefahr, substanzbedingte Effekte zu übersehen.

Beim Vergleich der beiden Mäusestämme fällt auf, daß die C57BL Maus nach 1 Woche deutlich höhere LI aufweist. Nach 13 Wochen liegen sie jedoch alle unter den LI der B6C3F1 Maus. Der relative Anstieg gegenüber den Kontrollwerten war jedoch bei der B6C3F1 Maus zu allen Zeitpunkten am stärksten (bis zu 20,6-fach). Hier fanden sich auch nach 13 Wochen, im Gegensatz zur C57BL Maus, signifikant höhere LI in Zone 3. Beiden Stämmen war gemeinsam, daß die LI in Zone 1 nach einer Woche nicht deutlich von denen der Kontrolltiere abwichen und nach 4 und 13 Wochen sogar signifikant erniedrigt waren. Grund für diese selektive Proliferationssteigerung in Zone 3 könnte die von ORTON et al. (1996) bei C57BL Mäusen beschriebene Induktion von Wachstumsfaktoren (z. B. TGF α) in zentrolobulären Hepatozyten bei gleichzeitig verminderter Expression hemmender Faktoren (z. B. TGF β 1) sein. Phenobarbital wirkt außerdem induzierend auf das vor allem in Zone 3 vorkommende Cytochrom P450 (LAKE et al., 1986; LIN et al., 1989). In Zone 1 scheint es dagegen zu einer deutlichen Hemmung der Zellteilung zu kommen, deren Ursache jedoch noch nicht geklärt ist. Dies deutet jedoch ebenfalls auf das Vorhandensein einer Hepatozytenpopulation hin, die für die durch Phenobarbital induzierte mitogene Wirkung empfänglicher zu sein scheint.

5.6.1.2 Mitoseindex

Bei der Mitoserate fanden sich bei der B6C3F1 Maus nach 1 Woche nur in Zone 2 signifikant erhöhte Werte. In Zone 3 waren die Einzeltierwerte (0-0,39 %; Tab. 46-48) gegenüber denen der Kontrollgruppe (0-0,1 %; Tab. 40-42) erhöht, was sich jedoch in den Medianen aufgrund des niedrigen Niveaus nicht widerspiegelte. Die C57BL Maus wies in Zone 3 signifikant erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe auf (Tab. 13). Die absolut höchsten MI fanden sich bei der B6C3F1 Maus zu allen Zeitpunkten, bei der C57BL Maus nach 1 und 4 Wochen in Zone 2. In den übrigen Zonen konnten bei beiden Stämmen keine erhöhten MI festgestellt werden. Die MI korrelierten somit nach 1 Woche gut mit den LI, wobei hohe MI in den Zonen gefunden wurden, die ebenfalls hohe LI aufwiesen (B6C3F1: Zone 2; C57BL: Zonen 2 und 3). Bei Veränderungen im LI auf niedrigem Niveau erwies sich die Bestimmung der Mitoserate eindeutig als nicht sensitiv genug, um Aussagen über substanzbedingte

Veränderungen treffen zu können. Dadurch ist auch die fehlende Erhöhung der Mediane der Mitoserate in Zone 3, der Zielzone von Phenobarbital, zu erklären.

5.6.1.3 Apoptoseindex

Für Phenobarbital wird die Hemmung der Apoptose als ein möglicher Faktor in der Tumorentstehung beschrieben (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1989; KOLAJA et al., 1996b). Der Einfluß von Phenobarbital auf die Apoptoserate war in unserer Untersuchung schwer zu beurteilen, da schon die Kontrollwerte der AI auf sehr niedrigem Niveau bis zu 0 % lagen. Bei der C57BL Maus fanden sich in den Einzeltierwerten der Kontrollgruppe nach 1 Woche AI zwischen 0 % und 0,31 % in Zone 3 (Tab. 85-87). Die mit Phenobarbital behandelten Tiere wiesen zum selben Zeitpunkt in Zone 3 keine apoptotische Aktivität auf (Tab. 91-93). Zu anderen Beobachtungszeitpunkten und bei der B6C3F1 Maus war aufgrund der niedrigen Kontrollwerte keine Aussage zu einer veränderten Apoptoserate möglich.

5.6.2 Chloroform

In der Leber der B6C3F1 Maus kommt es nach Chloroformverabreichung zur vermehrten Tumorentstehung (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1976). Die Tumorentstehung ist jedoch abhängig von der Applikationsart (LARSON et al., 1993; LARSON et al., 1994a; PEREIRA, 1994; GEMMA et al., 1996; PEREIRA und GROTHAUS, 1997). Durch den Chloroform-induzierten Zelluntergang in der Leber kommt es zur regenerativen Zellproliferation (REITZ et al., 1982; REITZ et al., 1990; BUTTERWORTH et al., 1995), was später zum Auftreten von Tumoren führen soll. Unterbleiben die zytotoxischen Effekte, findet keine vermehrte regenerative Zellproliferation statt, was als Begründung für das Ausbleiben von Tumoren gewertet wird (BUTTERWORTH et al., 1995).

Bei der Verabreichung von Chloroform an Mäuse via Schlundsonde kam es bei B6C3F1 Mäusen zu einem Rückgang des Körpergewichtes von bis zu 20 % (LARSON et al., 1994d). Weiterhin werden ein Verlust der Eosinophilie, Bildung von Vakuolen und Nekrosen vor allem im zentrolobulären Bereich beschrieben (LARSON et al., 1993; 1994a; 1994c; 1994d; 1996; PEREIRA, 1994). Bei unseren Untersuchungen wiesen beide Stämme ein reduziertes Körpergewicht (B6C3F1: bis zu 4,7 %; C57BL: bis zu 9,6 %) sowie ein erhöhtes relatives Lebergewicht auf (B6C3F1: bis zu 21,6 %; C57BL: bis zu 28 %). Auch die beschriebenen histopathologischen Veränderungen konnten wir für beide Stämme in unterschiedlichem

Ausmaß bestätigen. Unterschiede zwischen beiden Stämmen fanden sich in der Überlebensrate (B6C3F1: 100 %; C57BL: 70 %). Die C57BL Maus gilt als relativ resistent gegenüber Chloroform-bedingten Schädigungen (HILL et al., 1975; PERICIN und THOMANN, 1979; ROE et al., 1979) was im Gegensatz zu der von uns gefundenen geringeren Überlebensrate steht. Da der BASF AG-Routinesektionsplan keine pathologische Untersuchung der verstorbenen Tiere vorsah, können andere Todesursachen, wie z. B. Fehlsondierungen, nicht ausgeschlossen werden. Die von PERICIN und THORMANN (1979) ermittelte LD₅₀ für männliche C57BL Mäuse betrug 460 mg/kg Körpergewicht. Die von uns verwendete Dosis von 120 mg/kg Körpergewicht lag deutlich unter der von PERICIN und THORMANN (1979) ermittelten LD₅₀, was auf eine andere Todesursache als die Toxizität von Chloroform hinweisen könnte.

5.6.2.1 Labelingindex

In der Mäuseleber konnten nach Chloroformgaben deutlich gesteigerte Zellteilungsraten ermittelt werden: LARSON et al. (1994a) verabreichte 9 Wochen alten B6C3F1 Mäusen 138 mg/kg Chloroform via Schlundsonde für 4 Tage bzw. 3 Wochen. Der LI wurde mit einer 3,5 Tage BrdU-Pumpe in 1000 Hepatozyten/Tier bestimmt. Es wurde eine gleichmäßige Verteilung der gelabelten Zellen in der Leber beschrieben. Die LI waren 20,5- und 16,25-fach gegenüber den Kontrollwerten erhöht. GEMMA et al. (1996) bestimmten in männlichen B6C3F1 Mäusen die Zellproliferationsrate als gelabelte Kerne/mm² Leberfläche, nachdem die Tiere eine einmalige orale Applikation von 150 mg/kg Körpergewicht Chloroform erhalten hatten. Sie fanden dabei die höchste Zellteilungsrate mit 60 gelabelten Kerne/mm² nach 48 h, was nach ihren Angaben einem LI von 2,6 % entspricht.

Die eigenen Untersuchungen ergaben bei der B6C3F1 Maus nach 1 und 4 Wochen einen Gesamt-LI von 5,04 % und 10,40 %. Sie liegen damit nach 1 Woche unter, nach 4 Wochen jedoch über den Werten (12,3 % und 6,5 %) von LARSON et al. (1996). Ursachen hierfür dürften in der von LARSON et al. (1996) verwendeten höheren Dosierung, dem bei Versuchsbeginn geringerem Alter der Tiere und der unterschiedlichen Auswertstrategie liegen. Die von GEMMA et al. (1996) ermittelten sehr niedrigen Werte resultieren vermutlich aus der nur einmaligen Chloroform-Applikation. Kommt es zur Kumulation sehr hoher Chloroformkonzentrationen, was bei mehrmaliger Applikation der Fall ist, werden die Abwehrmechanismen der Leber erschöpft (PEREIRA, 1994). In nicht zu hohen Dosen und bei einmaliger Applikation kann die Leber den Abbau ohne deutlich sichtbaren Schaden bewältigen. Zur zonalen Auswertung der Mäuseleber nach Chloroformbehandlung lagen noch

keine Studien vor. Bei der Ratte wurde der höchste LI-Anstieg nach 1 Woche in Zone 1 beobachtet, nach 13 Wochen war er in Zone 3 zu finden (RABES et al., 1976; STEPHAN, 2001). In unserer Studie wiesen beide Mäusestämme ebenfalls den stärksten LI-Anstieg nach 1 Woche in Zone 1 auf (B6C3F1: 6,8-fach; C57BL: 9,4-fach). In der B6C3F1 Maus konnte nach 4 Wochen eine Verschiebung des höchsten Anstiegs zur Zone 3 beobachtet werden (16,6-fach), nach 13 Wochen war jedoch mit einer 5,1-fachen Steigerung wieder in Zone 1 der höchste LI-Anstieg zu finden, wobei auch die Zonen 2 und 3 noch gesteigerte LI aufwiesen (4,1- und 3,2-fach). Übereinstimmend mit der Literatur wurde ein Rückgang der LI beobachtet, wobei das Maximum, wie auch in der Kontrollgruppe, nach 4 Wochen zu finden war.

Die C57BL Maus wies hingegen nur zum 1 Wochen-Zeitpunkt stark erhöhte LI in allen Zonen mit Maximum in Zone 1 auf. Zu den restlichen 2 Behandlungszeitpunkten wichen die LI nicht statistisch signifikant von den Kontrollwerten ab. Als mögliche Ursache für diese stammesspezifischen Unterschiede kommt die geringere Sensibilität der C57BL Maus gegenüber Chloroform in Betracht (HILL et al., 1975; PERICIN und THOMANN, 1979; ROE et al., 1979). Da ein toxisch bedingter Tod bei den 9 verstorbenen Tieren nicht völlig ausgeschlossen werden kann, muß ebenfalls eine unterschiedliche tierspezifische Sensibilität für Chloroform innerhalb des C57BL Stammes in Betracht gezogen werden.

5.6.2.2 Mitoseindex

In Zone 2 korrelierte die Mitoserate bei der B6C3F1 Maus weitgehend mit den LI (Zone 2 zu allen Zeitpunkten: 0,13-0,55 %, Zone 3 nach 4 Wochen: 0,11 %). In Zone 1 fanden sich keine gesteigerten MI. Die Einzeltierwerte waren zu den verschiedenen Zeitpunkten geringgradig gegenüber den Kontrollwerten erhöht (Tab. 52-54). Bei der C57BL Maus fanden sich nur in Zone 2 nach 1 und 4 Wochen erhöhte MI, die zum 1 Wochen-Zeitpunkt mit dem erhöhten LI korrelierten.

Die MI beider Mäusestämme korrelierten nach Chloroformgabe ebenfalls gut mit den LI der Zonen, die hohe absolute Werte aufwiesen. In Zonen mit geringeren LI (Zone 1 und 3) fand sich eine nur schlechte Übereinstimmung mit der Mitoserate. Dies entsprach unseren Beobachtungen bei der Behandlung mit Phenobarbital, wo ebenfalls gute Korrelationen des MI mit dem LI in Zonen hoher Zellteilungsaktivität festgestellt werden konnten.

5.6.2.3 Apoptoseindex

In der Literatur fanden sich keine Angaben zu veränderten Apoptoseraten bei Mäusen nach Chloroformbehandlung. Bei unserer Untersuchung zeigte die B6C3F1 Maus nur nach 13 Wochen in Zone 2 und dadurch resultierend auch im Gesamt-AI signifikant gesteigerte Werte. Bei Betrachtung der Einzeltierwerte (Tab. 55-57) fiel gegenüber den Kontrolltieren eine vermehrte apoptotische Aktivität vor allem in Zone 2 auf, wobei es zu einer kontinuierlichen Zunahme über 13 Wochen kam (0,10-0,49 %). Die C57BL Maus wies in Zone 2 nach 1 Woche signifikant erhöhte AI auf. Zu den übrigen Zeitpunkten konnte aber auch bei den Einzeltierwerten (Tab. 97-99) keine deutliche Abweichung gegenüber den Kontrolltieren mehr festgestellt werden. Beide Stämme zeigten korrespondierend zur erhöhten Zellteilungsrate eine gesteigerte Apoptoserate. Der Apoptose kommt als Gegenspieler zur Zellteilung die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase zu (FERGUSON und ANDERSON, 1981; BURSCHE et al., 1994; CONSTAN et al., 1996). Da Chloroform in seiner Wirkungsweise keine Hemmung der Apoptoserate zugeschrieben wird, könnte die leicht verstärkte Apoptoseinduktion eine regulatorische Maßnahme sein, einer überschießenden regenerativen Zellproliferation entgegenzuwirken. So fanden auch CONSTAN et al. (1996) bei Ratten, denen Verunreinigungen aus dem Grundwasser verabreicht wurde, korrespondierend zur gesteigerten Zellproliferation eine erhöhte Apoptoserate. Damit übereinstimmend wurden bei der C57BL Maus nach 4 und 13 Wochen weder erhöhte LI noch AI gefunden.

5.6.3 Wyeth 14,643

Die Gruppe der Peroxisomenproliferatoren ruft sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten Lebertumoren hervor (LAWANI et al., 1982; REDDY und LAWANI, 1983; RAO et al., 1988b; ISENBERG, et al., 1997). Nach Wyeth 14,643-Applikation kam es bei Ratten und der CS^b Maus in der Leber zur Tumorentstehung (REDDY et al., 1979). Wir verwendeten Wyeth 14,643 als Positivsubstanz, da eine deutliche Erhöhung der Zellproliferationsrate in Mäuselebern beschrieben wurde (LANIER et al., 1989; ELDRIDGE et al., 1990; CUNNINGHAM et al., 1995; ISENBERG et al., 1997). In der Leber behandelte Tiere kommt es zu einem deutlich erhöhten Organgewicht, einer durch Peroxisomenproliferation hervorgerufenen Hepatozytenhyperplasie und -hypertrophie und einer vermehrten eosinophilen Granulierung der Hepatozyten (REDDY et al., 1977; MOODY und REDDY, 1978; LANIER et al., 1989; ELDRIDGE et al., 1990; LUNDGREN et al., 1990; ISENBERG et al., 1997).

In unserer Studie wiesen beide Mäusestämme ein hochgradig erhöhtes Lebergewicht auf (bis zu 152 %). Übereinstimmend mit der Literatur fand sich weiterhin eine Hypertrophie der Hepatozyten und die eosinophile Granulierung des Zytoplasma. Außerdem wiesen 7 von 29 Lebern der B6C3F1 Maus mehrere herdförmige bis konfluierende Nekrosen auf. Bei der C57BL Maus fanden sich die Nekrosen in insgesamt 16 von 30 Lebern. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der Nekrosen wäre eine zytotoxische Wirkung von Wyeth 14,643. Dies könnte im Zusammenhang mit dem für diese Substanzklasse diskutierten oxidativen Streß stehen (s. 2.2.3). NICOTERA et al. (1992) zeigten an isolierten Pankreaszellen, daß oxidativer Streß aufgrund der Störungen der Signaltransduktion der Zelle in geringem Ausmaß zu einer gesteigerten Zellproliferation führte. Stärkere Konzentrationen oxidativ wirkender Substanzen aktivierten jedoch verschiedene intrazelluläre Mechanismen (z. B. Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration), was zu einer gesteigerten Apoptoserate führen kann. Letztlich kam es in Folge der stark gestörten Signalübermittlung und der katabolen Reaktionslage zur Entstehung von Nekrosen.

5.6.3.1 Labelingindex

ELDRIDGE et al. (1990) fanden bei über 5 Tage mit Wyeth 14,643 behandelten B6C3F1 Mäusen LI von 28 %. In unserer Studie wiesen die Mäuse nach 1-wöchiger Behandlung ähnliche LI auf (B6C3F1: 30,85 %; C57BL: 33,34 %) Die von ELDRIDGE et al. (1990) gefundenen, etwas geringeren Werte lassen sich auf die Verwendung einer 6 Tage-Pumpe und eine kürzere Substanzapplikation (5 Tage) zurückführen. CUNNINGHAM et al. (1995) ermittelten LI von über 60 %. Die differierenden LI sind eventuell durch das unterschiedliche Alter der Tiere und die unterschiedliche Auswertstrategie zu erklären. Wenn vor allem in der Zone mit der stärksten Zellteilung (Zone 1) ausgewertet wird, was bei einer zufälligen Wahl der Meßfelder nicht ausgeschlossen werden kann, werden deutlich höhere LI ermittelt (B6C3F1: 46,23 %; C57BL: 55,53 %). SMITH et al. (1991) fanden in CD-1 Mäusen, die Wyeth 14,643 erhielten, über 5 Wochen eine anhaltend gesteigerte Zellproliferationsrate. Wir konnten dies bei beiden Stämmen sogar über einen Zeitraum von 13 Wochen demonstrieren. Bei der Ratte wurde nach Wyeth 14,643-Gaben ein vermehrt periportales Labelingmuster beschrieben (MARSMAN et al., 1988; ELDRIDGE et al., 1990; SMITH et al., 1991; STEPHAN, 2001), wohingegen für Mäuse eine panlobuläre Verteilung der gelabelten Hepatozyten beschrieben wurde (ELDRIDGE et al., 1990; SMITH et al., 1991). ISENBERG et al. (1997) ermittelten bei initiierten B6C3F1 Mäusen in der periportalen Zone einen 5,2-fach erhöhten LI im Gegensatz zu einem 3,6-fach erhöhten LI in der zentrolobulären Zone.

Im Rahmen der zonalen Auswertung fanden wir bei beiden Mäusestämmen und zu allen 3 Zeitpunkten die stärkste Erhöhung der Zellteilungsrate in Zone 1, wobei nach 1 Woche die deutlichsten Anstiege zu finden waren (B6C3F1 Maus: 165,1-fach; C57BL Maus: 48,3-fach). Die durch Wyeth 14,643 hervorgerufenen, in der gesamten Leber erhöhten LI können ein panlobuläres Muster vortäuschen. So kann das Übersehen der Zone 1 als Hauptproliferationszone erklärt werden. Die absolut höchsten LI in Zone 2 erschweren das Erkennen der höchsten Proliferationssteigerungsrate in Zone 1 noch zusätzlich.

