Umwelt Bundes Amt
für Mensch und Umwelt

UNTERSUCHUNGSBERICHT

ZUM THEMA

„GENTOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG VON POLAREN VERBINDUNGEN“

Bearbeitung: Dr. Tamara Grummt
H.-G. Wunderlich

Mai 2005

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Aufgabenstellung	2
2.	Ausgangssituation	2
3.	Testsubstanzen	2
4.	Gentoxizitätsprüfung	3
4.1	Methodisches Konzept	3
4.2	Testkonzentrationen	4
4.3	Biologische Testverfahren	5
4.3.1	Ames-Test – Salmonella/Mikrosomen-Test	5
4.3.1.1	Bakterienstämme	5
4.3.1.2	Stoffwechselsystem (S9-Fraktion)	6
4.3.1.3	Prüfprotokoll	6
4.3.1.4	Bewertung	7
4.3.2	Nachweis von Zytotoxizität – Bestimmung der plating efficiency	7
4.3.3	Nachweis der Apoptose	9
4.3.4	Zytogenetik – Bestimmung der Chromosomenaberrationsrate (CA)	10
4.3.4.1	Zelllinie	10
4.3.4.2	Medium- und Wachstumsbedingungen	10
4.3.4.3	Zytogenetische Untersuchungen	10
4.3.4.4	Mikroskopische Auswertung	11
4.3.4.5	Bewertung	11
5.	Ergebnisse und wissenschaftliche Bewertung der Datenlage	12
6.	Anhang - Einzeldaten	1 - 62
	Klassischer Ames-Test TA 98, TA 100	1 - 40
	Ames-Test TA 98NR, TA 100NR	41 - 50
	Chromosomenaberrationsrate	51 - 57
	plating efficiency	58 - 62

1. Aufgabenstellung

Das Fachgebiet II 3.6 „Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers“ im Umweltbundesamt erhielt von der Länderarbeitsgemeinschaft LABO, vertreten durch das geschäftsführende Land Mecklenburg-Vorpommern, im Rahmen des Länderfinanzierungsprogramms „Wasser und Boden“ 2002 den Auftrag, das Forschungsvorhaben „Gentoxikologische Bewertung von polaren Verbindungen“ zu bearbeiten.
Die Zielsetzung des Vorhabens bestand darin, das gentoxische Potenzial von ausgewählten Einzelsubstanzen aus der Gruppe der polaren Nitroaromaten zu charakterisieren. Die wissenschaftliche Bewertung von prioritären Wirkmechanismen bildet u. a. die Grundlage für die Ableitung von gesundheitlichen Orientierungs- bzw. Leitwerten im Trinkwasser.

2. Ausgangssituation

Mit der Weiterentwicklung der Einzelstoffanalytik für sprengstofftypische Verbindungen wurden an Standorten ehemaliger TNT-Produktionsstätten in Boden- und Grundwasserproben polare Nitroaromaten nachgewiesen.
Hinsichtlich des Grundwasserschutzes im Einzugsgebiet und die damit verbundene Sicherung der Trinkwasserversorgung sind diese Verbindungen auf Grund ihrer guten Wasserlöslichkeit und hohen Mobilität von besonderer Relevanz.
Die Kontrolle und Überwachung der qualitativen und quantitativen Schadstoffmuster sind zwingend notwendig für einen nachhaltigen Grundwasserschutz. Die Ausgestaltung der Messprogramme (u. a. Häufigkeit der Analysen, Nachweisgrenzen, Substanzspektrum) und die Fortschreibung des bestehenden regulatorischen Rahmens richten sich nach dem Gefährdungspotenzial der Schadstoffe.
Für die viele Einzelsubstanzen umfassende Stoffgruppe der Nitroaromaten werden bei Vorhandensein der Nitrogruppe als aktives Strukturprinzip **gentoxische Wirkmechanismen** als **prioritär** angesehen. Die nicht verfügbaren experimentellen Daten zur Gentoxizität von polaren Nitroaromaten machten eine Gefährdungsabschätzung nicht möglich.
Um diese definieren zu können, sind Kenntnisse zum Wirkmechanismus der Substanzen von elementarer Bedeutung. In diesem Kontext wurde im Projekt eine Erstbewertung für prioritäre Einzelsubstanzen aus der Gruppe der polaren Nitroaromaten hinsichtlich ihres gentoxischen Potenzials durch den Einsatz von In-vitro-Kurzzeittests vorgenommen.

