

UNTERSUCHUNGSBERICHT

ZUM THEMA

„GENTOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG VON WASSERPROBEN AUS KORNEUBURG“

Bearbeitung: Dr. Tamara Grummt
Dr. Rita Heinze

Bad Elster, den 3. Juli 2013

1. Ausgangspunkt

Auf Anfrage der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) nahm das deutsche Umweltbundesamt (UBA)/Fachgebiet II 3.6 „Toxikologie des Trinkwassers und des Badebeckenwassers“ eine Erfassung und Bewertung möglicher gentoxischer Gefährdungspotenziale des pestizidbelasteten Wassers von Korneuburg vor.

2. Probeneingang

Die 7 Wasserproben wurden dem UBA/Dienstgebäude Bad Elster durch die Spedition/MEDLOG am 15.02.2013 zugestellt. Der Transport erfolgte in 1 L DURAN-Probenahmeflaschen, die die Codierung A bis G trugen. Diese Codierung wurde in das Laborjournal übernommen und über die Testreihen bis hin zur Ergebnisbewertung beibehalten. Die biologische Testung begann unmittelbar nach Probeneingang.

3. Biologisches Messprogramm

3.1. Probenvorbereitung

Die Proben lagerten bis zur biologischen Testung bei 4 °C im Kühlschrank. Unmittelbar nach Probeneingang wurden der pH-Wert und die Osmolalität der Proben bestimmt. Die Messdaten sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 1). Eine Einstellung des pH-Wertes und der Osmolalität für die biologische Testung war nicht erforderlich. Da die biologischen Testverfahren sterile Proben erfordern, erfolgte eine Sterilfiltration mittels Sterilfilter (Sartorius AG Göttingen; 0,20 µm).

Tab. 1: pH-Wert und Osmolalität der Wasserproben

Probencode	pH-Wert	Osmolalität/kg*
A	7,52	0,019
B	7,38	0,018
C	7,74	0,007
D	7,88	0,004
E	7,76	0,007
F	7,82	0,007
G	7,84	0,014

* Calibrationsstandard (100 mOsmol/kg=0,100 Osmol/kg)
Genotec Ref. 30.9.0100 (7344C41)

3.2 Biologisches Messprogramm

3.2.1 Methodisches Konzept/Ansatz

Der Parameter Gentoxizität gilt auf Grund seiner humanrelevanten biologischen Konsequenzen (Krebs, Erbkrankheiten, Veränderung des Epigenoms als Vermittler zwischen Umwelt und Genom) als prioritärer Bewertungsparameter im Trinkwasser und im erweiterten Sinne auch für den gesamten Wasserkreislauf. Die Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission beim Umweltbundesamt „Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht“ nimmt darauf Bezug^[1]. Auf diesem regulativ festgeschriebenen Konzept basiert die eingesetzte Teststrategie.

In der klassischen Gentoxizitätsprüfung sind international weitgehend standardisierte und harmonisierte Teststrategien festgeschrieben (www.oecd.org)^[2]. Sie sind im Prinzip hierarchisch strukturiert, weil man davon ausgeht, dass ein Testsystem allein nicht ausreicht, das mögliche gentoxische Potenzial einer Substanz/Wasserprobe ausreichend sicher voraussagen zu können. Die erste Stufe der In-vitro-Gentoxizitätsprüfung ermöglicht erste Aussagen über den Wirkmechanismus einer Substanz/Wasserprobe im Sinne einer Ja-/Nein-Antwort (gentoxisch oder nicht gentoxisch). Zum Nachweis von Genmutationen kommt im aktuellen Messprogramm der Ames-Test und zur Identifizierung von Chromosomenbrüchen der Mikrokerntest zum Einsatz.

Nach der Auswertung umfangreicher Daten aus der In-vivo- (Nagetier-Kanzerogene) und In-vitro-Gentoxizitätstestung durch Kirkland et al. (2011)^[3] wird deutlich, dass keines der gentoxischen Kanzerogene durch die Prüfung in der In-vitro-Testbatterie, bestehend aus Ames-Test und Mikrokerntest, unentdeckt geblieben wäre. Im Umkehrschluss heißt das, dass die In-vitro-Testbatterie, Ames- plus Mikrokerntest, ausreichend ist, um in-vivo gentoxische Kanzerogene zu identifizieren.