Beim Vergleich beider Mäusestämme fiel in allen Zonen ein initialer Peak nach 1 Woche auf. Nach 4 Wochen kam es bei beiden Stämmen zu einem Abfall der LI in allen Zonen und nach 13 Wochen zu einem erneuten deutlichen Anstieg, letzteres mit Ausnahme der Zone 1 der B6C3F1 Maus. Die C57BL Maus zeigte bis auf den Behandlungszeitpunkt von 1 Woche stärkere Anstiege des LI als die B6C3F1 Maus. Dies korrelierte mit den bei der C57BL Maus vermehrt aufgetretenen herdförmigen Nekrosen (C57BL: 16 von insgesamt 30 Lebern betroffen, B6C3F1: 6 von insgesamt 29 Lebern betroffen). Somit kann ein regenerativer Mechanismus als Ursache der Zellproliferationssteigerung nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen zur Wirkung von Peroxisomenproliferatoren, im Besonderen von Wyeth 14,643, auf die Lebern dieser beiden Mäusestämme wären notwendig, um diesen Effekt besser beurteilen zu können.

Eine mögliche Erklärung für das von uns gefundene Absinken des LI nach 4-wöchiger Behandlung könnte in einer Erschöpfung der räumlichen Kapazitäten der Leber aufgrund der extremen Zellproliferation liegen. Die nach 4 Wochen gesteigerte Apoptoserate und die auftretenden Nekrosen führen zu einer Abnahme der Zellzahl, was möglicherweise eine erneute Erhöhung des LI zulässt.

5.6.3.2 Mitoseindex

Bei beiden Mäusestämmen kam es nach 1 Woche zu einem deutlichen Anstieg der MI mit Ausnahme der Zone 3. Der stärkste Anstieg fand sich korrespondierend zum höchsten LI in Zone 1 der B6C3F1 Maus (0,23 %). In Zone 2 konnte der Abfall der LI nach 4 Wochen und der Wiederanstieg nach 13 Wochen nachvollzogen werden (B6C3F1 Maus: 0,30 %, 0,10 % und 0,24 %; C57BL Maus: 0,75 %, 0,53 % und 0,71 %). In den Zonen 1 und 3 fand sich eine nur schlechte Übereinstimmung mit den LI. Es zeigte sich auch hier, wie in den vorangegangenen mit Substanzen behandelten Gruppen, eine relativ gute Korrelation des MI mit den LI in Zone 2, der Zone mit der höchsten Zellteilungsrate. In den übrigen Zonen konnte nur eine mäßige Übereinstimmung festgestellt werden.

5.6.3.3 Apoptoseindex

Für die Gruppe der Peroxisomenproliferatoren wird die Hemmung der Apoptoserate als ein Mechanismus der kanzerogenen Wirkung beschrieben (BAYLY et al., 1994; ROBERTS et al., 1995; JAMES und ROBERTS, 1996). Diese Daten wurden jedoch zum größten Teil durch in vitro Versuche, nicht aber in der Mäuseleber und nicht mit der von uns verwendeten Substanz Wyeth 14,643 ermittelt. Sowohl in Ratten- als auch in Mäuselebern wurde nach der Behandlung mit Wyeth 14,643 eine Erhöhung der Apoptoserate festgestellt (Ratte bis zu 4-fach; Maus bis zu 1,6-fach) (ISENBERG et al., 1997; MARSMANN et al., 1992; STEPHAN, 2001). Die Tiere unserer Studie wiesen mit Ausnahme der Zone 1, wo der AI zu allen 3 Zeitpunkten bei 0 % lag, erhöhte AI auf. Hierbei fiel bei der B6C3F1 Maus eine kontinuierliche Steigerung in den Zonen 2 und 3 über 13 Wochen auf (Zone 2: 0,1 %, 0,15 % und 0,29 %; Zone 3: 0,19 %, 0,40 %, und 0,64 %). Die C57BL Maus wies erst nach 4 Wochen in den Zonen 2 und 3 erhöhte AI auf (Zone 2: 0,28 % und 0,24 %; Zone 3: 1,02 % und 1,20 %). Die höchsten Werte waren bei beiden Stämmen in der Zone 3 zu finden. Bei der C57BL Maus fand sich mit 1,2 % der absolut höchste AI.

ISENBERG et al. (1997) bestimmten den AI bei zuvor initiierten Mäusen, was die im Vergleich zu den von uns ermittelten höhere Werte erklären könnte. McCONKEY et al. (1988) wiesen in isolierten Hepatozyten Chromatinkondensation sowie DNA-Fragmentation nach, nachdem sie die Zellen oxidativem Streß ausgesetzt hatten. Sie machten den oxidativen Streß der Zelle für die Aktivierung von Prozessen verantwortlich, die der Apoptose sehr ähnlich sind. NICOTERA et al. (1992) beschrieben in Zellkulturen ebenfalls apoptotische Vorgänge, wenn die Zellen in geringen Ausmaß oxidativem Streß ausgesetzt wurden. Dieser Wirkmechanismus ist für Wyeth 14,643 jedoch noch nicht nachgewiesen. Trotz der sehr hohen LI in Zone 1 nach 1 Woche fanden sich hier keine vermehrten Apoptosen. Eventuell fand eine selektive Hemmung der Apoptose in Zone 1 statt, was jedoch aufgrund der zu geringen Kontrollwerte nicht belegt werden konnte.

5.7 Bedeutung der zonalen Zellproliferation

Am Beispiel von Phenobarbital konnten wir für beide Mäusestämme zeigen, daß die getrennte Auswertung der unterschiedlichen Hepatozytenpopulationen für die Beurteilung der substanzbedingten Veränderung in der Zellproliferationsrate unerlässlich ist. Übereinstimmend mit der Literatur fand sich bei Bestimmung des Gesamt-LI ein initialer Anstieg, zu späteren

Zeitpunkten nur ein geringgradiger Anstieg (1,2-fach) und bei der C57BL Maus sogar ein geringer Abfall (0,9-fach) gegenüber den Kontrolltieren. Mit Hilfe der LZM-Methode konnten jedoch in der Zielzone von Phenobarbital (Zone 3) nach 4 Wochen (B6C3F1: 6,6-fach; C57BL: 3,8-fach) und auch nach 13 Wochen (B6C3F1: 3-fach; C57BL: 2-fach) noch erhöhte LI nachgewiesen werden. Der Umgang mit transienten Zellproliferationssteigerungen gilt im Hinblick auf die Beurteilung eines kanzerogenen Potentials als schwierig (JIRTLE et al., 1991). Für die Ratte wurden Zellproliferationserhöhungen über einen Zeitraum von 1 Woche nach Phenobarbitalgaben beschrieben (PERAINO et al., 1975), wohingegen für die Tumorpromotion eine kontinuierliche Verabreichung von Phenobarbital über mindestens 3 Monate nötig sein soll (PREAT et al., 1987). Hiermit wurde nun erstmals für Phenobarbital ein anhaltend erhöhter LI in der Leber von bis zu 13 Wochen nachgewiesen.

Für zytotoxisch wirkende Substanzen wie Chloroform wird für die Ratte ein initialer Peak der Zellproliferation in Zone 1 beschrieben, der dann im zeitlichen Verlauf zur Zone 3 wandert (RABES et al., 1976; LEE et al., 1998). Unter Chloroformbehandlung war nach 1 Woche bei beiden Stämmen Zone 1 die Hauptproliferationszone (B6C3F1: 6,8-fach; C57BL: 9,4-fach). Bei der B6C3F1 Maus fanden sich in Zone 2 jedoch annähernd gleich große Anstiege im LI (6,4-fach). Wir konnten bei diesen Mäusen nach 4 Wochen eine Verschiebung der Hauptproliferationszone zur Zone 3 beobachten. Nach 13 Wochen lag sie jedoch wieder in Zone 1. Die absolut höchsten Werte fanden sich jedoch zu allen 3 Zeitpunkten deutlich in Zone 2 (11,0-17,3 %). Für die B6C3F1 Maus kann somit nur zum Teil das für die Ratte beschriebene, durch zytotoxische Substanzen hervorgerufene Proliferationsmuster bestätigt werden. Eine Erklärung für die hohen LI in Zone 2 könnte mit den gefundenen histopathologischen Veränderungen, die vorrangig in dieser Zone auftraten, im Zusammenhang stehen. Dies würde bedeuten, daß sich in dem Gebiet, in dem Zellen untergehen, noch intakte Zellen teilen und so die Verluste auszugleichen versuchen.

Der Grund für das „Wandern“ der Proliferationszonen muß zur Zeit noch offen bleiben. Es kann nach längerandauernder Verabreichung zytotoxischer Substanzen eine Ausweitung der Regenerationstätigkeit der Hepatozyten auf andere Zonen als der Hauptangriffszone der Leber in Betracht gezogen werden. Die absolut höchsten LI finden sich jedoch vor allem im Bereich der zytotoxischen Wirkung.

Nach der Behandlung mit Wyeth 14,643 fanden sich bei beiden Mäusestämmen die deutlichsten Anstiege der Zellteilungsrate in Zone 1. Dieser Effekt fiel bei einfacher

Betrachtung der Schnitte aufgrund der insgesamt hohen LI nicht weiter auf. In der Literatur wird für die Maus nach der Gabe von Wyeth 14,643 ein panlobuläres Labelingmuster beschrieben (ELDRIDGE et al., 1990; SMITH et al., 1991). In diesen Studien wurde jedoch keine differenzierte zonale Auswertung vorgenommen. Somit kann das Vorhandensein einer Zielzone einer bestimmten Substanz übersehen werden, insbesondere wenn in allen Zonen relativ hohe LI vorliegen, was bei der Behandlung mit Wyeth 14,643 der Fall war.

5.8 Beurteilung der Mitose- und Apoptoserate

Bei Betrachtung des MI fand sich eine gute Korrelation mit dem LI bei beiden Mäusestämmen in Zone 2. Dies traf sowohl für unbehandelte Lebern als auch nach Substanzapplikation zu. In den übrigen Zonen konnte nur eine mäßige bis nicht vorhandene Übereinstimmung beobachtet werden. Wir führen dies auf die generell hohe Zellteilungsrate in Zone 2 zurück. Bei unbehandelten Tieren fanden sich zu 100 % die höchsten LI in Zone 2, bei Tieren mit Substanzapplikation traf dies noch in 67 % der Fälle zu. Da die Mitosephase innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne (~1 Stunde) durchlaufen wird, ist vor allem in postmitotischem Gewebe wie der Leber die Wahrscheinlichkeit, dieses Ereignis zu entdecken, relativ gering. Mit gesteigerter Teilungsrate erhöht sich die Chance, ein solches Ereignis zu detektieren, was sich in unserer Untersuchung in der relativ hohen Mitoserate in Zone 2 widerspiegelt. Für die Mäuseleber stellt die Mitoserate somit keine geeignete Methode dar, substanzbedingte Unterschiede zu bestimmen und zu bewerten. Für die Zone 2 konnten wir jedoch den Nachweis erbringen, daß MI und LI gut korrelieren. Dies spricht dafür, daß schließlich die in der S-Phase markierten Zellen auch die Mitosephase durchlaufen.

Eine Beurteilung der Apoptoserate fiel aufgrund der sehr geringen Kontrollwerte schwer. Es konnte somit auch keine substanzbedingte Hemmung der Apoptoserate nachgewiesen werden, was z. B. für Phenobarbital beschrieben wurde (BURSCH et al., 1984; SCHULTE-HERMANN et al., 1989). Für die Apoptoserate werden auch in der Literatur nur sehr geringe Werte angegeben, weshalb eine Beurteilung generell als schwierig einzustufen ist. Da die mit Hilfe der LZM-Methode ermittelten Werte jedoch unter den in der Literatur angegebenen AI liegen, sollte für zukünftige Arbeiten eine Methode angewandt werden, bei der eine größere Anzahl an Feldern und Zellen ausgewertet werden. Allerdings konnte die für die Klasse der Peroxisomenproliferatoren beschriebene Hemmung der Apoptose nicht bestätigt werden. Für Wyeth 14,643, ein Mitglied dieser Klasse, konnten wir die absolut höchsten AI der gesamten Studie ermitteln.

5.9 Bedeutung der gesteigerten Zellproliferation und Unterschiede zwischen den Mäusestämmen

Es bestehen noch immer Schwierigkeiten bei der Beurteilung von Zellproliferationsdaten im Zusammenhang mit der Tumorentstehung. Für einige Substanzen konnte eine gute Korrelation zwischen gesteigerter Zellproliferation und der Tumorentstehung gefunden werden (MARSMAN et al., 1988; BUTTERWORTH et al., 1995). Ein großes Problem für die Beurteilung stellen nach wie vor Substanzen dar, welche nur einen transienten Anstieg der Zellproliferation hervorrufen.

Die Entstehung von Tumoren konnte bei der B6C3F1 Maus nach Verabreichung von Chloroform beobachtet werden (National Cancer Institute, 1976). Die von uns gemessene Zellproliferation korreliert bei Chloroform gut mit der in der Literatur beschriebenen Tumorentstehung. Bei der B6C3F1 Maus war der Gesamt-LI mindestens 4-fach, die zonalen LI mindestens 3-fach über die Dauer von 13 Wochen erhöht. Für die C57BL Maus hingegen wurde bisher kein Auftreten von Tumoren nach Chloroformapplikation beschrieben. Hier fand sich ein deutlicher Anstieg in der Zellproliferation nach 1 Woche (bis zu 9-fach). Nach 4 und 13 Wochen waren nur noch in Zone 2 sehr gering erhöhte LI vorhanden (2-fach und 1,2-fach), die übrigen Zonen lagen zum Teil sogar unterhalb der Kontrollwerte. Hier stellt sich das Problem der Beurteilung vorübergehend erhöhter LI. In der von ROE et al. (1979) durchgeführten Studie wurde mit einer weit niedrigeren Dosierung als in der Studie des National Cancer Institute gearbeitet. Es müßte deshalb abgeklärt werden, ob nicht ähnliche Dosierungen, wie sie in der Studie mit der B6C3F1 Maus verwendet wurden, auch bei der C57BL Maus zu Tumoren führen würden. Bei der Zellproliferationsrate zeigte die C57BL Maus mit ihrem Anstieg für nur 1 Woche jedoch eine deutliche Resistenz gegenüber Chloroform verglichen mit der B6C3F1 Maus, die eine gesteigerte Zellteilungsrate von über 13 Wochen aufwies. Dies könnte somit ein wichtiger Faktor in der unterschiedlichen Tumoranfälligkeit darstellen. Auch werden trotz der zytotoxischen Wirkung und vorhandener Nekrosen bei der C57BL Maus keine deutlich erhöhten LI nach 4 und 13 Wochen beobachtet. Es besteht somit die Möglichkeit, daß die C57BL Maus die Fähigkeit besitzt, ihre Zellteilungsrate im Vergleich zur B6C3F1 Maus besser zu kontrollieren.

Die beschriebene, durch Phenobarbital hervorgerufene transiente Steigerung der Zellproliferation (COUNTS et al., 1996; KOLAJA et al., 1996c; ORTON et al., 1996; SCHAFER und KLAUNIG, 1991) verursachte Probleme bei der Korrelation mit der für die B6C3F1 Maus gefundenen Tumorentstehung. Unsere Daten weisen nun erstmals eine gute Korrelation der Zellproliferation über 13 Wochen auf. Hierbei ist jedoch eine zonale Auswertung unerlässlich,

da nur in Zone 3 der B6C3F1 Maus andauernd mindestens 3-fach erhöhte LI detektiert werden konnten. Bei alleiniger Betrachtung des Gesamt-LI zum Zeitpunkt von 13 Wochen konnte keine deutliche Abweichung zwischen behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden. Dies bekräftigt nochmals die Wichtigkeit der zonalen Auswertung.

Bei der C57BL Maus kommt es nach Phenobarbitalgaben jedoch nicht zur Tumorentstehung. Dennoch weist sie in Zone 3 nach 13 Wochen noch 2-fach erhöhte LI auf. Es besteht somit die Möglichkeit, daß in diesem Fall noch weitere Faktoren einen Einfluß auf die Tumorentstehung haben. So kann die C57BL Maus im Gegensatz zur B6C3F1 Maus trotz der durch Phenobarbital gesteigerten Zellproliferation den Methylierungsstatus der DNA aufrechterhalten (RAY et al., 1994; COUNTS et al., 1996). Dem verringerten Methylierungsstatus der DNA wird ebenfalls ein tumorigenes Potential zugeschrieben (RAZIN und KAFRI, 1994). Außerdem wurde in Hepatozyten der B6C3F1 Maus nach Phenobarbital Exposition eine Hemmung der interzellulären Kontakte festgestellt, die bei der C57BL Maus unbeeinflusst blieben. (KLAUNIG und RUCH, 1987; RUCH et al., 1987). Dies stellt einen weiteren Mechanismus der Tumorentstehung dar, der substanzbedingt beeinflusst wird (TROSKO und GOODMAN, 1994). So scheinen zusätzlich zur erhöhten Zellteilungsrate andere stammspezifische Unterschiede einen Einfluß auf die Tumorentstehung oder deren Hemmung zu haben.

Wyeth 14,643 rief bei beiden Stämmen die stärkste Zellproliferationssteigerung hervor, die über den gesamten Beobachtungszeitraum und in allen Zonen mindestens 3,7-fach gegenüber den Kontrolltieren erhöht war. Eine Korrelation mit der Tumorentstehung war aufgrund fehlender Untersuchungen zum Auftreten von Tumoren nach unserem Behandlungsprotokoll bei beiden Stämmen nicht möglich. Für Ratten wurde eine gute Übereinstimmung zwischen einer Wyeth 14,643-induzierten Zellproliferationssteigerung und einer erhöhten Tumorrates beschrieben (MARSMAN et al., 1988). Bei CS^b Mäusen kam es nach der Applikation von Wyeth 14,643 zu einer erhöhten Tumorrates (REDDY et al., 1979). Dies läßt in Anbetracht der über 13 Wochen so deutlich erhöhten Zellteilungsrate den Verdacht zu, daß es auch bei den von uns untersuchten Stämmen zur Tumorentstehung gekommen wäre. Um dies letztlich zu klären, ist ein Nachweis des kanzerogenen Potentials von Wyeth 14,643 in den Lebern dieser beiden Mäusestämme notwendig.

5.10 Beitrag zu einer Datenbank für Zellproliferationsdaten

Diese Arbeit soll einen Beitrag zu der von GOLDSWORTHY et al. (1991) geforderten Datenbank für chemisch induzierte Zellproliferation leisten. Nur anhand einer ausreichend großen Datenmenge über Zellproliferationsstudien kann ein besseres Verständnis der kausalen Zusammenhänge von Dauer, Höhe und Ursache einer vermehrten Zellteilung und einer späteren Tumorentstehung erzielt werden. Als Voraussetzung für die Einrichtung einer solchen Datenbank fordern GOLDSWORTHY et al. (1991) standardisierte Bedingungen, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Studien zu erreichen. Unsere Studie entspricht in weiten Teilen diesen Anforderungen: um die tierspezifischen Schwankungen möglichst gering zu halten, wurden 10 Tiere pro Gruppe eingesetzt. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 10 Wochen alt, so daß nicht mit vermehrten Ausreißern beim LI aufgrund des unterschiedlichen Größenwachstums junger Tiere zu rechnen war. Die Messungen fanden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten und über einen Zeitraum von 13 Wochen statt, um den Verlauf und die Dauer der Proliferationssteigerung beurteilen zu können. Mit den ausgewerteten 3000 Hepatozyten/Leber liegen wir deutlich über der üblichen Anzahl von 1000 bis 2000 ausgewerteten Zellen. Durch Anwendung der LZM-Methode erhielten wir für den Gesamt-LI vergleichbare Ergebnisse, wie sie in der Literatur beschrieben wurden. Als deutlicher Vorteil hat sich dabei die zusätzliche Möglichkeit der getrennten Betrachtung der 3 Zonen erwiesen, wodurch substanzbedingte zonale Effekte erfaßt werden konnten. Dadurch konnte z. B. für Phenobarbital erstmals eine bis zu 3-fach gesteigerte Zellteilungsrate in Zone 3 über einen Behandlungszeitraum von 13 Wochen und damit eine gute Korrelation zur Tumorentstehung nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß Änderungen in der Zellproliferationsrate entdeckt werden können, die bei einer zufälligen Wahl der Meßfelder bisher nicht beschrieben wurden.