3. Testsubstanzen

Die Auswahl der Testsubstanzen erfolgte aus einer auf Orientierungsmessungen basierenden Substanzliste der Länderarbeitsgruppe „Polare Verbindungen“. Die ausgewählten **20** Verbindungen sind in die Substanzgruppen Amino-/Nitro-Benzoesäuren, Amino-/Nitro-Toluolsulfonsäuren und Nitrophenole einzuordnen. Tabelle 1 listet die Einzelsubstanzen auf.

Tab. 1: Substanzspektrum

Substanz	Hersteller	Reinheit (%)	CAS-Nr.	Molekular-gewicht
Benzoesäuren				
2-Aminobenzoesäure	Fluka	≥ 99,0	118-92-3	137,1
3-Aminobenzoesäure	Fluka	≥ 97,0	99-05-8	137,1
4-Aminobenzoesäure	Fluka	≥ 99,0	150-13-0	137,1
2-Nitrobenzoesäure	Fluka	≥ 97,0	552-16-9	167,1
3-Nitrobenzoesäure	Fluka	≥ 98,0	121-92-6	167,1
4-Nitrobenzoesäure	Fluka	≥ 98,0	62-23-7	167,1
3,4-Diaminobenzoesäure	Fluka	95,0	619-05-6	152,2
3,5-Diaminobenzoesäure	Fluka	95,0	535-87-5	152,2
3,4-Dinitrobenzoesäure	Riedel-deHaën	99,2	528-45-0	212,1
2-Amino-4-nitrobenzoesäure	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI)	n.a.	619-17-0	182,1
2-Amino-5-nitrobenzoesäure	Fluka	95,0	616-79-5	182,1
5-Amino-2-nitrobenzoesäure	Fluka	≥ 97,0	13280-60-9	182,1
Toluolsulfonsäuren				
4-Aminotoluol-3-sulfonsäure	TCI	> 95,0	88-44-8	187,2
4-Nitrotoluol-2-sulfonsäure	TCI	> 90,0	121-03-9	217,2
Nitrophenole				
2-Methyl-3-nitrophenol	Fluka	≥ 97,0	5460-31-1	153,1
3-Methyl-2-nitrophenol	Fluka	≥ 98,0	4920-77-8	153,1
3-Methyl-4-nitrophenol	Fluka	≥ 95,0	2581-34-2	153,1
4-Methyl-2-nitrophenol	TCI	> 99,0	119-33-5	153,1
5-Methyl-2-nitrophenol	Fluka	≥ 95,0	700-38-9	153,1
4-Methyl-2,6-dinitrophenol	Fluka	≥ 98,0	609-93-8	198,1

n.a. nicht angegeben

4. Gentoxizitätsprüfung

4.1 Methodisches Konzept

Für die Gentoxizitätsprüfung sind international weitgehend standardisierte bzw. harmonisierte Teststrategien festgeschrieben (www.oecd.org). Für die Erstbewertung der Gentoxizität in der 1. Phase (Basistestung) wird davon ausgegangen, dass 2 bis 3 In-vitro-Verfahren verschiedener biologischer Endpunkte (Gen- und Chromosomenmutationen) für eine befriedigende Antwort auf die Frage nach der Möglichkeit gentoxischer Wirkungen der

getesteten Substanz ausreichen. Abbildung 1 zeigt die Teststrategie der 1. Phase der Gentoxizitätsprüfung.