Der Nachweis von Zytotoxizität als unspezifische Wirkung wird der Gentoxizitätsprüfung (Regulation ohne Wirkschwelle) als spezifische Wirkung vorgeschaltet. Zum einen kann Zytotoxizität über die Zeit zur sekundären Gentoxizität (Regulation mit Wirkschwelle) führen und zum anderen direkt auch andere Wirkmechanismen (z. B. oxidative Schäden der DNA) induzieren. Die im aktuellen Untersuchungsprogramm eingesetzten Testverfahren sind nachfolgend beschrieben:

3.2.2 Testverfahren zum Nachweis der Zytotoxizität

3.2.2.1 Nachweis von Zellmorphologie, Wachstumshemmung und Zelltod durch die kontinuierliche Registrierung des elektrischen Widerstands der Zellen

Dieses Testverfahren registriert Veränderungen der Zellen während der Belastung mit den Testproben mittels eines als „Real Time Cell Analyzer, x-Celligence System“ (RTCA), der Firma Roche, Mannheim, bezeichneten Gerätes. Das Gerät liefert durch die kontinuierliche Registrierung des elektrischen Widerstandes von in 96-well Platten kultivierten Zellen (36 °C, 5 % CO₂) Aussagen zu Veränderungen der Morphologie und dem Wachstums der Zellen sowie zum Zelltod. Für den Test werden Zellen der aus einem menschlichen hepatozellulären Karzinom etablierten Zelllinie HepG2 eingesetzt. Die Zelllinie wurde vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, erworben. Zur Testdurchführung wird eine Zellsuspension mit $2,5 \times 10^5$

Zellen/ml hergestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt mit RPMI Zellkulturmedium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum. Zur Bewertung erfolgt die Berechnung eines Quotienten aus den für belastete Zellen registrierten Werte des elektrischen Widerstands, dividiert durch die Werte für die mit dem entsprechenden Lösungsmittel belasteten Zellen, nach 24 Stunden Belastungsdauer. Bei einem Quotienten von 1 bis 0,7 werden die Zellen als unverändert gewertet, ist der Quotient $< 0,7$ zeigt die Testprobe eine Wirkung.

3.2.2.1 Nachweis von Nekrose und Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Nekrose und eine verstärkte ROS-Bildung werden durch die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen. Die Untersuchungen erfolgen an Jurkat Zellen (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), einer aus menschlichen Lymphomzellen etablierten Zelllinie. Zur Testdurchführung wird eine Zellsuspension mit 10^6 Jurkat Zellen/ml in RPMI Zellkulturmedium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum vorbereitet. Diese Zellsuspension wird mit 1 ml per Kavität in 24-well Multiwellplatten eingesät. Die Zellen werden 24 Stunden mit den Testproben belastet.

Nachweis von Nekrose mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI)

Der Nekrosenachweis unter Anwendung von PI basiert darauf, dass dieser Fluoreszenzfarbstoff die intakte Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen kann und damit bei vitalen Zellen nicht in das Zellinnere gelangt. Nekrotisch wirkende Stoffe verursachen eine Zerstörung der Zellmembran und in diese Zellen kann PI eindringen. Im Zellinnern interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff mit der DNA und führt damit zur rotfluoreszierenden Markierung der Zellkerne nekrotischer Zellen.

PI wird in einer Endkonzentration von $8 \mu\text{g PI/ml}$ dem RPMI Zellkulturmedium (ohne Phenolrotzusatz) zugegeben und nach 15 Minuten Reaktionsdauer erfolgt eine flowzytometrische Messung.

Nachweis von ROS durch das Nachweisreagenz Dihydroethidium (DHE)

Die Exposition gegenüber Umweltschadstoffen kann eine intrazelluläre Störung des Gleichgewichts von Oxidantien und Antioxidantien bewirken, die erhöhte intrazelluläre Konzentrationen an freien Radikalen zur Folge hat. Sauerstoffradikale sind hochreaktive Radikale, die unter der Bezeichnung ROS zusammengefasst werden. Deren intrazelluläre Wirkungen sind konzentrationsabhängig. Während sie in niedrigen Konzentrationen regulierend auf intrazelluläre Abläufe wirken, kommt es bei hohen Konzentrationen zu zytotoxischen Effekten. Durch Reaktionen mit intrazellulären Makromolekülen werden Zellschädigungen verursacht, die zum Zelltod führen können. Zum Nachweis intrazellulärer ROS wird das zellpermeable, chemisch reduzierte Ethidiumderivat Dihydroethidium eingesetzt. Das in unveränderter Form in die Zellen eindringende Reagenz wird intrazellulär durch ROS oxidiert und interkaliert in dieser Form mit der DNA. Dadurch wird der Zellkern durch eine breite rote Fluoreszenz markiert. Zum ROS-Nachweis wird zu den in RPMI ohne Phenolrot suspendierten Zellen Dihydroethidium in einer Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ gegeben. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt mittels Flowzytometer.