6 Zusammenfassung

1. In der Literaturübersicht wird ein Überblick über die Bedeutung der Zellproliferation für die chemische Karzinogenese vermittelt. Es finden sich Angaben zu den verschiedenen Proliferationsmarkern und Auswertungsstrategien, die in Zellproliferationsstudien der Mäuseleber Anwendung finden. Es wird dabei im Besonderen auf die Bedeutung der Zonalität der Leber im Zusammenhang mit der Erhebung von Zellproliferationsdaten eingegangen.
2. Zur Untersuchung stand Lebergewebe zweier Mäusestämme aus S-Phasen-Response Studien der Abteilung Toxikologie der BASF AG zur Verfügung. Bei den Mäusen handelte es sich um männliche Tiere, die zu Beginn der Studien 10 Wochen alt waren. Die B6C3F1 Maus gilt als anfällig für die Entwicklung von Lebertumoren, während sich die C57BL Maus als tumorresistent erwiesen hat.
3. Um die notwendige Verweildauer für optimale Labelingergebnisse zu eruieren, wurde der Zellproliferationsmarker BrdU mittels einer für 7 oder 3 Tage subkutan implantierten osmotischen Minipumpe oder einer einmaligen intraperitonealen Injektion appliziert. Bei beiden Mäusestämmen erwies sich nur die 7-Tage Pumpe als geeignet, ausreichend hohe Labelingindizes (LI) zu erzielen. Der LI berechnete sich als Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl.
4. Es wurde die Wirkung von 3 bekannten nicht-genotoxischen Leberkarzinogenen auf die Zellteilungsrate untersucht. Es handelte sich dabei um Phenobarbital, Chloroform und Wyeth 14,643. Die Substanzen wurden den Tieren über die Zeiträume von 1, 4 und 13 Wochen verabreicht. Der LI wurde mit Hilfe einer 7-Tage Pumpe ermittelt.
5. Für verschiedene Substanzen wurde eine promovierende Wirkung vor allem auf bestimmte Hepatozytenpopulationen beschrieben (CHEN et al., 1995; CONSTAN et al., 1995; BAHNEMANN, 2000). Um einen eventuell vorhandenen zonalen Effekt der verwendeten Substanzen zu detektieren, wurde als Meßverfahren die lobule-dependent zonal measurement (LZM) Methode (BAHNEMANN und MELLERT, 1997) gewählt. Innerhalb des Leberläppchens wurde in 3 gleichgroßen Zonen gemessen, wobei Zone 1 an das Portalfeld, Zone 3 an die abführende Vene grenzte und Zone 2 dazwischen lag.

6. Bei unbehandelten Tieren beider Mäusestämme stellte die Zone 2 zu allen 3 Meßzeitpunkten die Hauptproliferationszone dar. Dies steht im Gegensatz zu der von ZAJICEK et al. (1985) an Ratten entwickelten Hypothese der „streaming liver“, wonach in Zone 1 die höchste proliferative Aktivität vorliegt.
Die B6C3F1 Maus wies nach 4 und 13 Wochen gegenüber der C57BL Maus höhere LI auf, was mit der deutlich höheren Spontantumorraterate der B6C3F1 Maus korreliert.
7. Phenobarbital rief bei beiden Stämmen eine anhaltend gesteigerte Zellteilung über 13 Wochen hervor. Nach 4 und 13 Wochen waren die erhöhten LI auf Hepatozyten der Zone 3 begrenzt und wären ohne die zonal-differenzierte Auswertung nicht entdeckt worden. Bisher wurde für Phenobarbital eine erhöhte Zellteilungsrate nur für einen Zeitraum von 1 bis 4 Wochen beschrieben.
8. Chloroform verursachte bei B6C3F1 Mäusen eine anhaltend gesteigerte Zellproliferation in allen Zonen über 13 Wochen. Die C57BL Maus wies nur nach 1 Woche erhöhte LI auf, zu den übrigen Zeitpunkten lagen die LI wieder auf Kontrollniveau.
9. Wyeth 14,643 rief bei beiden Mäusestämmen zu allen 3 Zeitpunkten und in allen Zonen eine ausgeprägte Zellteilung hervor. Hauptproliferationszone war die Zone 1.
10. Mit Hilfe der LZM-Methode wurden ebenfalls die Mitose- und Apoptoserate ermittelt. Die Mitoserate, als Kontrolle der S-Phasen-Response, korrelierte gut mit dem LI in Zonen mit hoher Zellteilungsrate. Deutlich gesteigerte Apoptoseraten fanden sich nach der Behandlung mit Wyeth 14,643 in den Zonen 2 und 3.
11. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Auswertung der Zellteilungsrate in der Leber unter Beachtung der Zonalität notwendig ist, da einige Substanzen vor allem auf bestimmte Zonen wirken. Bei einer alleinigen Betrachtung des Gesamt-LI können Substanz-induzierte Effekte übersehen werden. Es konnten stammesspezifische Unterschiede in der Zellteilungsrate aufgezeigt werden, die mit der unterschiedlichen Tumorprävalenz übereinstimmten. Weiterhin wurde ein Beitrag zu einer Datenbank geleistet, die als Grundlage für die Erstellung eines Kurzzeittestes zur Beurteilung des kanzerogenen Potentials nicht-genotoxischer Karzinogene dienen soll.

7 Summary

1. The bibliographical review gives an overview on the importance of cell proliferation. The various markers and evaluation strategies for cell proliferation in mouse liver are discussed, in particular the importance to consider the zonality in the liver when evaluating cell proliferation data.
2. For our investigation, we used liver tissue of male B6C3F1 mice and male C57BL mice from two different “S-phase-response studies” performed at the Department of Toxicology of the BASF Incorporation, Ludwigshafen, Germany. The B6C3F1 mouse is considered to be susceptible to liver tumor formation whereas the C57BL mouse is considered to be resistant to the formation of liver tumors. The animals were 10 weeks old at the beginning of the study.
3. Osmotic mini pumps containing the cell proliferation marker BrdU were implanted subcutaneously in mice for 3 to 7 days. A third group was injected intraperitoneally with a single dose of BrdU 2 hours prior to death. Only the 7 day mini pump produced a sufficient labeling index (LI) in both strains. The LI was calculated by estimating the part of labeled hepatocyte nuclei of the total counted cell number.
4. The effects of three non-genotoxic hepatocarcinogens on cell proliferation in the liver were evaluated. Animals were treated with phenobarbital, chloroform and Wyeth 14,643 for 1, 4, and 13 weeks. The LI was determined using a 7 day mini pump.
5. Some compounds seem to have a proliferative effect only on certain populations of hepatocytes (CHEN et al., 1995; CONSTAN et al., 1995; BAHNEMANN, 2000). Cell proliferation was measured by the lobule-dependent zonal measurement method (LZM, BAHNEMANN and MELLERT, 1997) to detect increases in cell proliferation of hepatocytes in specific zones. The liver lobule was divided into three equal parts with the zone 1 representing the periportal zone, the zone 3 lying close to the central vein and the zone 2 between the two other zones.

6. In control animals of both strains, zone 2 was found to be the zone with the highest proliferative activity. This finding stays in contrast to the hypothesis of the streaming liver developed by ZAJICEK et al. (1985) for rat livers reporting that zone 1 reveals the highest proliferative activity.
The B6C3F1 mouse showed higher LI after 4 and 13 weeks compared to the C57BL mouse. This might correlate with the higher tumor prevalence in this strain.
7. Phenobarbital produced in both strains a sustained increase in cell proliferation for up to 13 weeks. After 4 and 13 weeks elevated LI were found only in zone 3. When using a random evaluation scheme, these differences of the LI would not have been detected. This may be the reason that the literature is reporting up to now that application of phenobarbital is producing an increase in cell proliferation only for a time period of 1-4 weeks.
8. B6C3F1 mice treated with chloroform showed a sustained increase in cell proliferation in all zones for up to 13 weeks. In C57BL mice treated with chloroform an elevated LI could only be detected after 1 week.
9. Wyeth 14,643 produced in both mouse strains at all 3 timepoints and in all 3 zones a marked increase in cell proliferation with a predominance in zone 1.
10. Mitotic and apoptotic rates were evaluated by using the LZM method. Zones with high proliferative activity also showed increases in the mitotic index. A marked increase in the apoptotic rate could be seen after treatment with Wyeth 14,643.
11. The necessity of zonal dependent evaluation of cell proliferation in the liver could be demonstrated as a consequence of the induction of cell proliferation in a specific zone observed with some compounds. When measuring the LI randomly throughout the whole liver there is always the risk to miss these compound specific effects. It was possible to show strain specific differences in cell proliferation that correlated with the different strain specific tumor prevalence.
Furthermore, this work is giving important cell proliferation data useful for a database for short-time carcinogenicity testing which could evaluate the carcinogenic potential of various non-genotoxic carcinogens.

8 Anhang

8.1 Abbildungen

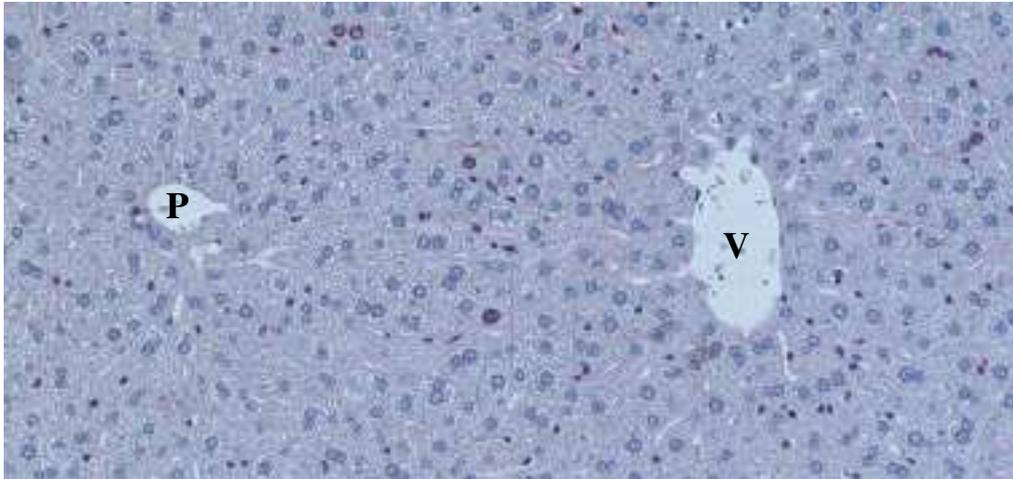


Abb. 9: B6C3F1 Maus. Leber eines Kontrolltieres nach 1-wöchiger Versuchsdauer, 7 Tage-BrdU-Pumpe. LSAB-Methode, Hämatoxylin-Gegenfärbung, x 185. Einzelne positive Zellen in Zone 2.

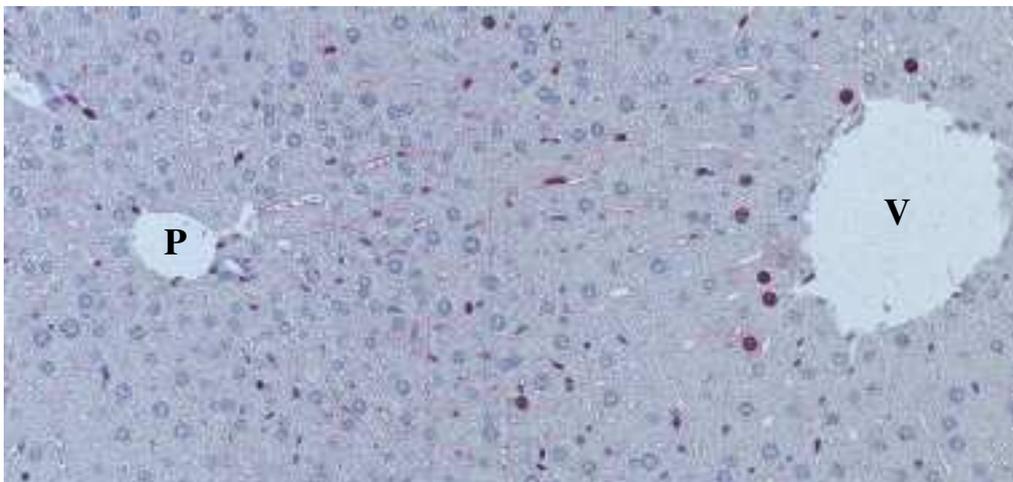


Abb. 10: B6C3F1 Maus. Leber eines mit Phenobarbital behandelten Tieres 1 Woche nach Versuchsbeginn, 7 Tage-BrdU-Pumpe. LSAB-Methode, Hämatoxylin-Gegenfärbung, x 185. Positive Zellen liegen größtenteils in Zone 3.

P: Portalfeld, V: abführende Vene

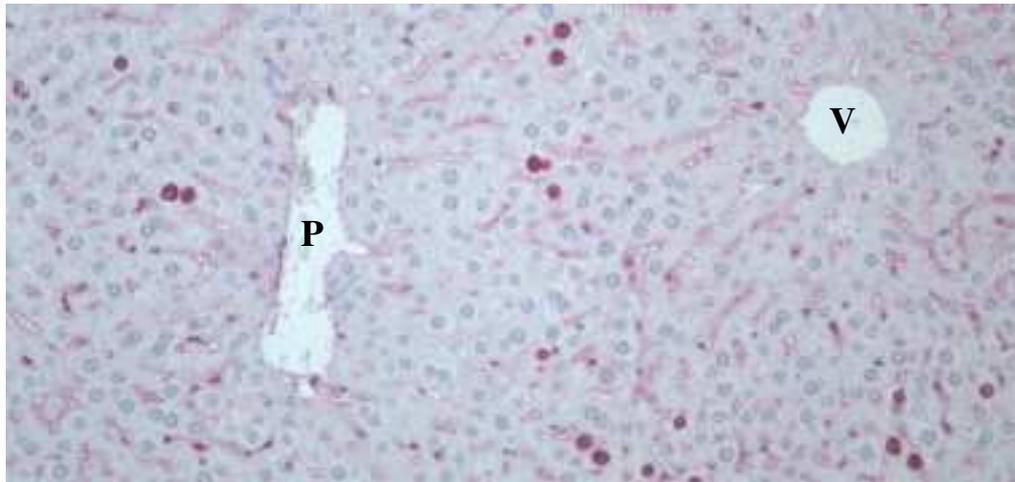


Abb. 11: B6C3F1 Maus. Leber eines mit Chloroform behandelten Tieres 1 Woche nach Versuchsbeginn, 7 Tage-BrdU-Pumpe. LSAB-Methode, Hämatoxylin-Gegenfärbung, x 185. Positive Zellen befinden sich vor allem in Zone 2.

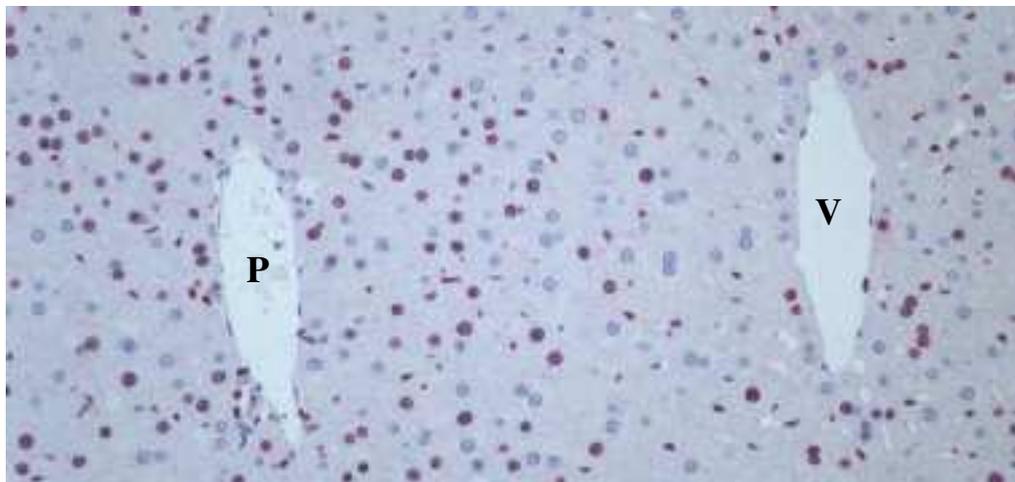
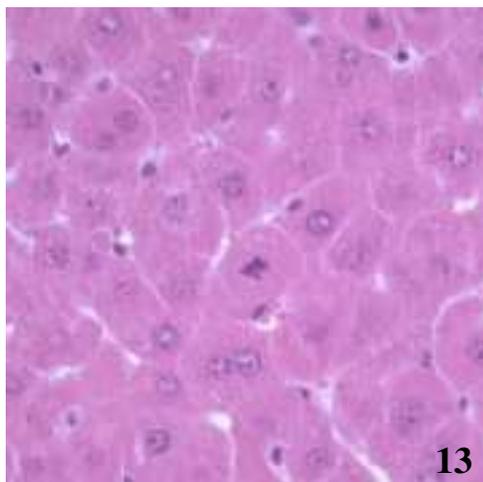
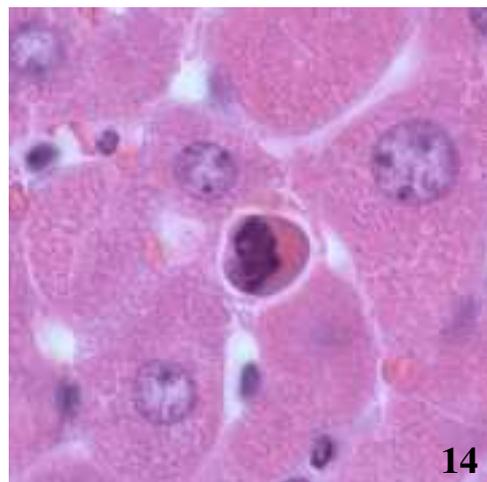


Abb. 12: C57BL Maus. Leber eines mit Wyeth 14,643 behandelten Tieres 1 Woche nach Versuchsbeginn, 7 Tage-BrdU-Pumpe. LSAB-Methode, Hämatoxylin-Gegenfärbung, x 185. Positive Zellen in allen Zonen, leicht vermehrt in Zone 1.



13



14

Abb. 13 und 14: C57BL Mäuse. Lebern mit Wyeth 14,643 behandelte Tiere, HE-Färbung. **13**) Mitosefigur nach 1-wöchiger Behandlung, x 370. **14**) Apoptose nach 13-wöchiger Behandlung, x 925.