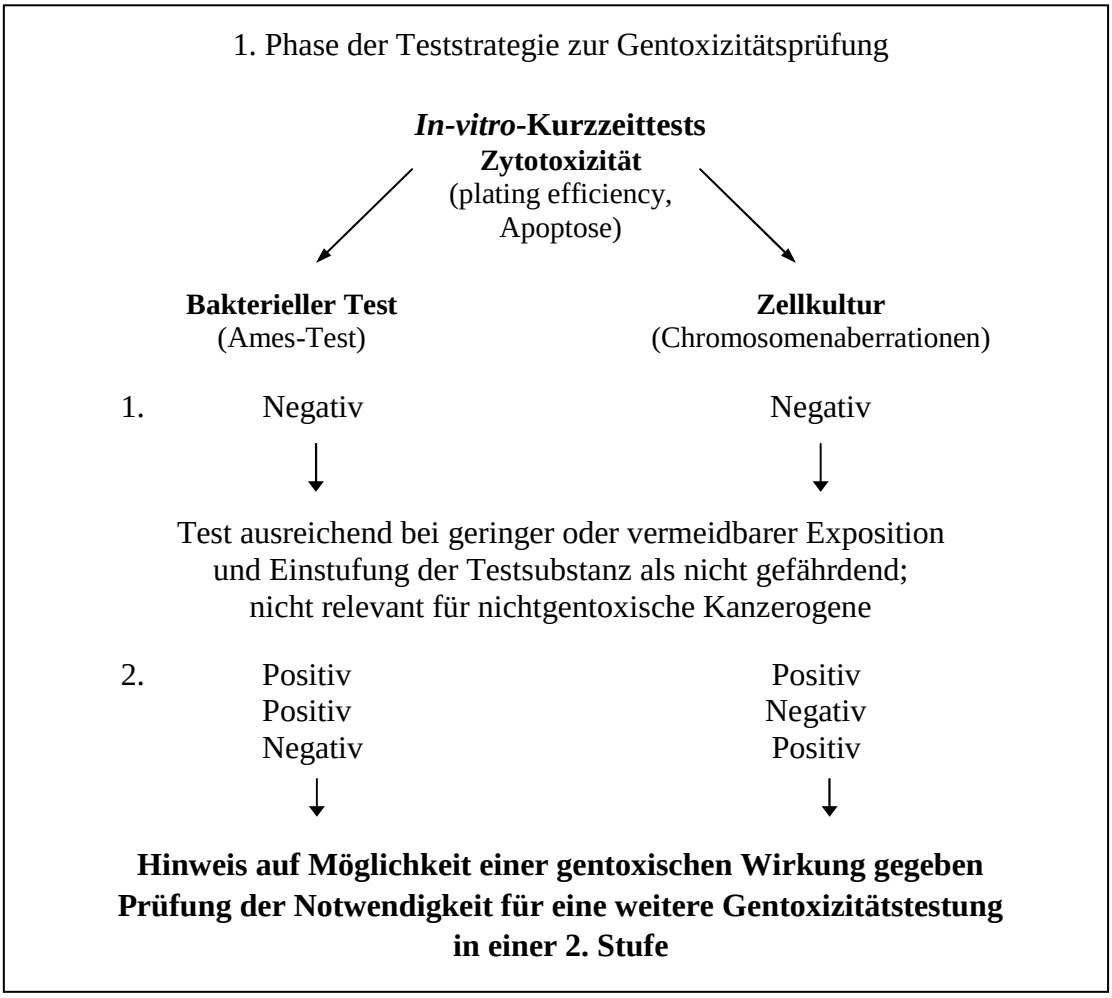


Abb. 1: Teststrategie in der Gentoxizitätsprüfung

Für die Testung der polaren Nitroaromaten wurde die festgeschriebene Prüfstrategie modifiziert. Bei positiven Befunden im klassischen Ames-Test erfolgte die Substanzprüfung mit den Nitroreduktase-defizienten Stämmen TA 98NR und TA 100NR zur Abklärung einer adäquaten oxidativen Metabolisierung im menschlichen Organismus bei gleichzeitiger geringer Nitroreduktaseaktivität.

4.2 Testkonzentrationen

Die Testkonzentrationen für die gentoxische Bewertung der polaren Verbindungen wurden in Anlehnung an die harmonisierten Testprotokolle festgelegt. Für jede zu bewertende Substanz wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, die aus 9 abgestuften Konzentrationen bestand. Die höchste Konzentration betrug jeweils 50 mg/ml; die weiteren Konzentrationen waren 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 und 0,1 mg/ml. Für die Durchführung der einzelnen Prüfverfahren wurden Volumina von 10 µl bzw. 100 µl der jeweiligen Konzentrationen eingesetzt, die sich daraus ergebenden testspezifischen Konzentrationen sind in den Ergebnistabellen aufgelistet.

Lösungsmittel für alle Substanzen war Dimethylsulfoxid (DMSO). Dieses Lösungsmittel ist mit Wasser mischbar und gleichermaßen für die Durchführung der eingesetzten Biotests geeignet, wenn sein Anteil am Gesamttestvolumen 3 – 4 % nicht überschreitet.