Der Fluoreszenznachweis mit dem Flowzytometer

Die Fluoreszenzuntersuchung der Zellen erfolgt mit dem Flowzytometer FACS Calibur, BD Biosciences, Heidelberg. Durch die Software „Cell Quest“ des Gerätes werden die

prozentualen Anteile rotfluoreszierender und nicht fluoreszierender Zellen ermittelt, wobei 10.000 Ereignisse (Zellen) untersucht werden. Für die Auswertung der Messwerte wird eine Quadranten-Statistik verwendet. Zur Bewertung der Ergebnisse werden von den Prozentwerten, die für die Zellen nach der Belastung mit den Testproben ermittelt wurden, die Prozentwerte für das entsprechende Lösungsmittel subtrahiert. Wenn die Differenz > 10 % ist, wird die Testprobe als nekrotisch wirksam bzw. als ROS induzierend bewertet. Die Testproben werden mit jedem Testverfahren in mindestens drei Testansätzen untersucht und die Mittelwerte werden zur Bewertung genutzt. Ein Testansatz beinhaltet neben den mit den Testproben belasteten Zellen auch Zellen, die mit dem entsprechenden Lösungsmittel oder mit als Positivkontrollen eingesetzten Substanzen belastet werden.

3.2.3 Testverfahren zum Nachweis der Gentoxizität

3.2.3.1 Salmonella/Mikrosomen-Test (Ames-Test)

Der Ames-Test folgt in seinem Ablauf und seiner Bewertung der DIN 38415-4. Seit seiner Einführung in den siebziger Jahren hat sich der Salmonella/Mikrosomen-Test (Ames-Test) zu dem Basistest in der Gentoxizitätsprüfung entwickelt. Der Ames-Test ist ein weltweit akzeptierter Screeningtest zum Nachweis von sogenannten Punktmutationen, d.h. von Veränderung bzw. Verlust einer Nukleinbase im DNA-Abschnitt. Er arbeitet mit Histidin-abhängigen Stämmen von *Salmonella typhimurium* (his-auxotroph), die auf Grund verschiedener Defekte im Histidin-Operon (hisG46, hisC3070 oder hisD3052) kein Histidin synthetisieren und daher nur auf Histidin-haltigem Medium wachsen können. Bei Einwirkung eines gentoxischen Agens revertieren die Mutanten durch Basensubstitutions- oder Leserastermutationen zum Wildtyp (his+-prototroph), d.h. die Zellen erlangen die Fähigkeit zur Histidin-Biosynthese zurück. Daher kann die rückmutierte Bakterienzelle wieder auf Histidin-freiem Nährboden Kolonien (Revertanten) ausbilden. Als Testorganismen wurden entsprechend der DIN 38415-4 die Bakterienstämme *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 eingesetzt.

Zahlreiche gentoxische Substanzen werden erst nach metabolischer Aktivierung wirksam. Da der Bakterienzelle die notwendigen Biotransformationssysteme des Sauerstoffwechsels fehlen, wird zum Test eine Lebermikrosomenfraktion (S9-Mix) hinzugegeben und dadurch die Testsubstanz in vitro der Metabolisierung durch den Sauerstoffwechsel unterzogen. Auf diese Weise können die entstehenden Metaboliten (auch sehr kurzlebige) unmittelbar auf die Testzelle einwirken.

Die Zahl dieser Revertanten ist ein Maß für die Stärke des Mutagens. Als mutagen wird eine Substanz/Probe betrachtet, wenn bei mindestens einem der beiden verwendeten Stämme mit oder ohne Zugabe von S9-Mix eine Erhöhung der Mutantenzahlen um mindestens die für den Stamm festgelegte Induktionsdifferenz induziert wird und eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung gegeben ist. Die Mindestanforderung für die Induktionsdifferenz für TA 100 beträgt 80 Mutanten, für TA 98 20 Mutanten.

3.2.3.2 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest ist ein zytogenetischer Test zur Erkennung von DNA-Schäden auf chromosomaler Ebene in sich teilender Zellen. Mit ihm können Zellen identifiziert werden, die

auf Grund von Chromosomenbrüchen und –verlusten nicht mehr in der Lage sind, das Erbmaterial zu gleichen Teilen auf die beiden Tochterkerne zu verteilen. Die Chromosomenfragmente, die bei der Zellteilung nicht in einen der beiden Tochterzellkerne integriert werden, kondensieren zu einem oder mehreren sogenannten Mikrokernen. Die Anzahl der Mikrokerne kann als ein Maß für den schädlichen Einfluss einer Chemikalie auf die Zelle angesehen werden.