P: Portalfeld, V: abführende Vene

8.2 B6C3F1 Maus

8.2.1 Labelingindizes

Tab. 22: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche (2 h i. p. Pulseinjektion)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,27	0,00	0,09
2	0,00	0,17	0,00	0,06
3	0,00	0,20	0,00	0,07
4	0,00	1,20	0,00	0,40
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,10	0,00	0,03
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,45	0,00	0,15
9	0,00	0,35	0,00	0,12
10	0,00	0,41	0,00	0,14
Median	0,00	0,24	0,00	0,08

Tab. 23: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen (2 h i. p. Pulseinjektion)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,25	0,00	0,08
2	0,00	0,17	0,00	0,06
3	0,00	0,89	0,00	0,30
4	0,15	0,08	0,00	0,08
5	0,00	0,68	0,00	0,23
6	0,10	0,32	0,00	0,14
7	0,00	0,29	0,00	0,10
8	0,00	0,40	0,00	0,13
9	0,10	0,29	0,00	0,13
10	0,00	0,27	0,00	0,09
Median	0,00	0,29	0,00	0,12

LI = Labelingindex, h = Stunde, i. p. = intraperitoneal

Tab. 24: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen (2 h i. p. Pulseinjektion)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,64	0,00	0,21
2	0,00	0,46	0,00	0,15
3	0,00	0,47	0,00	0,16
4	0,00	0,09	0,00	0,03
5	0,00	0,90	0,20	0,37
6	0,00	0,52	0,21	0,24
7	0,00	0,38	0,00	0,13
8	0,00	0,46	0,00	0,15
9	0,00	0,09	0,00	0,03
10	0,00	0,16	0,00	0,05
Median	0,00	0,46	0,00	0,15

Tab. 25: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche (3 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	1,17	0,00	0,39
2	0,17	1,17	0,00	0,45
3	0,00	1,57	0,00	0,52
4	0,00	1,14	0,00	0,38
5	0,00	0,96	0,21	0,39
6	0,00	2,23	0,00	0,74
7	0,21	0,66	0,08	0,32
8	0,00	0,57	0,10	0,22
9	0,65	0,94	0,00	0,53
10	0,28	3,03	0,50	1,27
Median	0,00	1,12	0,00	0,42

LI = Labelingindex, h = Stunde, i. p. = intraperitoneal, d = Tag

Tab. 26: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen (3 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	1,07	0,00	0,36
2	0,00	1,64	0,00	0,55
3	0,45	1,95	0,00	0,80
4	0,00	1,53	0,00	0,51
5	0,00	1,64	0,00	0,55
6	0,00	3,06	0,00	1,02
7	0,00	0,49	0,00	0,16
8	0,00	1,23	0,00	0,41
9	0,00	1,28	0,00	0,43
10	0,11	3,46	0,31	1,29
Median	0,00	1,59	0,00	0,53

Tab. 27: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen (3 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,08	2,13	0,09	0,77
2	0,00	0,91	0,00	0,30
3	0,00	0,68	0,10	0,26
4	0,00	1,68	0,00	0,56
5	0,00	1,29	0,09	0,46
6	0,00	2,38	0,23	0,87
7	0,08	1,10	0,00	0,39
8	0,48	2,77	0,00	1,08
9	0,18	1,81	0,58	0,86
10	0,09	1,51	0,09	0,56
Median	0,04	1,60	0,09	0,56

LI = Labelingindex, d = Tag

Tab. 28: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,41	1,24	0,21	0,62
2	0,69	2,48	0,52	1,23
3	0,58	2,22	0,30	1,03
4	0,29	1,73	0,30	0,77
5	0,00	0,78	0,00	0,26
6	0,10	1,95	0,00	0,68
7	0,94	2,17	0,40	1,17
8	0,17	2,32	0,25	0,91
9	0,42	1,23	0,15	0,60
10	0,16	2,00	0,17	0,78
Median	0,35	1,98	0,23	0,78
\bar{x}_g	0,28	1,71	0,19	0,75
SF	2,52	1,45	2,22	1,56

Tab. 29: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	1,49	4,66	0,68	2,28
2	0,69	2,20	0,30	1,06
3	0,38	2,72	0,19	1,10
4	2,73	8,14	2,36	4,41
5	0,40	3,27	0,28	1,32
6	0,59	2,22	0,41	1,07
7	0,39	4,59	1,10	2,03
8	0,10	3,87	0,10	1,36
9	0,36	0,59	0,09	0,35
10	1,38	4,37	0,85	2,20
Median	0,50	3,57	0,36	1,34
\bar{x}_g	0,59	3,07	0,39	1,43
SF	2,55	2,02	2,86	1,95

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 30: LI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	1,16	2,48	0,78	1,47
2	0,63	4,14	0,77	1,85
3	1,17	4,35	1,45	2,32
4	2,11	3,85	0,77	2,24
5	0,87	3,19	0,96	1,67
6	0,69	1,65	0,78	1,04
7	0,20	4,03	0,86	1,70
8	0,10	1,52	0,10	0,57
9	0,73	1,29	0,29	0,77
10	0,70	3,14	0,67	1,50
Median	0,72	3,17	0,78	1,59
\bar{x}_g	0,64	2,72	0,62	1,39
SF	2,43	1,58	2,13	1,58

Tab. 31: LI (%) in der Leber mit Phenobarbital behandelter B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	1,54	29,00	8,52	13,20
2	0,20	5,70	4,31	3,40
3	0,27	3,26	5,09	2,87
4	0,44	4,49	2,39	2,44
5	0,10	4,70	3,69	2,83
6	0,47	5,94	2,80	3,07
7	0,73	12,51	6,27	6,50
8	0,76	11,16	3,81	5,24
9	0,30	5,37	2,40	2,69
10	0,25	6,65	3,25	3,38
\bar{x}_g	0,39	7,12	3,92	3,91
SF	2,18	1,89	1,51	1,69

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 32: LI (%) in der Leber mit Phenobarbital behandelter B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,09	4,46	8,38	4,31
2	0,00	1,16	2,39	1,18
3	0,00	1,70	2,53	1,41
4	0,11	1,43	2,16	1,23
5	0,16	0,86	6,62	2,54
6	0,18	2,57	5,23	2,66
7	0,00	2,47	5,42	2,63
8	0,00	0,78	0,00	0,26
9	0,08	0,18	1,44	0,57
10	0,00	1,33	8,65	3,33
\bar{x}_g	0,08	1,29	2,57	1,54
SF	1,67	2,39	4,56	2,38

Tab. 33: LI (%) in der Leber mit Phenobarbital behandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,08	2,43	2,46	1,66
2	0,54	3,42	1,69	1,88
3	0,18	3,18	1,45	1,60
4	0,09	3,51	2,58	2,06
5	0,18	1,36	0,71	0,75
6	0,58	3,43	2,26	2,09
7	0,34	4,12	0,97	1,81
8	0,15	3,60	3,85	2,53
9	0,21	2,73	2,36	1,77
\bar{x}_g	0,21	2,96	1,82	1,72
SF	2,02	1,39	1,70	1,41

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 34: LI (%) in der Leber mit Chloroform behandelte B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	9,90	0,66	3,52
2	0,83	12,56	0,32	4,57
3	1,15	12,15	1,17	4,82
4	2,78	7,67	0,65	3,70
5	2,80	12,88	3,26	6,31
6	3,15	11,90	0,97	5,34
7	1,25	6,94	0,43	2,87
8	2,15	7,40	0,09	3,21
9	13,28	19,65	1,96	11,63
10	14,25	14,70	1,44	10,13
\bar{x}_g	1,89	11,02	0,75	5,04
SF	4,90	1,39	2,77	1,60

Tab. 35: LI (%) in der Leber mit Chloroform behandelte B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	7,28	25,27	9,18	13,91
2	8,16	18,23	5,23	10,54
3	4,26	11,81	4,28	6,78
4	3,11	12,40	4,59	6,70
5	2,35	8,93	4,77	5,35
6	3,40	14,32	4,64	7,45
7	35,76	36,53	11,69	27,99
8	21,53	22,95	15,27	19,92
9	5,81	17,65	3,37	8,94
10	4,28	19,09	10,27	11,21
\bar{x}_g	6,43	17,33	6,47	10,40
SF	2,38	1,51	1,67	1,68

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 36: LI (%) in der Leber mit Chloroform behandelte B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	9,48	23,19	6,21	12,96
2	2,58	12,06	1,52	5,38
3	24,33	15,36	4,41	14,70
4	1,60	7,55	1,20	3,45
5	3,97	8,53	2,70	5,07
6	1,78	10,16	0,50	4,15
7	1,77	10,98	3,07	5,27
8	2,49	9,92	2,63	5,01
9	1,79	8,61	1,71	4,04
10	2,66	11,18	1,13	4,99
\bar{x}_g	3,27	11,14	2,01	5,75
SF	2,41	1,39	2,09	1,62

Tab. 37: LI (%) in der Leber mit Wyeth 14,643 behandelte B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	36,19	22,31	11,79	23,43
2	40,92	18,85	12,45	24,07
3	38,83	22,91	19,85	27,20
4	51,60	32,07	20,41	34,69
5	52,50	29,19	18,39	33,36
6	57,82	45,74	25,17	42,91
7	37,67	24,66	14,66	25,66
8	47,31	27,23	19,07	31,20
9	60,06	40,78	23,57	41,47
10				
\bar{x}_g	46,23	28,20	17,82	30,85
SF	1,21	1,33	1,31	1,25

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 38: LI (%) in der Leber mit Wyeth 14,643 behandelter B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	5,77	11,13	2,50	6,47
2	0,95	3,53	0,17	1,55
3	6,67	10,14	1,73	6,18
4	3,88	8,33	0,77	4,33
5	9,99	11,16	2,40	7,85
6	18,81	13,67	1,39	11,29
7	11,99	15,47	2,22	9,89
8	10,41	15,47	1,61	9,16
9	11,12	17,55	3,16	10,61
10	11,10	18,16	2,29	10,52
\bar{x}_g	7,27	11,45	1,48	6,89
SF	2,31	1,62	2,35	1,83

Tab. 39: LI (%) in der Leber mit Wyeth 14,643 behandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	8,72	22,53	3,73	11,66
2	9,71	33,07	8,26	17,01
3	13,75	35,96	22,26	23,99
4	7,26	29,81	4,73	13,93
5	9,43	27,44	3,58	13,48
6	4,97	20,41	1,60	8,99
7	2,91	16,05	2,07	7,01
8	3,47	23,29	2,11	9,62
9	5,69	24,94	2,93	11,19
10	4,86	19,08	1,75	8,56
\bar{x}_g	6,37	24,55	3,65	11,79
SF	1,63	1,29	2,25	1,44

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

8.2.2 Mitose- und Apoptoseindizes

Tab. 40: MI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,10	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,09	0,10	0,06
4	0,00	0,10	0,00	0,03
5	0,00	0,17	0,00	0,06
6	0,00	0,10	0,10	0,07
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,08	0,03
9	0,00	0,07	0,00	0,02
10	0,00	0,08	0,00	0,03
Median	0,00	0,09	0,00	0,03

Tab. 41: MI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,11	0,00	0,03
2	0,10	0,11	0,00	0,07
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,49	0,00	0,16
5	0,00	0,38	0,00	0,13
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,10	0,00	0,03
8	0,00	0,11	0,00	0,03
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,09	0,00	0,00	0,03
Median	0,00	0,11	0,00	0,03

MI = Mitoseindex

Tab. 42: MI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,16	0,00	0,06
2	0,00	0,22	0,11	0,11
3	0,00	0,09	0,00	0,03
4	0,00	0,55	0,00	0,18
5	0,09	0,19	0,00	0,09
6	0,10	0,20	0,00	0,10
7	0,00	0,11	0,00	0,03
8	0,00	0,10	0,00	0,03
9	0,00	0,10	0,00	0,03
10	0,00	0,09	0,00	0,03
Median	0,00	0,14	0,00	0,05

Tab. 43: AI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,10	0,00	0,00	0,03
4	0,10	0,00	0,00	0,03
5	0,00	0,00	0,09	0,03
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,07	0,02
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex

Tab. 44: AI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,12	0,00	0,04
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,10	0,00	0,03
7	0,00	0,10	0,00	0,03
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 45: AI (%) in der Leber unbehandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,08	0,00	0,03
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,09	0,00	0,03
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

AI = Apoptoseindex

Tab. 46: MI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte B6C3F1 Mäuse nach
1 Woche

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,09	1,31	0,00	0,44
2	0,00	0,88	0,39	0,39
3	0,00	0,46	0,14	0,18
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,58	0,10	0,22
6	0,00	0,21	0,00	0,07
7	0,00	0,32	0,00	0,10
8	0,00	0,21	0,00	0,07
9	0,00	0,34	0,12	0,15
10	0,00	0,19	0,00	0,06
Median	0,00	0,33	0,00	0,13

MI = Mitoseindex

Tab. 47: MI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte B6C3F1 Mäuse nach
4 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,34	0,66	0,30
2	0,00	0,35	0,13	0,15
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,13	0,00	0,04
5	0,00	0,10	0,00	0,03
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,25	0,13	0,11
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,10	0,22	0,00	0,11
Median	0,00	0,12	0,00	0,04

Tab. 48: MI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte B6C3F1 Mäuse nach
13 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,09	0,00	0,03
2	0,00	0,21	0,00	0,07
3	0,00	0,11	0,13	0,07
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,73	0,00	0,24
6	0,00	0,21	0,13	0,10
7	0,00	0,21	0,00	0,07
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,12	0,00	0,04
10				
Median	0,00	0,12	0,00	0,07

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex

Tab. 49: AI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte B6C3F1 Mäuse nach
1 Woche

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,11	0,00	0,04
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,08	0,00	0,03
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,12	0,03
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,10	0,00	0,03
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 50: AI (%) in der Leber mit Phenobarbital behandelte B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,12	0,03
7	0,00	0,00	0,13	0,04
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

AI = Apoptoseindex

Tab. 51: AI (%) in der Leber mit Phenobarbital behandelte B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,12	0,03
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,12	0,03
8	0,00	0,00	0,11	0,03
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10				
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 52: MI (%) in der Leber mit Chloroform behandelte B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,17	0,00	0,06
2	0,10	0,00	0,00	0,03
3	0,00	0,21	0,00	0,07
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,29	0,32	0,20
6	0,00	0,38	0,00	0,13
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,09	0,09	0,06
9	0,09	0,17	0,00	0,09
10	0,00	0,09	0,00	0,03
Median	0,00	0,13	0,00	0,06

MI = Mitoseindex

Tab. 53: MI (%) in der Leber mit Chloroform behandelte B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,10	0,00	0,22	0,11
2	0,21	0,11	0,11	0,14
3	0,00	0,53	0,21	0,25
4	0,00	0,58	0,00	0,31
5	0,00	0,63	0,00	0,21
6	0,00	0,96	0,00	0,32
7	0,00	1,03	0,26	0,43
8	0,00	0,45	0,22	0,22
9	0,00	0,50	0,11	0,20
10	0,00	1,06	0,00	0,36
Median	0,00	0,56	0,11	0,24

Tab. 54: MI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,23	0,00	0,08
3	0,00	0,28	0,14	0,13
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,09	0,00	0,03
6	0,11	0,73	0,00	0,28
7	0,10	0,32	0,00	0,14
8	0,00	0,22	0,12	0,11
9	0,00	0,12	0,12	0,08
10	0,11	0,66	0,11	0,29
Median	0,00	0,23	0,00	0,10

Tab. 55: AI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter B6C3F1 Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,10	0,00	0,03
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,09	0,17	0,00	0,09
10	0,00	0,18	0,00	0,06
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex

Tab. 56: AI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter B6C3F1 Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,11	0,00	0,04
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,11	0,00	0,03
6	0,00	0,11	0,00	0,04
7	0,00	0,13	0,13	0,04
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 57: AI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter B6C3F1 Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,45	0,13	0,19
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,42	0,00	0,13
4	0,00	0,45	0,00	0,14
5	0,00	0,19	0,00	0,07
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,11	0,00	0,04
8	0,00	0,00	0,12	0,04
9	0,00	0,12	0,00	0,04
10	0,00	0,11	0,00	0,04
Median	0,00	0,12	0,00	0,04

AI = Apoptoseindex

Tab. 58: MI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte B6C3F1 Mäuse nach
1 Woche

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,30	0,30	0,19	0,26
3	0,00	0,21	0,00	0,06
4	0,25	1,00	0,00	0,39
5	0,24	0,86	0,00	0,34
6	0,36	0,27	0,09	0,25
7	0,23	0,58	0,00	0,26
8	0,23	0,21	0,00	0,15
9	0,23	0,82	0,00	0,32
10				
Median	0,23	0,30	0,00	0,26

MI = Mitoseindex

Tab. 59: MI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte B6C3F1 Mäuse nach
4 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,16	1,73	0,00	0,60
2	0,09	0,09	0,00	0,06
3	0,09	0,00	0,00	0,03
4	0,00	0,86	0,00	0,27
5	0,37	0,38	0,00	0,25
6	0,09	0,45	0,00	0,16
7	0,00	0,10	0,00	0,03
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,08	0,09	0,00	0,06
10	0,00	0,10	0,00	0,03
Median	0,09	0,10	0,00	0,06

Tab. 60: MI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte B6C3F1 Mäuse nach
13 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,10	0,00	0,03
2	0,19	0,61	0,00	0,27
3	0,00	0,44	0,00	0,16
4	0,39	0,79	0,19	0,45
5	0,18	0,72	0,00	0,30
6	0,00	0,28	0,00	0,09
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,09	0,00	0,03
9	0,00	0,17	0,00	0,06
10	0,00	0,19	0,00	0,06
Median	0,00	0,24	0,00	0,08

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex

Tab. 61: AI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte B6C3F1 Mäuse nach
1 Woche

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,12	0,00	0,03
2	0,00	0,00	0,19	0,06
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,11	0,20	0,10
5	0,00	0,22	0,37	0,18
6	0,00	0,00	0,09	0,03
7	0,00	0,10	0,34	0,14
8	0,00	0,11	0,00	0,03
9	0,00	0,00	0,25	0,09
10				
Median	0,00	0,10	0,19	0,06

Tab. 62: AI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte B6C3F1 Mäuse nach
4 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,08	0,00	0,17	0,09
2	0,00	0,28	0,93	0,41
3	0,09	0,38	0,69	0,39
4	0,00	0,19	0,77	0,33
5	0,00	0,28	0,10	0,13
6	0,00	0,00	0,17	0,06
7	0,00	0,00	0,51	0,18
8	0,00	0,64	0,36	0,32
9	0,00	0,09	0,17	0,09
10	0,00	0,10	0,44	0,18
Median	0,00	0,15	0,40	0,18

AI = Apoptoseindex

Tab. 63: AI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte B6C3F1 Mäuse nach
13 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,19	0,80	2,11	1,01
2	0,00	0,35	0,56	0,31
3	0,29	1,23	2,17	1,22
4	0,00	0,30	1,95	0,77
5	0,00	0,09	1,52	0,54
6	0,09	0,09	0,66	0,26
7	0,00	0,28	0,08	0,11
8	0,00	0,35	0,42	0,26
9	0,00	0,00	0,42	0,14
10	0,00	0,19	0,61	0,27
Median	0,00	0,29	0,64	0,29

8.3 C57BL Maus

8.3.1 Labelingindizes

Tab. 64: LI (%) in der Leber unbehandelter
C57BL Mäuse nach 1 Woche (2 h i. p.
Pulseinjektion)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,10	1,02	0,00	0,37
2	0,09	0,00	0,22	0,10
3	0,00	0,45	0,00	0,15
4	0,00	0,32	0,10	0,14
5	0,00	0,86	0,12	0,33
6	0,00	0,19	0,30	0,16
7	0,00	0,34	0,00	0,11
8	0,00	0,30	0,00	0,10
9	0,09	0,18	0,00	0,09
10	0,00	0,29	0,00	0,10
Median	0,00	0,31	0,00	0,13