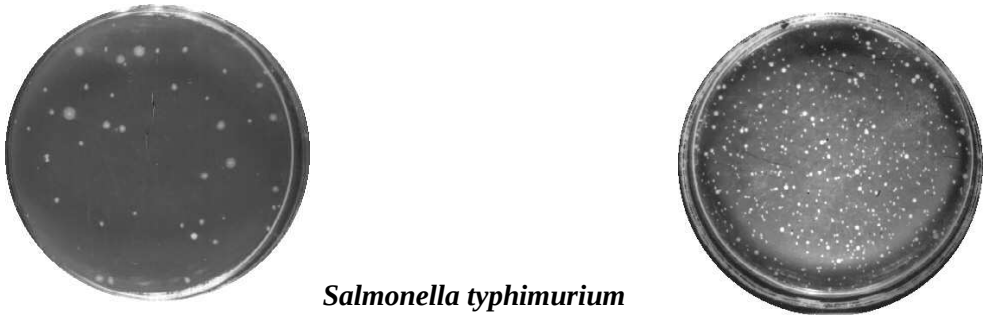
4.3 Biologische Testverfahren

4.3.1 Ames-Test / Salmonella/Mikrosomen-Test

Der Salmonella/Mikrosomen-Test wurde unter Berücksichtigung der aktualisierten Aspekte nach Mortelmans und Zeiger (2000)[1] auf Grundlage des Standardprotokolls von Maron und Ames (1983)[2] durchgeführt.

4.3.1.1 Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden die Histidin-defizienten Mutantenstämme Salmonella typhimurium TA 98, TA 98NR, TA 100 und TA 100NR eingesetzt.
Diese Stämme sind, im Gegensatz zum Wildtyp, auf Grund einer genetischen Veränderung Histidin-auxotroph, d. h. sie sind nicht mehr in der Lage, Histidin zu synthetisieren und daher von der Zugabe des Histidins ins Nährmedium abhängig. Unter dem Einfluss einer gentoxischen Substanz mutieren die Zellen dieser histidinauxotrophen Bakterienstämme zur Histidinprototrophie zurück. Die Revertanten sind dann wieder fähig, Histidin zu synthetisieren und sich auf Histidin-freiem Nährmedium zu vermehren. Aus einer rückmutierten Bakterienzelle (Revertante) entsteht dabei eine makroskopisch sichtbare Kolonie (Abb. 2). Mit den Teststämmen Salmonella typhimurium TA 98 und TA 98NR lassen sich Frameshift-Mutationen (his D 3052), und mit Salmonella typhimurium TA 100 und TA 100NR Basenpaarsubstitutionen (his G 46) nachweisen.
Die Teststämme TA 98NR und TA 100NR sind zusätzlich durch die Enzymdefizienz an Nitroreduktase charakterisiert. Diese Nitroreduktase-defizienten Teststämme werden eingesetzt, um die bakterienspezifische Metabolisierung nitroaromatischer Verbindungen zu erfassen. Dadurch lassen sich die an der Aktivierung beteiligten Enzyme identifizieren, was eine toxikologische Bewertung im Vergleich zur humanen Metabolisierung erleichtert.



Salmonella typhimurium
TA 98

Negativkontrolle:
Aqua dest.
Spontane Revertanten

Positivkontrolle:
0,1 mg DNOC/Platte
Gentoxischer Effekt

Abb. 2: Negativ- und Positivkontrolle im Teststamm *Salmonella typhimurium* TA 98

[1] Mortelmans K, Zeiger E (2000): The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutation Research 455, 29-60.
[2] Maron D, Ames BN (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113, 173-215.

Die Teststämme wurden von der Firma Trinova Biochem GmbH, Giessen, bezogen. Die Stammhaltung und die Überprüfung des Genotyps erfolgten nach Maron und Ames (1983)[2]. Die für den Test notwendige Bakterienkultur (aus der logarithmischen Wachstumsphase) wurde nach Abimpfen aus der Stammkultur in Nährbouillon über 24 Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad angezogen und der Keimgehalt der Wachstumskultur am Versuchstag auf Vollmedium-Platten bestimmt. Die Bakteriendichte sollte im Test ≥ 10^8 pro Platte betragen.