Das Testprotokoll folgt der DIN EN ISO 21427-2. Zur Durchführung des Mikrokerntests fand die Zelllinie HepG2 Anwendung. Diese Zelllinie wurde in RPMI-Medium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Die Vitalität der eingesetzten Zellen, bestimmt mit dem Trypanblau-Vitalitätstest, betrug in den Versuchsansätzen stets 90 - 100 %.

Der Testansatz erfolgte in Quadri-PERM[®]-Schalen, die in 4 separate Kammern aufgeteilt sind. Die Kultivierung der Zellen fand auf den in die Kammern eingelegten Objektträgern statt. Pro Testkonzentration wurden 2 Kulturen angelegt. Das Testvolumen betrug 0,1 ml pro Testansatz. An das Befüllen der Kammern mit der im Kulturmedium eingestellten Zellsuspension (90.000 Zellen pro 5 ml) schloss sich eine 4-stündige Inkubation an, um das Anhaften der Zellen zu gewährleisten.

Danach wurde das Medium durch frisches Kulturmedium bei gleichzeitiger Zugabe der Wasserprobe ersetzt. Die Expositionszeit gegenüber der Probe lag bei 24 Stunden. Die anschließende Präparation erfolgte in den Schritten Hypotonie (1,5 %ige Tri-Natrium-Citrat-Lösung für 5 Minuten), 2 x 10-minütige Fixierung (3:1 Gemisch Methanol:Eisessig), Luft-trocknung und anschließende Giemsa-Färbung.

Die mikroskopische Auswertung wurde mit dem automatischen Bildauswertesystem Metafer 4 von MetaSystems GmbH, Altlußheim vorgenommen und 1.000 Zellen pro Testkonzentration ausgewertet. Für die Bewertung der Mikrokerne galten folgende Kriterien: Die Größe des Mikrokerns durfte 30 % der Größe des normalen Zellkerns nicht überschreiten, der Mikrokern und der Zellkern zeigten bezüglich der Färbung das gleiche Erscheinungsbild und die Mikrokerne mussten deutlich vom Hauptkern separiert sein. Nur Zellen mit guter zytoplasmatischer Kontur wurden für die Auswertung herangezogen.

3.2.4 Konzentrationsverfahren zur Absicherung von Negativbefunden

Der häufig geführten Diskussion, dass Biotestverfahren für Umweltproben nicht ausreichend sensitiv sind, wird durch die 1000-fache Aufkonzentrierung der Proben begegnet. Ziel der Aufkonzentrierung ist die Absicherung von Negativbefunden. Die Aufkonzentrierung umfasst folgende Schritte:

- Probendurchlauf über konditionierte XAD-7 Säule
- Säule trocknen über Nacht
- Elution mit 300 ml Ethylacetat
- Eluat einengen bis zur Trockne
- Aufnahme der Trockne in DMSO entsprechend des Konzentrationsfaktors (hier: 1,1 ml DMSO)

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und der Ergebnislage wird eine summarische Bewertung vorgenommen.

Tab. 2 : Summarische Bewertung – Wasserproben aus Wien (AGES)

Proben-code	Zytotoxizität				Gentoxizität		
	Nekrose PI	ROS-Bildung (DHE)	RTCA-Zellproliferation HepG2		Ames-Test		Mikrokern-test
	JURKAT	JURKAT	Rohwasser	Konzentrate	Rohwasser	Konzentrate	
A	–	–	–	–	–	–	–
B	–	–	–	–	–	–	–
C	–	–	–	–	–	–	–
D	–	–	–	–	–	–	–
E	–	–	–	–	–	–	–
F	–	–	–	–	–	–	–
G	–	–	–	–	–	–	–

Danach sind mit keinem der Testverfahren im Rohwasser und in den entsprechenden Konzentraten Zytotoxizität und Gentoxizität nachzuweisen. Demnach geht von keiner der Proben gentoxisches Gefährdungspotenzial aus.

-
- [1] Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz **2003**, *46*, 249–251.
- [2] OECD-Guideline for Testing of Chemicals. **1984**, No. 475-478.
- [3] Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., Vanparys, P. (2011): A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. Mutation Research **721**(1), 27-73.