Tab. 65: LI (%) in der Leber unbehandelter
C57BL Mäuse nach 4 Wochen (2 h i. p.
Pulseinjektion)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,22	0,13	0,12
2	0,00	0,19	0,00	0,06
3	0,00	0,66	0,00	0,22
4	0,08	0,79	0,00	0,29
5	0,00	0,87	0,00	0,29
6	0,00	0,47	0,00	0,16
7	0,00	0,06	0,00	0,02
8	0,00	0,15	0,17	0,11
9	0,00	0,18	0,07	0,08
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,21	0,00	0,12

LI = Labelingindex, h = Stunde, i. p. = intraperitoneal

Tab. 66: LI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 13 Wochen (2 h i. p. Pulseinjektion)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,46	0,00	0,15
2	0,00	0,27	0,00	0,09
3	0,00	0,37	0,00	0,12
4	0,00	0,22	0,08	0,10
5	0,00	0,43	0,00	0,14
6	0,00	0,38	0,00	0,13
7	0,00	0,17	0,09	0,09
8	0,00	0,36	0,10	0,15
9	0,00	0,34	0,00	0,11
10	0,00	0,55	0,00	0,18
Median	0,00	0,37	0,00	0,13

Tab. 67: LI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 1 Woche (3 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,29	1,31	0,45	0,68
2	0,00	0,86	0,57	0,48
3	0,00	0,00	0,39	0,13
4	0,21	0,87	0,24	0,44
5	0,17	1,23	0,98	0,79
6	0,16	1,25	0,98	0,80
7	1,53	2,03	0,52	1,36
8	0,16	0,71	0,18	0,35
9	0,39	0,72	0,62	0,58
10	0,37	3,99	1,01	1,79
Median	0,19	1,05	0,55	0,63

LI = Labelingindex, h = Stunde, i. p. = intraperitoneal, d = Tag

Tab. 68: LI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 4 Wochen (3 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,98	0,31	0,43
2	0,08	0,63	1,03	0,58
3	0,07	0,62	0,08	0,26
4	0,00	0,89	0,36	0,42
5	0,22	0,98	0,63	0,61
6	0,00	0,53	0,81	0,45
7	0,00	0,48	0,43	0,30
8	0,15	1,07	0,44	0,55
9	0,13	1,16	0,89	0,73
10	0,38	1,44	0,85	0,89
Median	0,08	0,94	0,54	0,50

Tab. 69: LI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 13 Wochen (3 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,16	0,50	0,22
2	0,00	0,73	0,77	0,50
3	0,00	0,95	0,45	0,47
4	0,09	1,55	0,36	0,67
5	0,00	0,95	0,56	0,50
6	0,00	0,15	0,00	0,05
7	0,08	0,60	0,00	0,23
8	0,08	1,88	0,99	0,98
9	0,00	0,78	0,39	0,39
10	0,15	0,32	0,00	0,16
Median	0,00	0,76	0,42	0,43

LI = Labelingindex, d = Tag

Tab. 70: LI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 1 Woche (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	1,07	4,53	5,64	3,75
2	0,98	1,90	0,61	1,16
3	4,43	4,46	3,26	4,05
4	1,72	2,76	0,65	1,71
5	0,85	3,49	2,72	2,35
6	0,90	3,75	1,35	2,00
7	1,07	4,06	3,29	2,81
8	0,36	1,18	0,71	0,75
9	0,72	3,11	1,48	1,77
10	2,37	4,75	2,21	3,11
Median	1,03	3,62	1,85	2,18
\bar{x}_g	1,15	3,15	1,70	2,10
SF	1,99	1,56	2,17	1,69

Tab. 71: LI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 4 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,15	2,81	1,09	1,35
2	3,17	0,84	0,34	1,45
3	0,00	2,22	1,16	1,13
4	1,21	2,00	1,75	1,65
5	1,44	2,44	1,37	1,75
6	0,39	0,56	0,47	0,47
7	0,21	1,37	0,52	0,70
8	0,12	1,11	0,13	0,45
9	1,61	1,76	0,60	1,32
10	0,47	2,48	0,66	1,20
Median	0,43	1,88	0,63	1,26
\bar{x}_g	0,45	1,58	0,65	1,04
SF	3,82	1,70	2,16	1,65

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 72: LI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 13 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,30	2,11	0,64	1,02
2	0,58	3,73	1,25	1,85
3	0,00	1,70	0,09	0,60
4	0,57	1,53	0,59	0,90
5	0,07	1,92	0,68	0,89
6	0,53	3,77	0,50	1,60
7	0,86	1,55	1,23	1,21
8	0,41	1,58	0,71	0,90
9	0,00	0,95	0,58	0,51
10	0,32	2,06	0,93	1,10
Median	0,37	1,81	0,66	0,96
\bar{x}_g	0,25	1,93	0,61	0,99
SF	2,96	1,52	2,10	1,48

Tab. 73: LI (%) in der Leber mit Phenobarbital behandelte C57BL Mäuse nach 1 Woche (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	4,51	17,96	22,49	14,99
2	0,63	17,84	29,36	15,94
3	1,58	11,30	13,29	8,72
4	0,74	3,83	3,62	2,73
5	0,56	6,33	5,28	4,06
6	5,29	21,57	27,05	17,97
7	2,00	12,97	9,87	8,28
8	0,23	7,91	7,41	5,18
9	2,51	17,11	22,99	14,20
10	1,12	11,84	15,99	9,65
Median				
\bar{x}_g	1,29	11,47	12,84	8,68
SF	2,68	1,72	2,06	1,89

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 74: LI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte C57BL Mäuse nach
4 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,07	1,84	2,98	1,63
2	0,08	4,24	7,65	3,99
3	0,31	4,60	2,35	2,42
4	0,26	4,71	4,90	3,29
5	0,10	3,83	5,77	3,23
6	0,07	2,16	2,38	1,54
7	0,17	2,24	2,33	1,58
8	0,14	1,53	0,87	0,85
9	0,06	0,70	0,46	0,41
10	0,06	1,67	2,84	1,52
\bar{x}_g	0,11	2,37	2,50	1,71
SF	1,84	1,84	2,33	1,99

Tab. 75: LI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte C57BL Mäuse nach
13 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	1,23	2,17	1,13
2	0,00	1,17	9,76	3,64
3	0,14	0,86	1,25	0,75
4	0,07	1,10	1,06	0,74
5	0,15	1,37	2,91	1,48
6	0,15	0,18	1,01	0,45
7	0,00	0,55	0,00	0,18
8	0,00	1,13	1,22	0,78
9	0,15	2,46	0,76	1,12
10	0,30	2,01	3,75	2,02
\bar{x}_g	0,10	1,00	1,31	0,93
SF	1,92	2,08	3,97	2,28

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 76: LI (%) in der Leber mit Chloroform
behandelte C57BL Mäuse nach 1 Woche
(7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	3,44	11,84	3,46	6,25
2	16,28	22,42	2,57	13,76
3	2,90	8,07	1,20	4,06
4	66,39	66,79	40,59	57,92
5	75,18	75,05	11,23	53,82
6	6,99	11,28	4,71	7,66
7	24,42	26,98	9,89	20,43
8	6,01	9,82	1,54	5,79
9	2,36	7,15	0,41	3,31
\bar{x}_g	10,78	18,29	3,74	11,41
SF	3,72	2,42	3,93	2,89

Tab. 77: LI (%) in der Leber mit Chloroform
behandelte C57BL Mäuse nach 4 Wochen
(7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	1,06	3,69	0,36	1,70
2	0,88	6,12	0,81	2,60
3	0,51	6,03	0,50	2,35
4	0,09	2,27	0,31	0,89
5	1,40	2,12	0,00	1,17
6	0,09	2,85	0,51	1,15
7	0,41	1,55	0,00	0,65
\bar{x}_g	0,42	3,12	0,25	1,35
SF	3,09	1,69	3,11	1,66

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 78: LI (%) in der Leber mit Chloroform behandelte C57BL Mäuse nach 13 Woche (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	1,54	4,98	1,05	2,52
2	0,54	4,76	1,28	2,19
3	0,22	2,73	0,11	1,02
4	0,18	0,84	0,10	0,37
5	0,08	1,15	0,54	0,59
\bar{x}_g	0,31	2,29	0,38	1,04
SF	3,10	2,26	3,39	2,28

Tab. 79: LI (%) in der Leber mit Wyeth 14,643 behandelte C57BL Mäuse nach 1 Woche (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	58,70	43,85	23,19	41,91
2	59,47	33,07	15,49	36,01
3	46,34	22,82	16,16	28,44
4	61,20	22,48	18,29	33,99
5	62,07	22,25	18,09	34,14
6	61,05	29,37	21,48	37,30
7	58,00	28,56	18,16	34,91
8	43,91	13,12	15,36	24,13
9	53,23	17,33	10,74	27,10
10	54,75	37,10	31,53	41,13
\bar{x}_g	55,53	25,52	18,16	33,43
SF	1,13	1,44	1,33	1,20

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

Tab. 80: LI (%) in der Leber mit Wyeth 14,643 behandelte C57BL Mäuse nach 4 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	14,20	18,64	4,68	12,51
2	16,02	29,48	39,24	28,25
3	15,15	20,78	11,06	15,66
4	8,09	13,13	9,82	10,35
5	9,45	20,18	3,86	11,16
6	6,61	13,31	5,27	8,40
7	1,75	2,68	1,27	1,90
8	3,22	5,10	2,02	3,45
9	9,88	18,65	8,14	12,22
10	6,57	7,86	0,80	5,08
\bar{x}_g	7,59	12,32	4,82	8,59
SF	2,03	2,10	3,13	2,19

Tab. 81: LI (%) in der Leber mit Wyeth 14,643 behandelte C57BL Mäuse nach 13 Wochen (7 d-Pumpe)

Tier-Nr	LI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	9,64	20,76	13,61	14,67
2	5,51	14,26	6,52	8,76
3	12,33	24,73	10,18	15,75
4	6,53	33,24	15,01	18,26
5	5,25	20,66	8,89	11,60
6	5,53	17,72	3,87	9,04
7	5,95	16,96	3,43	8,78
8	4,95	17,61	6,86	9,81
9	8,17	27,65	19,73	18,52
10	5,29	15,03	5,08	8,47
\bar{x}_g	6,61	20,16	8,02	11,80
SF	1,36	1,31	1,80	1,38

LI = Labelingindex, d = Tag, \bar{x}_g = geometrischer Mittelwert, SF = Streufaktor

8.3.2 Mitose- und Apoptoseindizes

Tab. 82: MI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,76	0,00	0,25
3	0,10	0,58	0,00	0,24
4	0,00	0,74	0,00	0,26
5	0,00	0,28	0,00	0,09
6	0,00	0,43	0,00	0,14
7	0,00	0,48	0,11	0,20
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,55	0,00	0,18
10	0,08	0,93	0,00	0,33
Median	0,00	0,52	0,00	0,19

MI = Mitoseindex

Tab. 83: MI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,17	0,00	0,05
2	0,26	0,00	0,00	0,08
3	0,00	0,19	0,00	0,06
4	0,00	0,40	0,19	0,19
5	0,08	0,81	0,00	0,31
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,09	0,00	0,03
Median	0,00	0,05	0,00	0,04

Tab. 84: MI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,18	0,00	0,06
2	0,00	0,38	0,00	0,12
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,16	0,00	0,05
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,31	0,00	0,10
8	0,00	0,26	0,00	0,09
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,09	0,16	0,00	0,08
Median	0,00	0,16	0,00	0,06

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex

Tab. 85: AI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,11	0,03
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,43	0,00	0,14
7	0,00	0,00	0,22	0,07
8	0,00	0,00	0,31	0,10
9	0,00	0,11	0,00	0,04
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,02

Tab. 86: AI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,09	0,03
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,07	0,02
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

AI = Apoptoseindex

Tab. 87: AI (%) in der Leber unbehandelter C57BL Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,09	0,00	0,03
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,08	0,00	0,03
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 88: MI (%) in der Leber mit Phenobarbital behandelte C57BL Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,09	1,31	0,00	0,44
2	0,00	0,88	0,39	0,39
3	0,00	0,46	0,14	0,18
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,58	0,10	0,22
6	0,00	0,79	0,24	0,32
7	0,00	0,54	0,30	0,26
8	0,00	0,67	0,10	0,25
9	0,00	1,20	0,62	0,59
10	0,00	0,72	0,25	0,30
Median	0,00	0,70	0,19	0,28

MI = Mitoseindex

Tab. 89: MI (%) in der Leber mit Phenobarbital behandelte C57BL Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,32	0,24	0,17
3	0,00	0,32	0,42	0,20
4	0,00	0,47	0,27	0,22
5	0,00	0,35	0,43	0,23
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,21	0,00	0,07
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,06	0,00	0,02
Median	0,00	0,14	0,00	0,05

Tab. 90: MI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte C57BL Mäuse nach
13 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,10	0,00	0,03
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,08	0,00	0,03
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,18	0,00	0,06
10	0,00	0,09	0,11	0,06
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex

Tab. 91: AI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte C57BL Mäuse nach
1 Woche

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,11	0,00	0,04
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,08	0,00	0,03
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,17	0,00	0,06
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 92: AI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte C57BL Mäuse nach
4 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,12	0,03
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

AI = Apoptoseindex

Tab. 93: AI (%) in der Leber mit Pheno-
barbital behandelte C57BL Mäuse nach
13 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 94: MI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter C57BL Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,10	1,54	0,00	0,57
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,61	0,00	0,21
4	0,08	0,08	0,08	0,08
5	0,00	0,30	0,00	0,10
6	0,09	0,34	0,00	0,15
7	0,00	0,63	0,00	0,22
8	0,19	0,87	0,00	0,37
9	0,00	0,76	0,00	0,00
Median	0,00	0,61	0,00	0,15

MI = Mitoseindex

Tab. 95: MI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter C57BL Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,19	0,00	0,07
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,41	0,13	0,18
4	0,18	0,39	0,00	0,19
5	0,11	0,22	0,00	0,11
6	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8				
9				
Median	0,00	0,19	0,00	0,07

Tab. 96: MI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter C57BL Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,42	0,12	0,18
2	0,00	0,09	0,00	0,03
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,09	0,03
6				
7				
8				
9				
Median	0,00	0,00	0,00	0,03

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex

Tab. 97: AI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter C57BL Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,29	0,00	0,10
2	0,00	0,16	0,00	0,06
3	0,00	0,54	0,16	0,24
4	0,08	0,53	2,07	0,90
5	0,00	1,10	0,10	0,41
6	0,00	0,51	0,09	0,20
7	0,00	0,63	0,31	0,33
8	0,00	0,29	0,00	0,10
9	0,00	0,59	0,08	0,08
Median	0,00	0,53	0,09	0,20

Tab. 98: AI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter C57BL Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,10	0,00	0,04
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,86	0,10	0,10
7	0,00	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	0,00	0,00	0,00

AI = Apoptoseindex

Tab. 99: AI (%) in der Leber mit Chloroform behandelter C57BL Mäuse nach 13 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,11	0,03
3	0,00	0,22	0,00	0,07
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,45	0,15
6				
7				
Median	0,00	0,00	0,00	0,03

Tab. 100: MI (%) in der Leber mit Wyeth 14,643 behandelter C57BL Mäuse nach 1 Woche

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,17	1,81	0,00	0,62
2	0,09	1,91	0,00	0,58
3	0,17	0,45	0,00	0,20
4	0,26	2,12	0,00	0,73
5	0,17	1,76	0,09	0,59
6	0,00	1,73	0,00	0,50
7	0,00	1,89	0,53	0,73
8	0,16	0,70	0,00	0,26
9	0,16	1,63	0,00	0,54
10	0,35	1,01	0,00	0,44
Median	0,17	1,75	0,00	0,56

MI = Mitoseindex

Tab. 101: MI (%) in der Leber mit Wyeth 14,643 behandelter C57BL Mäuse nach 4 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,28	1,78	0,00	0,67
2	0,09	0,69	0,95	0,58
3	0,00	0,70	0,00	0,22
4	0,00	0,19	0,00	0,06
5	0,42	1,01	0,19	0,54
6	0,10	0,10	0,00	0,07
7	0,00	0,09	0,00	0,03
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,19	1,29	0,00	0,47
10	0,09	0,37	0,00	0,15
Median	0,09	0,53	0,00	0,19

Tab. 102: MI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte C57BL Mäuse nach
13 Wochen

Tier-Nr	MI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,09	0,50	0,00	0,19
2	0,17	1,20	0,00	0,45
3	0,09	1,00	0,10	0,39
4	0,18	0,68	0,10	0,31
5	0,26	0,73	0,09	0,35
6	0,00	0,96	0,09	0,33
7	0,09	1,75	0,00	0,58
8	0,00	0,51	0,00	0,18
9	0,09	0,56	0,08	0,24
10	0,00	0,30	0,19	0,17
Median	0,09	0,71	0,09	0,32

Tab. 103: AI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte C57BL Mäuse nach
1 Woche

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,00	0,90	0,30
2	0,00	0,11	0,09	0,06
3	0,00	0,09	0,26	0,12
4	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,11	0,00	0,03
6	0,00	0,00	0,34	0,12
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,20	0,00	0,06
Median	0,00	0,00	0,00	0,05

MI = Mitoseindex, AI = Apoptoseindex

Tab. 104: AI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte C57BL Mäuse nach
4 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,00	0,30	1,15	0,48
2	0,00	0,78	1,13	0,64
3	0,00	0,10	0,90	0,35
4	0,00	0,10	0,09	0,06
5	0,11	0,51	1,36	0,67
6	0,00	0,50	1,17	0,57
7	0,00	0,26	0,08	0,11
8	0,00	0,00	0,34	0,11
9	0,00	0,60	1,88	0,84
10	0,00	0,18	0,35	0,18
Median	0,00	0,28	1,02	0,42

Tab. 105: AI (%) in der Leber mit Wyeth
14,643 behandelte C57BL Mäuse nach
13 Wochen

Tier-Nr	AI %			
	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Gesamt
1	0,09	1,50	1,60	1,05
2	0,00	0,51	1,00	0,51
3	0,00	1,18	1,83	0,97
4	0,09	0,10	0,48	0,22
5	0,00	0,18	1,47	0,56
6	0,00	0,19	0,88	0,36
7	0,00	0,28	1,14	0,49
8	0,00	0,17	1,26	0,44
9	0,00	0,19	1,26	0,51
10	0,00	0,30	0,67	0,33
Median	0,00	0,24	1,20	0,50

AI = Apoptoseindex

8.4 Lösungen, Puffer, Bezugsquellen

8.4.1 Lösungen und Puffer

APTS-Beschichtung

APTS – 3-Aminopropyltriethoxysilan (Sigma) gelöst in reinem Aceton (1 g/100 ml). Schwenken der Objektträger darin für 2 Minuten, anschließend zweimal kurz in reinem Aceton und anschließend in Aqua bidest. spülen. Die feuchten Objektträger über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C trocknen.

Eosin-Lösung (0,5 %)

10 g Eosin (gelblich, Certistain[®], Merck) in 2 l destilliertem Wasser lösen, 20 ml ungepuffertes Formalin (40 %) zugeben.

Ethanol 70 %

700 ml reines Ethanol (Pfälzische Spritfabrik, Ludwigshafen) mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen

Hämatoxylin nach Ehrlich (saures Hämalaun)

12 g Hämatoxylin lösen in: 600 ml 96 %igem Ethanol, 600 ml Aqua bidest., 600 ml reinstes Glycerin, 18 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun), 60 ml Essigsäure konz.

Die künstliche Reifung erfolgt durch Zugabe von 200 mg Natriumjodat pro 1 g Hämatoxylin.

Hämatoxylin nach Mayer (saures Hämalaun)

1 g Hämatoxylin lösen in 1000 ml Aqua bidest., 50 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun), 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure.