4.3.1.2 Stoffwechselsystem (S9-Fraktion)

Fremdstoff-metabolisierende Enzyme, wie sie von Säugerzellen bekannt sind, kommen in Bakterien nicht vor. Daher werden der Bakterienkultur zur Simulation des Säugerstoffwechsels metabolisierende Enzyme zugesetzt. Die exogene Quelle metabolisierender Enzyme ist der 9000g-Überstand des Homogenats von Leberzellen, meist aus Ratte oder Maus. Darüber hinaus ist ein NADPH-regenerierendes System bestehend aus NADP und Glucose-6-Phosphat erforderlich.
Das metabolisierende Enzymsystem (der sogenannte S9-Mix) wurde aus einem kommerziell erworbenen Rattenleberpräparat und der Kofaktorenlösung (Trinova Biochem GmbH) gemischt.
Die fertige Metabolisierungslösung (S9-Mix) hatte folgende Zusammensetzung:

Inhaltsstoff	**Endkonzentration**
NADP-Na_2	4 mM
Glucose-6-phosphat-Na_2	5 mM
Mg-Aspartat	8 mM
KCl	33 mM
Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M
S9-Fraktion	10 % (v/v)

4.3.1.3 Prüfprotokoll

Konnte keine Zytotoxizität nachgewiesen werden (Zytotoxizität ist sichtbar durch starkes Hintergrundwachstum und/oder an der Abnahme der spontanen Revertantenzahl im Vergleich zur Negativkontrolle) und bei entsprechender Löslichkeit der Testsubstanz im Agar wurden die Substanzen in den Konzentrationen von bis zu 5 mg pro Platte getestet.
Den Ablauf des Salmonella/Mikrosomen-Tests stellt Abb. 3 dar: Pro Testkonzentration wurden zwei Wiederholungen an verschiedenen Tagen mit je zwei Parallelproben angesetzt. In der Prüfung betrugen die Testvolumina 0,1 ml pro Platte. Als Negativkontrolle diente DMSO (0,1 ml/Platte). In jedem Versuchsansatz wurden neben der Negativkontrolle teststammspezifische Positivkontrollen mitgeführt. Testsubstanz oder Kontrollsubstanz, Bakterienkultur (0,1 ml) und S9-Mix oder Puffer (0,5 ml) wurden nach Zugabe des Oberschichtagars auf VOGEL-BONNER-Medium ausplattiert und 48 bis 72 Stunden bei 37 ^oC bebrütet. Die Auszählung der Kolonien erfolgte per Hand.