Die künstliche Reifung erfolgt durch Zugabe von 200 mg Natriumjodat

Phosphate Buffered Saline (PBS) (OptiMax[™]Wash Buffer) (20X)

500 ml mit 10 l deionisiertem Wasser verdünnen, pH 7,4 ± 0,2

Salzsäureethanol (0,5 %)

5 ml Salzsäure (32 %) zu 995 ml Ethanol (70 %) geben

8.4.2 Bezugsquellen

BASF, Ludwigshafen

Formalin 4 %

Becker & Co., Castrop-Rauxel

Makrolonkäfig Typ MI mit Drahtdeckel

BioGenex, San Ramon, CA, USA

Monoclonal Antibody to Bromodeoxyuridine (BrdU), AM247-5M

Kontrollantikörper Super Sensitive Negative Control HK 119-7M

Multilink (biotinylated goat anti-immunoglobins), HK 268-UK

Alkaline phosphatase-conjugated streptavidin, HK 321-UK

Fast Red Substrate Pack, HK 182-5K

Concentrated Phosphate Buffered Saline (PBS)

OptiMax plus (automated Staining System)

Pap Pen, hydrophobic slide marker, XT 001 PP

Centre d'Élevage R. Janvier, Frankreich

Maus B6C3F1

Maus C57BL/6 J Rj

ChemSyn Science Laboratories, Lenexa, USA

Wyeth 14,643

Kliba Mühlen AG, Kaiseraugst, Schweiz

Kliba-Haltungsdät (Ratte-Maus-Hamster)

Fluka Chemika, Buchs, Schweiz

Chloroform, BL 287

Medite, Medizintechnik, Burgdorf

Pertex Eindeckmedium

Promounter RCM 90 (Eindeckautomat)

Merck, Darmstadt

Kaisers Glyceringelantine 1.09242.0100

Certistain® (Eosin, gelblich)

Microm, Walldorf

HM 355 (Rotationsmikrotom)

Pfälzische Spritfabrik, Ludwigshafen

Ethanol (100 %)

Xylol

PSI (Pool of Scientific Instruments), Grünewald, Laudenbach

Objektträger, StarFrost

Kühlplatte

Riedel-de Haen, Seelze

Aceton p. A. 32201

Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt

2L Processor MK II

Shandon Histocentre

SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA

Phenobarbital P-5178

3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS)

Protease aus Streptomyces griseus, P6911

ZEISS, Jena

Mikroskop (Axioskop 2)

ZEISS VISION, Halbergmoos

KS 400 Imaging System/3.0

9 LITERATURVERZEICHNIS

ALISON, M. R.; CHAUDRY, Z.; BAKER, J.; LAUDER, I.; PRINGLE, H. (1994):

Liver regeneration: a comparison of in situ hybridisation for histone mRNA with bromodeoxyuridine labelling for detection of S-phase cells.

J. Histochem. Cytochem. 42: 1603-1608

AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E. ; LEE, F. D. (1973):

Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2281-2288

AMES, B. N.; GOLD, L. S. (1990):

Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis.

Science 249: 970-971

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; GOLD, L. S. (1993):

DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis.

Environ. Health Perspect. 101 (Suppl. 5): 35-44

ANDERSON, S. P.; CATTLEY, R. C.; CORTON, J. C. (1999):

Hepatic expression of acute-phase protein genes during carcinogenesis induced by peroxisome proliferators.

Mol. Cacinog. 26: 226-238

BAHNEMANN, R.; MELLERT, W. (1997):

Lobule-dependent zonal measurement (LZM) method for the determination of cell proliferation in the liver.

Exp. Toxic. Pathol. 49: 189-196

BAHNEMANN, R. (2000):

Cell proliferation in the liver. A malpractice not to measure the zonal distribution? Comparison of the lobule-dependent zonal measurement method with the common method of randomly distributed measurement fields.

Toxicol. Meth. 10: 81-97

BANNIGAN, J.; LANGMAN, J. (1979):

The cellular effect of 5-bromodeoxyuridine on the mammalian embryo.

J. Embryol. Exp. Morphol. 50: 123-135

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

Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator, nafenopin.

J. Cell Biol. 125: 197-203

BECKER, F. F. (1982):

Morphological classification of mouse liver tumors based on biological characteristics.

Cancer Res. 42: 3918-3923

BIRD, A. P. (1986):

CpG-rich islands and the function of DNA methylation.

Nature 321: 209-213

BLAZEY; B. (2001):

Darstellung apoptotischer und nekrotischer Rattenhepatozyten im Gewebeschnitt nach verschiedenen Fixierungsverfahren und mittels unterschiedlicher Nachweismethoden.

Diss. Vet. med., Gießen, in Vorbereitung

BOJES, H. K.; GERMOLEC, D. R.; SIMEONOVA, P.; BRUCCOLERI, A.; LUSTER, M. I.; THURMAN, R. G. (1997):

Antibodies to tumor necrosis factor α prevent increases in cell replication due to the potent peroxisome proliferator, WY-14,643.

Carcinogenesis 18: 669-674

BRALET, M. P.; BRANCHEREAU, S.; BRECHOT, C.; FERRY, N. (1994):

Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver.

Am. J. Pathol. 144: 896-905

BURSCHE, W.; LAUER, B.; TIMMERMANN-TROSIENER, I.; BARTHEL, G.; SCHUPPLER, J.; SCHULTE-HERMANN, R. (1984):

Controlled death (apoptosis of normal and preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters.

Carcinogenesis 5: 543-548

BURSCHE, W., TAPER, H. S.; LAUER, B.; SCHULTE-HERMANN, R. (1985):

Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia.

Virchows Arch. B 50: 153-166

BURSCHE, W.; DÜSTERBERG, B.; SCHULTE-HERMANN, R. (1986):

Growth regression and cell death in rat liver as related to tissue levels of the hepatomitogen cyproterone acetate.

Arch. Toxicol. 59: 221-227

BURSCHE, W.; GRASL-KRAUPP, B.; ELLINGER, A.; TÖRÖK, L.; KIENZEL, H.; MÜLLAUER, L.; SCHULTE-HERMANN, R. (1994):

Active cell death: role in hepatocarcinogenesis and subtypes.

Biochem. Cell Biol. 72: 669-675

BUTLER, W. H. (1978):

Long-term effects of phenobarbital-Na on male Fisher rats.

Br. J. Cancer 37: 418-423

BUTTERWORTH, B. E. (1990):

Consideration of both genotoxic and non-genotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential.

Mut. Res. 239: 117-132

BUTTERWORTH, B. E. (1991):

Chemically induced cell proliferation as a predictive assay for potential carcinogenicity.

In: BUTTERWORTH, B. E.; SLAGA, T. J. (eds.):

Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment.

Wiley-Liss, Inc., New York: 457-467

BUTTERWORTH, B. E.; POPP, J. A.; CONOLLY, R. B.; GOLDSWORTHY, T. L. (1992):

Chemically-induced cell proliferation in carcinogenesis.

In: VAINIO, H.; MAGEE, P. N.; MCGREGOR, D. B.; McMICHAEL, A. J. (eds.):

Mechanisms of carcinogenesis in risk identification.

IARC Sci. Publ., Vol. 116, Lyon: 279-305

BUTTERWORTH, B. E.; SPRANKLE, C. S.; GOLDSWORTHY, S. M.; WILSON, D. M.;
GOLDSWORTHY, T. L. (1994):

Expression of myc, fos, and Ha-ras in the livers of Furan treated F344 rats and B6C3F1 mice.

Mol. Carcinogenesis 9: 24-32

BUTTERWORTH, B. E.; TEMPLIN, M. V.; BORGHOFF, S. J.; CONOLLY, R. B.;
KEDDERIS, G. L.; WOLF, D. C. (1995):

The role of regenerative cell proliferation in chloroform induced cancer.

Toxicol. Letters 82/83: 23-26

CATTLEY, R. C.; POPP, J. A. (1989):

Differences between the promoting activities of the peroxisome proliferator Wy 14, 643 and phenobarbital in rat liver.

Cancer Res. 49: 3246-3251

CATTLEY, R. C.; GLOVER, S. E. (1993):

Elevated 8-hydroxydeoguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators: relationship to carcinogenesis and nuclear localization.

Carcinogenesis 14: 2495-2499

CAYAMA, E.; TSUDA, H.; SARMA, D. S.; FARBER, E. (1978):

Initiation of liver carcinogenesis requires cell proliferation.

Nature 275: 60-62

CERUTTI, P. A. (1985):

Prooxidant states and tumor promotion.

Science 228: 375-381

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. (1979):

Hyperoxide metabolism in mammalian organs.

Physiol. Rev. 59: 527-605

CHEN Z.; WHITE, C. C.; HE, C.; LIU, Y.; EATON, D. L. (1995):

Zonal differences in DNA synthesis activity and cytochrome P450 gene expression in livers of male F344 rats treated with five nongenotoxic carcinogens.

J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 14: 83-99

CHEVILLE, N. F. (1983):

Cell pathology.

The Iowa State University Press, second edition, Ames

COHEN, S. M.; ELLWEIN, L. B. (1990):

Cell proliferation in carcinogenesis.

Science 249: 1007-1011

COHEN, S. M.; ELLWEIN, L. B. (1991):

Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis.

Cancer Res. 51: 6493-6505

COLUMBANO, A.; RAJALAKSHMI, S.; SARMA, D. S. (1981):

Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures.

Cancer Res. 41: 2079-2083

COLUMBANO, A.; LEDDA-COLUMBANO, G. M.; CONI, P.; PICHIRI-CONI, G.; CURTO, M.; PANI, P. (1991):

Chemically induced cell proliferation and carcinogenesis: differential effect of compensatory cell proliferation and mitogen-induced direct hyperplasia on hepatocarcinogenesis in the rat.

In: BUTTERWORTH, B. E.; SLAGA, T. J. (eds.):

Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment.

Wiley-Liss, Inc., New York: 217-225

CONOLLY, R. B.; BUTTERWORTH, B. E. (1995):

Biologically based dose response model for hepatic toxicity: A mechanistically based replacement for traditional estimates of noncancer risk.

Toxicol. Lett. 82/83: 901-906

CONSTAN, A. A.; YANG, R. S.; BAKER, D. C.; BENJAMIN, S. A. (1995):

A unique pattern of hepatocyte proliferation in F344 rats following long-term exposures to low levels of a chemical mixture of groundwater contaminants.

Carcinogenesis 16: 303-310

CONSTAN, A. A.; BENJAMIN, S. A.; TESSARI, J. D.; BAKER, D. C.; YANG, R. S. (1996):

Increased rate of apoptosis correlates with hepatocellular proliferation in Fischer-344 rats following long-term exposure to a mixture of groundwater contaminants.

Toxicol. Pathol. 24: 315-322

CONSTAN, A. A.; SPRANKLE, C. S.; PETERS, J. M.; KEDDERIS, G. L.; EVERITT, J. I.; WONG, B. A.; GONZALES, F. L.; BUTTERWORTH, B. E. (1999):

Metabolism of chloroform by cytochrome P450 2E1 is required for induction of toxicity in the liver, kidney, and nose of male mice.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 160: 120-126

CORLEY, R. A.; MENDRALA, A. L.; SMITH, F.A.; STAATS, D. A.; GARGAS, M. L.; CONOLLY, R. B.; ANDERSEN, M. E.; REITZ, R. H. (1990):

Development of a physiologically-based pharmacokinetic model for chloroform.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 103: 512-527

COUNTS, J. L.; GOODMAN, J. I. (1995a):

Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis.

Cell 83: 13-15

COUNTS, J. L.; GOODMAN, J. I. (1995b):

Hypomethylation of DNA: a possible epigenetic mechanism involved in tumor promotion.

Prog. Clin. Biol. Res. 391: 81-101

COUNTS, J. L.; SARMIENTO, J. I.; HARBISON, M. L.; DOWNING, J. C.; McCLAIN, R. M.; GOODMAN, J. I. (1996):

Cell proliferation and global methylation status changes in mouse liver after phenobarbital and/or choline-devoid, methionine-deficient diet administration.

Carcinogenesis 17: 1251-1257

COWLEN, M. S.; HEWITT, W. R.; SCHROEDER, F. (1984):

2-Hexanone potentiation of [¹⁴C]chloroform hepatotoxicity: Covalent interaction of a reactive intermediate with rat liver phospholipid.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 73: 478-491

CUNNINGHAM, M. E.; EVANS, J. G.; BUTLER, W. H. (1991):

An ultrastructural study of spontaneous and phenobarbital induced nodules in the mouse liver.

Int. J. Exp. Pathol. 72: 627-631

CUNNINGHAM, M. L.; MARONPOT, R. R.; THOMPSON, M.; BUCHER, J. R. (1994):

Early responses of the liver of B6C3F1 mice to the hepatocarcinogen Oxazepam.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 124: 31-38

CUNNINGHAM, M. L.; SOLIMAN, M. S.; BADR, M. Z.; MATTHEWS, H. B. (1995):

Rotenone, an anticarcinogen, inhibits cellular proliferation but not peroxisome proliferation in mouse liver.

Cancer Letters 95: 93-97

DAVIDSON, R. L.; BROEKER, P.; ASHMAN, C. R. (1988):

DNA base sequence changes and sequence specificity of bromodeoxyuridine-induced mutations in mammalian cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4406-4410

DECKER, K. (1990):

Biologically active products of stimulated macrophages (Kupffer cells).

Eur. J. Biochem. 192: 245-261

DEES, C.; TRAVIS, C. (1993):

The mitogenic potential of trichloroethylene in B6C3F1 mice.

Toxicol. Letters 69: 129-137

De FAZIO, A.; LEARY, J. A.; HEDLEY, D. W.; TATTERSALL, M. H. (1987):

Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo.

J. Histochem. Cytochem. 35: 571-577

DENDA, A.; RAO, P. M.; RAJAKALAKSHMI, S.; SARMA, D. R. (1985):

5-Azacytidine potentiates initiation induced by carcinogens in rat liver.

Carcinogenesis 6: 145-146

DIETRICH, D. R. (1993):

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

Crit. Rev. Toxicol. 23: 77-109

DIWAN, B. A.; RICE, J. M.; OHSHIMA, M.; WARD, J. M. (1986):

Interstrain differences in susceptibility to liver carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine and its promotion by phenobarbital in C57BL/6NCr, C3H/HeNCr^{MTV}- and DBA/2NCr mice.

Carcinogenesis 7: 215-220

DIWAN, B. A.; WARD, J. M.; RICE, J. M. (1991):

Modification of liver tumor development in rodents.

Prog. Exp. Tumor Res. 33: 76-107

DOOLITTLE, D. J.; MULLER, G.; SCRIBNER, H. E. (1987):

The relationship between hepatotoxicity and induction of replicative DNA synthesis following single or multiple doses of carbon tetrachloride.

J. Toxicol. Environ. Health 22: 63-78

DRINKWATER, N. R.; GINSLER, J. J. (1986):

Genetic control of hepatocarcinogenesis in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred mice.

Carcinogenesis 7:1701-1707

DRINKWATER, N. R.; HANIGAN, M. H.; KEMP, C. J. (1990):

Genetic and epigenetic promotion of hepatocarcinogenesis.

In: SEVENSON, D. E.; McCLAIN, R. M.; POPP, J. A.; SLAGA, T. J.; WARD, J. M.; PITOT, H. C. (eds):

Mouse liver carcinogenesis: Mechanisms and species comparison.

Alan R. Liss, Inc., New York: 163-176

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

Hepatocellular DNA synthesis in rats given peroxisome proliferating reagents: comparison of Wyeth-14,643 to clofibric acid, nafenopin and LY171883 in rats.

Carcinogenesis 12: 1557-1561

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

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

Carcinogenesis 11: 2245-2251

ELDRIDGE, S. R.; GOLDSWORTHY, T. L.; POPP, J. A.; BUTTERWORTH, B. E. (1992):
Mitogenic stimulation of hepatocellular proliferation in rodents following 1,4-
dichlorobenzene administration.

Carcinogenesis 13: 409-415

ELDRIDGE, S. R.; BUTTERWORTH, B. E.; GOLDSWORTHY, T. L. (1993):
Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents.

Environ. Health Perspect. 101 (Suppl. 5): 211-218

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

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

Fundam. Appl. Toxicol. 32: 159-167

EVANS, J. G.; COLLINS, M. A.; LAKE, B. G.; BUTLER, W. H. (1992):

The histology and development of hepatic nodules and carcinoma in C3H/He and C57BL/6
mice following chronic phenobarbitone administration.

Toxicol. Pathol. 20: 585-594

FERGUSON, D. J.; ANDERSON, T. J. (1981):

Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting"
human breast.

Br. J. Cancer 44: 171-181

FOLEY, J. F.; DIETRICH, D. R.; SWENBERG, J. A.; MARONPOT, R. R. (1991):

Detection and evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in rat tissue by an
improved immunohistochemical procedure.

J. Histotechnol. 14: 237-241

FOSTER, J. R. (1997):

The role of cell proliferation in chemically induced carcinogenesis.

J. Comp. Pathol. 116: 113-144

FOX, T. R.; BEST, L. L.; GOLDSWORTHY, S. M.; MILLS, J. J.; GOLDSWORTHY, T. L. (1993):

Gene expression and cell proliferation in rat liver after 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure.

Cancer Res. 53: 2265-2271

FRITH, C. H.; WARD, J. M. (1980):

A morphologic classification of proliferative and neoplastic hepatic lesions in mice.

J. Environ. Pathol. Toxicol. 3: 329-351

FRITH, C. H.; HIGHMAN, B.; BURGER, G.; SHELDON, W. D. (1983):

Spontaneous lesions in virgin and retired breeder BALB/c and C57BL/6 mice.

Lab. Anim. Sci. 33: 273-286

GARIBOLDI, M.; MANENTI, G.; CANZIAN, F.; FALVELLA, F. S.; PIEROTTI, M. A.; DELLA PORTA, G.; BINELLI, G.; DRAGANI, T. A. (1993):

Chromosome mapping of murine susceptibility loci to liver carcinogenesis.

Cancer Res. 53: 209-211

GEISLER, A.; STILLER, K. J.; MACHNIK, G. (1994):

The cellular reproduction in physiological and reparative liver regeneration.

Exp. Toxicol. Pathol. 46: 247-250

GEMMA, S.; FACCIOLI, S.; CHIECO, P.; SBRACCIA, M.; TESTAI, E.; VITTOZZI, L. (1996):

In vivo ChCl_3 bioactivation, toxicokinetics, toxicity and induced compensatory cell proliferation in B6C3F1 male mice.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 141: 394-402

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

Lack of covalent binding of peroxisome proliferators nafenopin and WY-14, 643 to DNA in vivo and in vitro.

Toxicol. Letters 24: 37-43

GÖTTEL, B. L. (1997):

Die Messung von Zellproliferation durch Bromodeoxyuridine (BrdU) Immunhistochemie, Studiendesign, Auswertstrategien und Kontrolldaten am Beispiel einer Phenacetin Applikation an Ratten.

Diss. Vet. med., Zürich

GOLD, L. S.; SLONE, T. H.; NEELA, B. M.; BERNSTEIN, L. (1991):

Target organs in chronic bioassays of 533 chemical carcinogens.

Environ. Health Perspect. 93: 233-246

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

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

Carcinogenesis 5: 67-71

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

Guidelines for measuring chemically-induced cell proliferation in specific rodent target organs.

In: BUTTERWORTH, B. E.; SLAGA, T. J. (eds.):

Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment.

Wiley-Liss, Inc., New York: 253-284

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

Concepts, labeling procedures, and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis.

Environ. Health Perspect. 101: 59-66

GOLDSWORTHY, T. L.; FRANSSON-STEEN, R.; MARONPOT, R. R. (1996):

Importance of and approaches to quantification of hepatocyte apoptosis.

Toxicol. Pathol. 24: 24-35

GOODMAN, J. I.; WARD, J. M.; POPP, J. A.; KLAUNIG, J. E.; FOX, T. R. (1991):

Mouse liver carcinogenesis: mechanisms and relevance

Fundam. Appl. Toxicol. 17: 651-665

GOTTSCHLING, B. (1999):

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

Diss. Vet. med., Gießen

GOWN, A. M.; JIANG, J. J.; MATLES, H.; SKELLY, M.; GOODPASTER, T.; CASS, L.; RESHATOF, M.; SPAULDING, D.; COLTERA, M. D. (1996):

Validation of the S-phase specificity of histone (H3) in situ hybridisation in normal and malignant cells.

J. Histochem. Cytochem. 44: 221-226

GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; WAGNER, A.; LAUER, B.; SCHULTE-HERMANN, R. (1994):

Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9995-9999

GRATZNER, H. G.; LEIF, R. C.; INGRAM, D. J.; CASTRO, O. (1975):

The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes.

Exp. Cell Res. 95: 88-94

GRATZNER, H. G. (1982):

Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: New reagent for detection of DNA replication.

Science 218: 474-475

GUSTADISEGNI, C.; BALDUZZI, M.; MANCUSO, M. T.; DI CONSIGLIO, E. (1999):

Liver mitochondria alterations in chloroform-treated Sprague-Dawley rats.

J. Toxicol. Environ. Health 57: 415-429

- HANIGAN, M. H.; KEMP, C. J.; GINSLER, J. J.; DRINKWATER, N. R. (1988):
Rapid growth of preneoplastic lesions in hepatocarcinogen-sensitive C3H/HeJ male mice relative to C57BL/6J male mice.
Carcinogenesis 9: 885-890
- HARRINGTON, E. A.; FANIDI, A.; EVAN, G. I. (1994):
Oncogenes and cell death.
Curr. Opin. Gen. Develop. 4: 120-129
- HENKES, W.; DOPPLER, C.; ECKERT, R.; HALBRITTER, H.-P.; RUSSMANN, E.; STIER, B. (1993):
Methoden zur Messung der Zellproliferation.
Boehringer Mannheim Biochemica: Sonderdruck aus Bio Tec
Vogel-Verlag und Druck KG, Würzburg: 1-6
- HIASA, Y.; KITAHORI, Y.; OHSHIMA, M.; FUJITA, T.; YUASA, T.; KONISHI, N.; MIYASHIRO, A. (1982):
Promoting effects of phenobarbital and barbital on development of thyroid tumors in rats treated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine.
Carcinogenesis 3: 1187-1190
- HILL, R. N.; CLEMENS, T. L.; LIU, D. K.; VESELL, E. S. (1975):
Genetic control of chloroform toxicity in mice.
Science 190: 159-161
- HUFF, J. E. (1993):
Absence of morphological correlation between chemical toxicity and chemical carcinogenesis.
Environ. Health Perspect. 101 (Suppl. 5): 45-53
- INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY (IPCS) (1994):
Chloroform.
Environ. Health Crit., Vol. 163, World Health Organization, Geneva, Switzerland

ISENBERG, J. S.; KOLAJA, K. L.; AYOUBI, S. A.; WATKINS, J. B.; KLAUNIG, J. E. (1997):

Inhibition of Wy-14,643 induced hepatic lesion growth in mice by rotenone.

Carcinogenesis 18: 1511-1519

ISRAEL, Y.; KALANT, H.; ORREGO, H.; KHANNA, J. M.; VIDELA, L.; PHILLIPS, J. M. (1975):

Experimental alcohol-induced hepatic necrosis: suppression by propylthiouracil.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1137-1141

ISSEMANN, I.; GREEN, S. (1990):

Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.

Nature 347: 645-650

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

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

Carcinogenesis 17: 1623-1632

JAMES, R.; DESMOND, P.; KÜPFER, A.; SCHENKER, S.; BRANCH, R. A. (1981):

The differential localization of various drug metabolizing systems within the rat liver lobule as determined by the hepatotoxins allyl alcohol, carbon tetrachloride and bromobenzene.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 217: 127-132

JAMES, S. J.; MUSKHELISHVILI, L.; GAYLOR, D. W.; TURTURRO, A.; HART, R. (1998):

Upregulation of apoptosis with dietary restriction: implications for carcinogenesis and aging.

Environ. Health Perspect. 106 (Suppl. 1): 307-312

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

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

In: BUTTERWORTH, B. E.; SLAGA, T. J. (eds.):

Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment.

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

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

Assessment of the influence of subacute phenobarbitone administration on multi-tissue cell proliferation in the rat using bromodeoxyuridine immunocytochemistry.

Archiv. Toxicol. 67: 622-628

JONES, P. A.; BUCKLEY, J. D. (1990):

The role of DNA methylation in cancer.

Adv. Cancer Res. 54: 1-23

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

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

Fundam. Appl. Toxicol. 5: 760-765

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

Functional specialization of different hepatocyte populations.

Physiol. Rev. 69: 708-764

KANNO, J.; MATSUOKA, C.; FURUTA, K. ONODERA, H. MIYAJIMA, H.; MAEKAWA, A.; HAYASHI, Y. (1990):

Tumor promoting effect of goitrogens on the rat thyroid.

Toxicol. Pathol. 18: 239-246

KEDDERIS, G. L. (1996):

Biochemical basis of hepatocellular injury.

Toxicol. Pathol. 24: 77-83

KENNEDY, S.; RETTINGER, S.; FLYE, M. W.; PONDER, K. P. (1995):

Experiments in transgenic mice show that hepatocytes are the source for postnatal liver growth and do not stream.

Hepatology 22:160-168

KERR, J. F.; WHYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. (1972):

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics.

Br. J. Cancer 26: 239-257

KLAUNIG, J. E.; RUCH, R. J. (1987):

Strain and species effects on the inhibition of hepatocyte intercellular communication by liver tumor promoters.

Cancer Lett. 36: 161-168

KLAUNIG, J. E.; KOLAJA, K. L. (1998):

Chemical induced hepatocarcinogenesis.

In: PLAA, G. L.; HEWITT, W. R. (eds.):

Toxicology of the liver. 2nd ed.

Taylor & Francis, Washington DC: 93-121

KLINGER, N.; DEVEREUX, T.; MARONPOT, R. R.; FOUTS, J. (1986):

Functional hepatocellular heterogeneity determined by the hepatotoxins allyl alcohol and bromobenzene in immature and adult Fischer 344 rats.

Toxicol Appl. Pharmacol. 83: 108-114

KOLAJA, K. L.; BUNTING, K. A.; KLAUNIG, J. E. (1996a):

Inhibition of tumor promotion and hepatocellular lesion growth by dietary restriction in mice.

Carcinogenesis 17: 1657-1664

KOLAJA, K. L.; STEVENSON, D. E.; WALBORG, E. F.; KLAUNIG, J. E. (1996b):

Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis.

Carcinogenesis 17: 947-954

KOLAJA, K. L.; STEVENSON, D. E.; JOHNSON, J. T.; WALBORG, E. F.; KLAUNIG, J. E. (1996c):

Subchronic effects of dieldrin and phenobarbital on hepatic DNA synthesis in mice and rats.
Fundam. Appl. Toxicol. 29: 19-228

KOLDE, G. ROESSNER, A.; THERMANN, H. (1976):

Effects of clofibrate (alpha-p-chlorophenoxyisobutyl-ethyl-ester) on male rat liver.
Virchows Arch. B 22: 73-87

LAKE, B. G.; COLLINS, M. A.; EVANS, J. G.; GANGOLLI, S. D. (1986):

Xenobiotic metabolising enzyme activities in spontaneous and phenobarbital (PB)-induced liver nodules C3H/He mice.
Hum. Exp. Toxicol. 6: 230-232

LAKE, B. G.; CUNNINGHAM, M. E.; PRICE, R. J. (1997):

Comparison of the hepatic and renal effects of 1,4-dichlorobenzene in the rat and mouse.
Fundam. Appl. Toxicol. 39: 67-75

LANIER, T. L.; BERGER, E. K.; EACHO, P. I. (1989):

Comparison of 5-bromodeoxyuridine and [³H]thymidine in rodent hepatocellular proliferation studies.
Carcinogenesis 10: 1341-1343

LARSON, J. L.; WOLF, D. C.; BUTTERWORTH, B. E. (1993):

Acute hepatotoxic and nephrotoxic effects of chloroform in male F-344 rats and female B6C3F1 mice.
Fundam. Appl. Toxicol. 20: 302-315

LARSON, J. L.; WOLF, D. C.; BUTTERWORTH, B. E. (1994a):

Induced cytolethality and regenerative cell proliferation in the livers and kidneys of male B6C3F1 mice given chloroform by gavage.
Fundam. Appl. Toxicol. 23: 537-543

LARSON, J. L.; SPRANKLE, C. S.; BUTTERWORTH, B. E. (1994b):

Lack of chloroform-induced DNA repair in vitro and in vivo in hepatocytes of female B6C3F1 mice.

Environ. Mol. Mutagen. 23: 132-136

LARSON, J. L.; WOLF, D. C.; MORGAN, K. T.; MÉRY, S.; BUTTERWORTH, B. E. (1994c):

The toxicity of 1-week exposures to inhaled chloroform in female B6C3F1 mice and male F-344 rats.

Fundam. Appl. Toxicol. 22: 431-446

LARSON, J. L.; WOLF, D. C.; BUTTERWORTH, B. E. (1994d):

Induced cytolethality and cell proliferation in the hepatocarcinogenicity of chloroform in female B6C3F1 mice: comparison of administration by gavage in corn oil vs ad libitum in drinking water.

Fundam. Appl. Toxicol. 22: 90-102

LARSON, J. L.; TEMPLIN, M. V.; WOLF, D. C.; JAMISON, K. C.; LEININGER, J. R.; MÉRY, S.; MORGAN, K. T.; WONG, D. C.; CONOLLY, R. B.; BUTTERWORTH, B. E. (1996):

A 90-day chloroform inhalation study in female and male B6C3F1 mice: implications for cancer risk assessment.

Fundam. Appl. Toxicol. 30: 118-137

LAWANI, N. D.; REDDY, M. K.; QUERSHI, S. A.; REDDY, J. K. (1982):

Development of carcinomas and increased peroxisomal fatty acid β -oxidation in rats fed [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid (Wy-14,643) in semipurified diet.

Carcinogenesis 2: 1211-1217

LEDDA-COLUMBANO, G. M.; SHINOZUKA, H.; KATYAL, S. L.; COLUMBANO, A. (1996):

Cell proliferation, cell death and hepatocarcinogenesis.

Cell Death Diff. 3: 118-137

LEE, J. H.; ILIC, Z.; SELL, S. (1996):

Cell kinetics of repair after allyl alcohol-induced liver necrosis in mice.

Int. J. Exp. Pathol. 77: 63-72

LEE, S. S.; PINEAU, T.; DRAGO, J.; LEE, E. J.; OWENS, J. W.; KROETZ, D. L.; FERNANDEZ-SALGUERO, P.M.; WESTPHAL, H.; GONZALEZ, F. J. (1995):

Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators.

Mol. Cell. Biol. 15: 3012-3022

LEE, V. M.; CAMERON, R. G.; ARCHER, M. C. (1998):

Zonal location of compensatory hepatocyte proliferation following chemically induced hepatotoxicity in rats and humans.

Toxicol. Pathol. 26: 621-627

LIN, E. L. C.; KLAUNIG, J. E.; MATTOX, J. K.; WEGHORST, C. M.; McFARLAND, B. H.; PEREIRA, M. A. (1989):

Comparison of the effects of acute and subacute treatment of phenobarbital in different strains of mice.

Cancer Lett. 48: 43-51

LOCK, E. A.; MITCHELL, A. M.; ELCOMBE, C. R. (1989):

Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29: 145-163

LOEWENSTEIN, W. R. (1979):

Junctional intercellular communication and the control of growth.

Biochim. Biophys. Acta 560: 1-65

LUEBECK, E. G.; MOOLGAVKAR, S. H.; BUCHMANN, A.; SCHWARZ, M. (1991):

Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: quantitative analysis of enzyme-altered foci.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 111: 469-484

- LUNDGREN, B.; BERGSTRAND, A.; KARLSSON, K.; De PIERRE, J. W. (1990):
Effects of dietary treatment with clofibrate, nafenopin or WY-14.643 on mitochondria and DNA in mouse liver.
Biochim. Biophys. Acta 1035: 132-138
- MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. (1987):
Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients.
FASEB J. 1: 441-445
- MAJNO, G.; JORIS, I. (1995):
Apoptosis, oncosis, and necrosis.
Am. J. Pathol. 146: 3-15
- MANSUY, D.; BEAUNE, P.; CRESTEIL, T.; LANGE, M.; LEROUX, J. P. (1977):
Evidence for phosgene during liver microsomal oxidation of chloroform.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 79: 513-517
- MARONPOT, R. R.; HASEMAN, J. K.; BOORMAN, G. A.; EUSTIS, S. E.; RAO, G. N.; HUFF, J. E. (1987):
Liver lesion in B6C3F1 mice: the National Toxicology Program, experience and position.
Arch. Toxicol. Suppl. 10: 10-26
- MARSMAN, D. S.; CATTLEY, R. C.; CONWAY, J. G.; POPP, J. A. (1988):
Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferator di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylydino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats.
Cancer Res. 48: 6739-6744
- MARSMAN, D. S.; GOLDSWORTHY, T. L.; POPP, J. A. (1992):
Contrasting hepatocytic peroxisome proliferation, lipofuscin accumulation and cell turnover for the hepatocarcinogenes Wy-14, 643 and clofibric acid.
Carcinogenesis 13: 1011-1017

MARSMAN, D. S.; BARRETT, J. C. (1994):

Apoptosis and chemical carcinogenesis.

Risk Anal. 14: 321-326

MASUDA, M.; TAKANO, Y.; IKI, M.; JINZA, S.; NOGUCHI, S.; KUBOTA, Y.; HOSAKA, M. (1997):

Predictive value of argyrophilic nuclear-organizer-region-associated proteins in bladder cancer, using cell-imprint preparation.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123: 1-5

MATSUSHIMA, T.; MURAMATSU, M.; HARESAKU, M. (1985):

Mutation tests on Salmonella typhimurium by the preincubation method.

Prog. Mutat. Res. 5: 181-186

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. (1975):

Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 5135-5139

McCLAIN, R. M.; LEVIN, A. A.; POSCH, R.; DOWNING, J. C. (1989):

The effect of phenobarbital on the metabolism and excretion of thyroxine in rats.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 94: 254-265

McCONKEY, D. J.; HARTZELL, P.; NICOTERA, P.; WYLLIE, A. H.; ORRENIUS, S. (1988):

Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress.

Toxicol. Lett. 42: 123-130

MELNICK, R. L.; HUFF, J. E. ; BARRETT, J. C.; MARONPOT, R. R.; LUCIER, G.; PORTIER, C. J. (1993):

Cell proliferation and chemical carcinogenesis: symposium overview.

Environ. Health Perspet. 101 (Suppl. 5): 3-8

MELVIN, J. B. (1968):

The localization of mitotic figures in regenerating mouse liver.

Anat. Rec.: 160: 607-618

MICHALOPOULOS, G. K.; De FRANCES, M. C. (1997):

Liver regeneration.

Science 276: 60-66

MOODY, D. E.; REDDY, J. K. (1976):

Morphometric analysis of the ultrastructural changes in rat liver induced by the peroxisome proliferator SaH42-348.

J. Cell Biol. 71: 768-780

MOODY, D. E.; REDDY, J. K. (1978):

The hepatic effects of hypolipidemic drugs (Clofibrate, Nafenopin, Tibric acid, and WY-14,643) on hepatic peroxisomes and peroxisome-associated enzymes.

Am. J. Pathol. 90: 435-446

MORRIS, R. W. (1993):

Analysis of cell proliferation data.

Environ. Health Perspect. 101 (Suppl. 5): 73-78

MUSKHELISHVILI, L.; HART, R. W.; TURTURRO, A.; JAMES, S. J. (1995):

Age-related changes in the intrinsic rate of apoptosis in liver of diet-restricted and ad libitum-fed B6C3F1 mice.

Am. J. Pathol. 147: 20-24

NAPALKOV, N. P.; ANISIMOV, V. N.; LIKHACHEV, A. J.; TOMATIS, L. (1989):

5-Bromodeoxyuridine-induced carcinogenesis and its modification by persistent estrus syndrome, unilateral nephrectomy, and X-irradiation in rats.

Cancer Res. 49: 318-323

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) (1976):

Carcinogenesis bioassay of chloroform.

National Tech. Inform. Service No. PB264018/AS, NCI, Bethesda

NEMALI, M. R.; REDDY, M. K.; USUDA, N.; REDDY, P. G.; COMEAU, L. D.; RAO, M. S.; REDDY, J. K. (1989):

Differential induction and regulation of peroxisomal enzymes: predictive value of peroxisome proliferation in identifying certain nonmutagenic carcinogens.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 97: 72-87

NEVEU, M.; HULLY, J.; BABCOCK, K.; HERTZBERG, E.; NICHOLSON, B.; PAUL, D.; PITOT, H. C. (1994):

Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in the rat.

J. Cell Sci. 107: 83-95

NICOTERA, P.; DYPBUKT, J. M.; ROSSI, A. D.; MANZO, L.; ORRENIUS, S. (1992):

Thiol modification and cell signalling in chemical toxicity.

Toxicol. Lett. 64-65: 563-567

OLSON, M. J. (1988):

DNA strand breaks induced by hydrogen peroxide in isolated rat hepatocytes.

J. Toxicol. Environ. Health 23: 407-423

ORTON, T. C.; DOUGHTY, S. E.; KALINOWSKI, A. E.; LORD, P. G.; WADSWORTH, P. F. (1996):

Expression of growth factors and growth factor receptors in the liver of C57BL/10J mice following administration of phenobarbitone.

Carcinogenesis 17: 973-981

PERAINO, C.; FRY, R. J. M.; STAFFELDT, E.; CHRISTOPHER, J. P. (1975):

Comparative enhancing effects of phenobarbital, amorbarbital, diphenylhydantoin and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat.

Cancer Res. 35: 2884-2890

PEREIRA, M. A. (1994):

Route of administration determines whether chloroform enhances or inhibits cell proliferation in the liver of B6C3F1 mice.

Fundam. Appl. Toxicol. 23: 87-92

PEREIRA, M. A.; GROTHAUS, M. (1997):

Chloroform in drinking water prevents hepatic cell proliferation induced by chloroform administered by gavage in corn oil to mice.

Fundam. Appl. Toxicol. 37: 82-87

PERICIN, C.; THOMANN, P. (1979):

Comparison of the acute toxicity of clioquinol, histamine, and chloroform in different strains of mice.

Arch. Toxicol. Suppl. 2: 371-373

PETERS, J. M.; CATTLEY, R. C.; GONZALEZ, F. J. (1997):

Role of PPAR α in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643.

Carcinogenesis 18: 2029-2033

PETERS, J. M.; AOYAMA, T.; CATTLEY, R. C.; NOBUMITSU, U.; HASHIMOTO, T.; GONZALEZ, F. J. (1998):

Role of peroxisome proliferator-activated receptor α in altered cell cycle regulation in mouse liver.

Carcinogenesis 19: 1989-1994

PITOT, H. C.; GOLDSWORTHY, T. L.; MORAN, S. (1981):

The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer.

J. Supramol. Struct. Cell. Biochem. 17: 133-146

PITOT, H. C.; GOLDSWORTHY, T. L.; MORAN, S.; KENNAN, W.; GLAUERT, H. P.; MARONPOT, R. R.; CAMPBELL, H. A. (1987):

A method to quantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose-response relationships to altered hepatic foci.

Carcinogenesis 8: 1491-1499

PITOT, H. C. (1989):

Progression : the terminal stage in carcinogenesis.

Jap. J. Cancer Res. 80: 599-607

PITOT, H. C. (1990):

Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 465-500

PLANT, N. J.; HORLEY, N. J.; DICKINS, M.; HASMALL, S.; ELCOMBE, C. R.; BELL, D. R. (1998):

The coordinate regulation of DNA synthesis and suppression of apoptosis is differentially regulated by the liver growth agents, phenobarbital and methylnonoxipate.

Carcinogenesis 19: 1521-1527

POHL, L. R.; BHOOSHAN, B.; WHITTAKER, N. F.; KRISHNA, G. (1977):

Phosgene: A metabolite of chloroform.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 79: 684-691

PONDER, K. P.; GUPTA, S.; LELAND, F.; DARLINGTON, G.; FINEGOLD, M.; De MAYO, J.; LEDLEY, F.; CHOWDHURY, J.; WOO, S. L. (1991):

Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1217-1221

PONDER, K. P. (1996):

Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies.

FASEB J. 10: 673-682

POPPER, H.; SCHAFFNER, F. (1961):

Die Leber, Struktur und Funktion.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 23-74

PREAT, V.; LANS, M.; DE GERLACHE, J.; TAPER, H.; ROBERFROID, M. (1987):

Influence of the duration and the delay of administration of phenobarbital on its modulating effect on rat hepatocarcinogenesis.

Carcinogenesis 8: 333-335

RABES, H. M.; WIRSCHING, R.; TUCZEK, H. V.; ISELER, G. (1976):

Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy.

Cell Tissue Kinet. 9: 517-532

RAO, G. N.; BIRNBAUM, L. S.; COLLINS, J.J.; TENNANT, R. W.; SKOW, L. C. (1988a):

Mouse strains for chemical carcinogenicity studies: overview of a workshop.

Fundam. Appl. Toxicol. 10: 385-394

RAO, M. S.; DWIVEDI, R. S.; SUBBARAO, V.; REDDY, J. K. (1988b):

Induction of peroxisome proliferation and hepatic tumors in C57BL/6N mice by clofibrate, a hypolipidemic compound.

Br. J. Cancer 58:46-51

RAPPAPORT, A. M.; BOROWY, Z. J.; LOUGHEED, W. M.; LOTTO, W. N. (1954):

Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit.

Anat. Rec. 119: 11-23

RAY, J. S.; HARBISON, M. L.; McCLAIN, R. M.; GOODMAN, J. I. (1994):

Alterations in the methylation status and expression of the raf oncogene in phenobarbital-induced and spontaneous B6C3F1 mouse liver tumors.

Mol. Carcinogenesis 9: 155-166

RAZIN, A.; KAFRI, T. (1994):

DNA methylation from embryo to adult.

Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 48: 53-81

REDDY, J. K.; MOODY, D. E.; AZARNOFF, D. L.; TOMARELLI, R. M. (1977):

Hepatic effects of some [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid (Wy-14,643) analogs in the mouse.

Arch. Int. Pharmacodyn. 225: 51-57

REDDY, J. K.; RAO, M. S.; AZARNOFF, D. L.; SELL, S. (1979):

Mitogenic and carcinogenic effects of a hypolipidemic peroxisome proliferator, [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid (Wy-14,643) in rat and mouse liver.

Cancer Res. 39: 152-161

REDDY, J. K.; LALWANI, N. D. (1983):

Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans.

Crit. Rev. Toxicol. 12: 1-58

REDDY, J. K.; RAO, M. S. (1986):

Peroxisome proliferators and cancer: mechanisms and implications.

Trends Pharmacol. Sci. 7: 438-443

REDDY, J. K.; RAO, M. S. (1989):

Oxidative DNA damage caused by persistent peroxisome proliferation: its role in hepatocarcinogenesis.

Mutat. Res. 214: 63-68

REITZ, R. H.; FOX, T. R.; QUAST, J. F. (1982):

Mechanistic considerations for carcinogenic risk estimation: chloroform.

Environ. Health Perspect. 46: 163-168

REITZ, R. H.; MENDRALA, A. L.; CORLEY, R. A.; QUAST, J. F.; GARGAS, M. L.; ANDERSEN, M. E.; STAATS, D. A.; CONOLLY, R. B. (1990):

Estimating the risk of liver cancer associated with human exposures to chloroform using physiologically based pharmacokinetic modeling.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 105: 443-459

ROBERTS , R. A.; SOAMES, A. R.; GILL, J. H.; JAMES, N. H.; WHEELDON, E. B. (1995):

Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different discret hepatocyte populations.

Carcinogenesis 16: 1693-1698

ROE, F. J.; PALMER, A. K.; WORDEN, A. N.; VAN ABBE, N. J. (1979):

Safety evaluation of toothpaste containig chloroform. I. Long-term studies in mice.

J. Environ. Pathol. Toxicol. 2: 799-819

ROSE, M. L.; GERMOLEC, G. R.; SCHOONHOVEN, R.; THURMAN, R. G. (1997):

Kupffer cells are causally resonsible for the mitogenic effect of peroxisome proliferators.

Carcinogenesis 18: 1453-1456

ROSSI, L.; RAVERA, M.; REPETTI, G.; SANTI, L. (1977):

Long-term administration of DDT or phenobarbital-Na in Wistar rats.

Int. J. Cancer 19: 179-185

RUCH, R. J.; KLAUNIG, J. E.; PEREIRA, M. A. (1987):

Inhibition of intercellular communication between mouse hepatocytes by tumor promoters.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 87: 111-120

SATO, K. (1989):

Glutathion S-transferases as markers of preneoplasia and neoplasia.

Adv. Cancer Res. 52: 205-255

SCHAFFER, L. D.; KLAUNIG, J. E. (1991):

Concentration and duration dependent induction of hepatocyte DNA syntheseis in male B6C3F1 mice exposed to phenobarbital.

Toxicologist 11: 128

SCHULTE-HERMANN, R. (1985):

Tumor promotion in the liver.

Arch. Toxicol. 57: 147-158

SCHULTE-HERMANN, R.; KRAUPP-GRASL, B.; BURSCH, W.; GERBRACHT, U.;
TIMMERMANN-TROSIENER, I. (1989):

Effects of non-genotoxic hepatocarcigens phenobarbital and nafenopin on phenotype and growth of different populations of altered foci in rat liver.

Toxicol. Pathol. 17: 642-650

SCHULTE-HERMANN, R.; TIMMERMANN-TROSIENER, I.; BARTHEL, G.; BURSCH,
W. (1990):

DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth in altered foci in rat liver during phenobarbital promotion.

Cancer Res. 50: 5127-5135

SCHULTE-HERMANN, R.; BURSCH, W.; PARZEFALL, W. (1991):

Mitogenesis and programmed cell death as determinants of carcinogenicity of nongenotoxic compounds.

In: BUTTERWORTH, B. E.; SLAGA, T. J (eds).:

Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment.

Wiley-Liss, Inc., New York: 237-244

SELL, S. (1994):

Liver stem cells.

Modern Pathol. 7: 105-112

SIGAL, S. H.; BRILL, S.; FIORINO, A. S.; REID, L. M. (1992):

The liver as a stem cell and lineage system.

Am. J. Physiol. 263: 139-148

SIRICA, A. E.; MATHIS, G. A.; SANO, N.; ELMORE, L. W. (1990):

Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells.

Pathobiology 58: 44-64

SMITH, J. H.; MAITA, K.; SLEIGHT, S. D.; HOOK, J. B. (1983):

Mechanisms of chloroform nephrotoxicity. I. Time course of chloroform toxicity in male and female mice.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 70: 467-479

SMITH, J. H.; HOOK, J. B. (1984):

Mechanism of chloroform nephrotoxicity. III. Renal and hepatic microsomal metabolism of chloroform in mice.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 73: 511-524

SMITH, P. F.; O'BRIEN, K. A.; KEENAN, K. P. (1991):

Evaluation of bromodeoxyuridine labeling in hepatomegaly produced by peroxysomal proliferation of P-450 induction in rodents.

In: BUTTERWORTH, B. E.; SLAGA, T. J.(eds.):

Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment.

Wiley-Liss, Inc., New York: 285-289

SOAMES, A. R.; LAVENDER, D.; FOSTER, J. R.; WILLIAMS, S. M.; WHEELDON, E. B. (1994):

Image analysis of bromodeoxyuridine (BrdU) staining for measurement of S-phase in rat and mouse liver.

J. Histochem. Cytochem. 42: 939-944

STANDEVEN, A. M.; GOLDSWORTHY, T. L. (1994):

Identification of hepatic mitogenic and cytochrome P-450-inducing fractions of unleaded gasoline in B6C3F1 mice.

J. Toxicol. Environ. Health 43: 213-224

STANDEVEN, A. M.; WOLF, D. C.; GOLDSWORTHY, T. L. (1995):

Promotion of hepatic preneoplastic lesions in male B6C3F1 mice by unleaded gasoline.

Environ. Health Perspect. 103: 696-700

STEPHAN, A. (1999):

Chemisch induzierte Zellproliferation und Karzinogenese: Retrospektive Untersuchung der Zellproliferation mittels Nachweis des Zellproliferationsmarkers PCNA in der Leber von Ratten aus toxikologischen Studien.

Diss. Vet. med., Gießen

STEPHAN, H. (2001):

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

Diss. Vet. med., Gießen, in Vorbereitung

STINCHECOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCH, K. W.; SCHWARZ, M. (1995):

Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorobenzo-p-dioxin-mediated tumor promotion in rat liver.

Carcinogenesis 16: 1271-1275

SURUR, J. M.; MORENO, F. R.; BADRÁN, A. F.; ECHAVE LLANOS, J. M. (1985):

Variations in DNA synthesis and mitotic indices in hepatocytes and sinusoid litoral cells of adult intact male mouse along a circadian time span.

Chronobiol. Int. 2, 161-168

SWENBERG, J. A.; MARONPOT, R. R. (1991):

Chemically induced cell proliferation as a criterion in selecting doses for long-term bioassays.

In: BUTTERWORTH, B. E.; SLAGA, T. J. (eds.):

Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment.

Wiley-Liss, Inc., New York: 285-289

TANAKA, K.; KAWAMURA, S.; MATSUMOTO, H. DOI, K. (1994):

Effects of chronic treatment with clofibric acid on response of rat hepatocytes to mitogenic stimuli.

Toxicol. Letters 74: 141-148

TETER, K. P.; HOLLOWAY, D. C.; SANDUSKY, G. E. (1995):

Assessment of PCNA (19A2) and Ki-67 (MIB1) cell proliferation markers in formalin fixed tissues.

J. Histotech. 18: 2-6

THEOLOGIDES, A.; ZAKI, G. F. (1969):

Mitotic index in the regenerating liver of tumor-bearing mice.

Cancer Res. 29: 1913-1915

TROSKO, J. E.; GOODMANN, J. I. (1994):

Intercellular communication may facilitate apoptosis: implication for tumor promotion.

Mol. Carcinogenesis 11: 8-12

VAN ABBE, N. J.; GREEN, T. J.; JONES, E.; RICHOLD, M.; ROE, F. J. (1982):

Bacterial mutagenicity studies on chloroform in vitro.

Food Chem. Toxicol. 20: 557-561

VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P.; MATZE-COK, P.; WISSE-BREKELMANS, E. C.; VAN GELEN, C. M.; KURVER, P. H.; BELLOT, S. M.; FIJNHEER, J.; VAN GORP, L. H.; KWEE, W. S.; LOS, J.; PTERSE, J. L.; RUITENBERG, H. M.; SCHAPERS, R. F.; SCHIPPER, M. E.; SOMSEN, J. G.; WILLIG, A. W.; ARIENS, A. T. (1992):

Reproducibility of mitosis counting in 2,468 breast cancer specimens. Result from the multicentre morphometric mammary carcinoma project.

Human Pathol. 23: 603-611

WADA, N.; MARSMAN, D. S.; POPP, J. A. (1992):

Dose-related effects of the hepatocarcinogen Wy-14, 643 on peroxisomes and cell replication.

Fundam. Appl. Toxicol. 18: 149-154

WAKEFIELD, L. M.; WINOKUR, T. S.; HOLLANDS, R. S.; CHRISTOPHERSON, K.; LEVINSON, A. D.; SPORN, M. B. (1990):

Recombinant latent transformed growth factor β has a longer plasma half live in rats than active transforming growth factor β_1 , and a different tissue distribution.

J. Clin. Invest. 86: 1976-1984

WARD, J. M.; RICE, J. M.; CREASIA, P.; LYNCH, P.; RIGGS, C. (1983):

Dissimilar patterns of promotion by di(2-ethylhexyl)phthalate and phenobarbital of cellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice.

Carcinogenesis 4: 1020-1029

WARD, J. M.; OHSHIMA, M. (1985):

Evidence of lack of promotion of the growth of the common naturally occurring basophilic focal hepatocellular proliferative liver lesions in aged F344/NCr rats by phenobarbital.

J. Nat. Cancer Inst. 71: 815-823

WARD, J. M.; HAGIWARA, A.; ANDERSON, L.; LINDSEY, K.; DIWAN, B. A. (1988):

The chronic hepatic or renal toxicity of Di(2-ethylhexyl) Phtalate, Acetaminophen, Sodium Barbital, and Phenobarbital in male B6C3F1 mice: autoradiographic, immunohistochemical, and biochemical evidence for levels of DNA synthesis not associated with carcinogenesis or tumor promotion.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 96: 494-506

WARREN, J. R.; SIMMON, V. F.; REDDY, J. K. (1980):

Properties of hypolipidemic peroxisome proliferators in the lymphocyte [³H]thymidine and salmonella mutagenesis assays.

Cancer Res. 40: 36-41

WEGHORST, C. M.; HENNEMANN, J. R.; WARD, J. M. (1991):

Dose response of hepatic and renal DNA synthetic rates to continuous exposure of bromodeoxyuridine (BrdU) via slow-release pellets or osmotic minipumps in male B6C3F1 mice.

J. Histochem. Cytochem. 39: 177-184

WEINSTEIN, B. (1991a):

Mitogenesis is only one factor in carcinogenesis.

Science 251: 387-388

WEINSTEIN, B. (1991b):

Nonmutagenic mechanisms in carcinogenesis: role of protein kinase C in signal transduction and growth control.

Environ. Health Perspect. 93: 175-179

WERLICH, T.; STILLER, K. J.; MACHNIK, G. (1998):

Experimental studies on the stem cell concept of liver regeneration. I.

Exp. Toxicol. Pathol. 50: 73-77

WHYSNER, J.; ROSS, P. M.; WILLIAMS, G. M. (1996):

Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion.

Pharmacol. Ther. 7: 153-199

WIJSMAN, J. H.; JONKER, R. R.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C. J.; CORNELISSE, C. J.; VAN DIERENDONCK, J. H. (1993):

A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA.

J. Histochem. Cytochem. 41: 7-12

WILSON, D. M.; GOLDSWORTHY, T. L.; POPP, J. A.; BUTTERWORTH, B. E. (1992):
Evaluation of genotoxicity, pathological lesions, and cell proliferation in livers of rats and mice treated with furan.

Environ. Mol. Mutagen. 19: 209-222

WRIGHT, N. A.; ALISON, M. (1984):

The biology of epithelial cell population.

Clarendon Press, Oxford

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F.; CURRIE, A. R. (1980):

Cell death: the significance of apoptosis.

Int. Rev. Cytol. 68: 251-307

YAMASKI, H. (1991):

Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis.

Environ. Health Perspect. 93: 191-197

YANG, L. L.; MAHER, V. M.; McCORMICK, J. J. (1982):

Relationship between excision repair and the cytotoxic and mutagenic effect of the anti-7,8-diol-9,10-epoxid of benzo(a)pyrene in human cells.

Mut. Res. 94: 435-447

ZAJICEK, G.; OREN, R.; WEINBERG, M. (1985):

The streaming liver.

Liver 5: 293-300

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Reinacher für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Aufnahme am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken.

Herrn Dr. Rainer Bahnemann danke ich ebenfalls für die Überlassung des Themas. Vor allem durch seine Initiative und Begeisterung für die Zellproliferation wurde der Grundstein für diese Arbeit gelegt. Weiterhin möchte ich für die Betreuung vor Ort, viele gute Gespräche und Aufmunterungen und einige heiße Badminton-Matches danken.

Der Abteilung Toxikologie der BASF-AG Ludwigshafen und hier besonders Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Gelbke danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung sowie allen Mitarbeitern von Z470 für die freundlichen Aufnahme.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Pathologie insbesondere Frau Dr. B. Kittel und Frau Dr. K. Küttler sowie Herrn Dr. C. Gemhardt und Herrn Dr. W. Kaufmann für die Bereitschaft, bei allen kleineren oder größeren Fragen zu helfen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Herren Hans-Robert Hofmann und Thomas Tatarewicz für die Hilfestellung bei der Erkundung der Immunhistologie bedanken. Ebenfalls bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und die Freundschaft.

Dem Team vom Labor USP, Herrn Marco Gerst und Frau Phong und insbesondere Frau Inta Kögel, danke ich für die Unterstützung in allen Notlagen sowie für die sehr entspannenden Frühstücksrunden im Keller. Inta und Karl Kögel möchte ich hiermit auch ganz herzlich für die Freundschaft und die schon fast zur 2. Heimat gewordene Residenz in Kallstadt danken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie der JLU-Gießen möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt, Frau Dr. Christiane Herden, Frau Dr. Anja Kipar und Herrn Prof. Dr. M. Reinacher danke ich für die Geduld bei der Einführung in die Veterinär-Pathologie und ihre Hilfsbereitschaft bei „Hallen-Notfällen“.

Weiterhin möchte ich mich bei der „Seminarraum-Crew“ Tatjana Euler, Heike May und Dirk Schwarz sowie auch bei Tamara Bleier für die nette Atmosphäre und viele gelungene Siedlerabende bedanken. Kernt Köhler und Dr. Dr. Udo Hetzel sei für die Unterstützung bei computer- und sektionstechnischen Problemen herzlich gedankt. Anja Knippel sende ich einen Gruß und wünsche weiterhin viel Durchhaltevermögen, aber ich habs ja auch geschafft.

Frau M. Dammann aus der Abteilung Toxikologie der BASF AG sowie Herrn Dr. K. Failing und Herrn H. Heiter von der AG Biomathematik und Datenverarbeitung danke ich für die Betreuung und Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Birgit Blazey, Anke Heuser und Hendrike Stephan seien hiermit als Weggefährtinnen und „Leidensgenossinnen“ begrüßt. An Barbara Gottschling einen ganz dicken Gruß noch schnell über den großen Teich und vielen Dank für die ausdauernde Aufbauarbeit und die aufmunternden Mails aus den USA.

Doris Görg möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die Durchsicht des Manuskriptes danken. Einen Gruß an meine WG und Susi Rieck, die ab und zu eine gestreßte Doktorandin ertragen mußten.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die Unterstützung über all die Jahre und ihren Glauben in mich bedanken.

Abschließend bedanke ich mich bei meinem Freund Jim Köhler dafür, daß er einfach immer für mich da war/ist und somit einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.