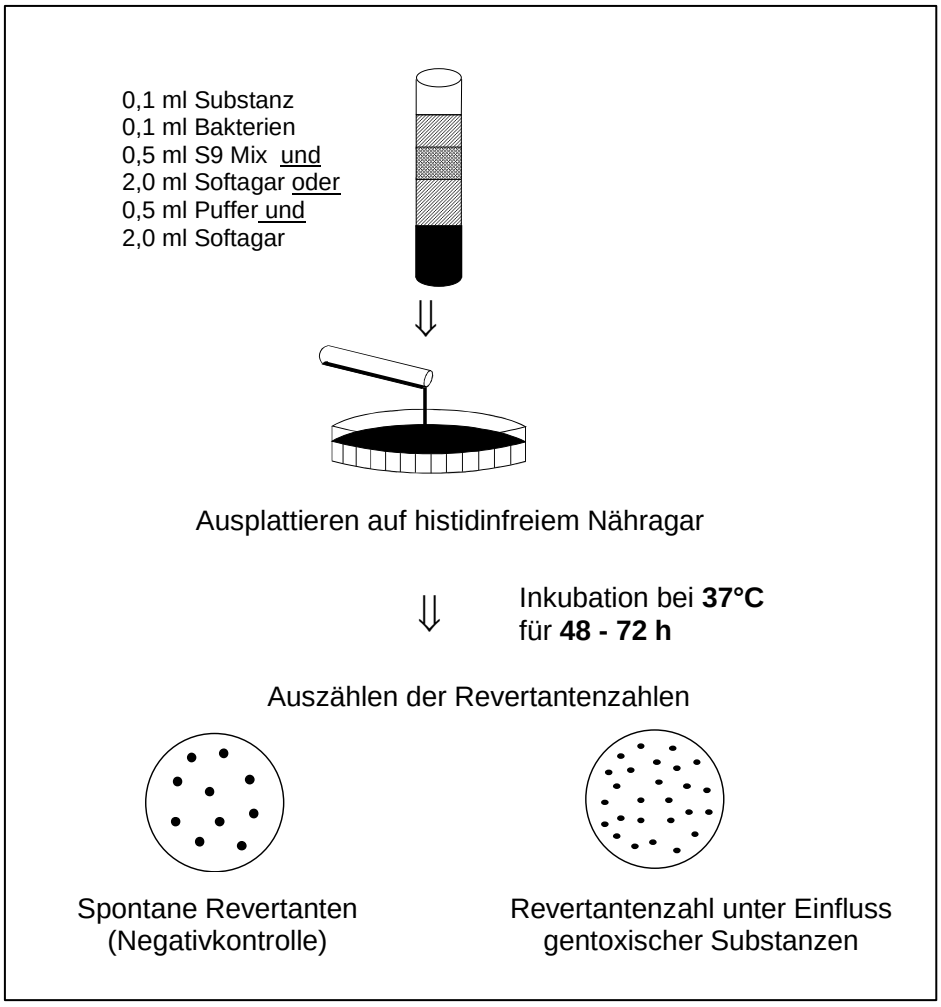


Abb. 3: Schematischer Ablauf des Salmonella/Mikrosomen-Tests

4.3.1.4 Bewertung

Für jede Prüfkonzentration wurden aus 2 Wiederholungen mit je 2 Parallelansätzen der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Eine Substanz wird als gentoxisch bewertet, wenn eine reproduzierbare Verdopplung der spontanen Revertantenzahl (Negativ-/Lösungsmittelkontrolle) auftritt und/oder eine Konzentrations-Wirkung-Beziehung (einschließlich im Negativbereich) induziert wird.

4.3.2 Nachweis von Zytotoxizität – Bestimmung der plating efficiency

Der Parameter Zytotoxizität charakterisiert die biologische Toleranz bei Schadstoffbelastung in Bezug auf Schädigungen der physiologischen Zellvorgänge bis hin zur Abtötung von Zellen. Er erlaubt Rückschlüsse auf die Anpassung eines biologischen Systems gegenüber Schadstoffbelastungen in Abhängigkeit von Dauer und Intensität der Exposition (Langzeitexposition).
Zur Bestimmung der plating efficiency (Abb. 4) wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase einer Stammkultur (vgl. 4.3.4.1) von der Oberfläche der Kulturgefäße abtrypsiniert, gewaschen, in einem definierten Volumen aufgenommen und mit Trypanblau die Vitalität der Zellen bestimmt. Im Testansatz sollte die Vitalität nicht weniger als 80 Pro-

zent betragen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in niedriger Zelldichte in die Kulturgefäße eingesät. Das verhindert bzw. vermindert den Kontakt der Zellen untereinander, so dass die Zellen leichter Kolonien ausbilden können. Nach dem Anhaften der Zellen (ca. 2-3 Stunden) wurden zur Bestimmung der plating efficiency 10 µl der Testsubstanz pro Kultur in 3 Parallelansätzen hinzugegeben. DMSO (10 µl/Kultur) diente als Negativkontrolle. Die Kultur- und Wachstumsbedingungen entsprachen denen der Stammhaltung (vgl. 4.3.4.2); die Inkubationszeiten lagen zwischen 7 und 10 Tagen. Während der gesamten Inkubationszeit blieben die Zellen in Kontakt mit der Testsubstanz. Der genaue Zeitpunkt für die Auswertung wurde durch Beobachten der Zellen im Umkehrmikroskop festgelegt. Bei entsprechender Größe und Morphologie der Kolonien wurde dann das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen, die Zellkolonien mit einem Methanol-Eisessig-Gemisch (3:1) fixiert und danach mit Puffersaline gespült. Vor der manuellen Auszählung der Kolonien wurden die Zellen ca. 30 Minuten mit Giemsa-Lösung angefärbt. Ergab die Auszählung eine Reduktion der plating efficiency von ≥ 50 Prozent im Vergleich zur Kontrolle, wurde die Probe als zytotoxisch eingestuft. In der nachfolgenden Abbildung 4 ist das Prinzip dieses Testes dargestellt.

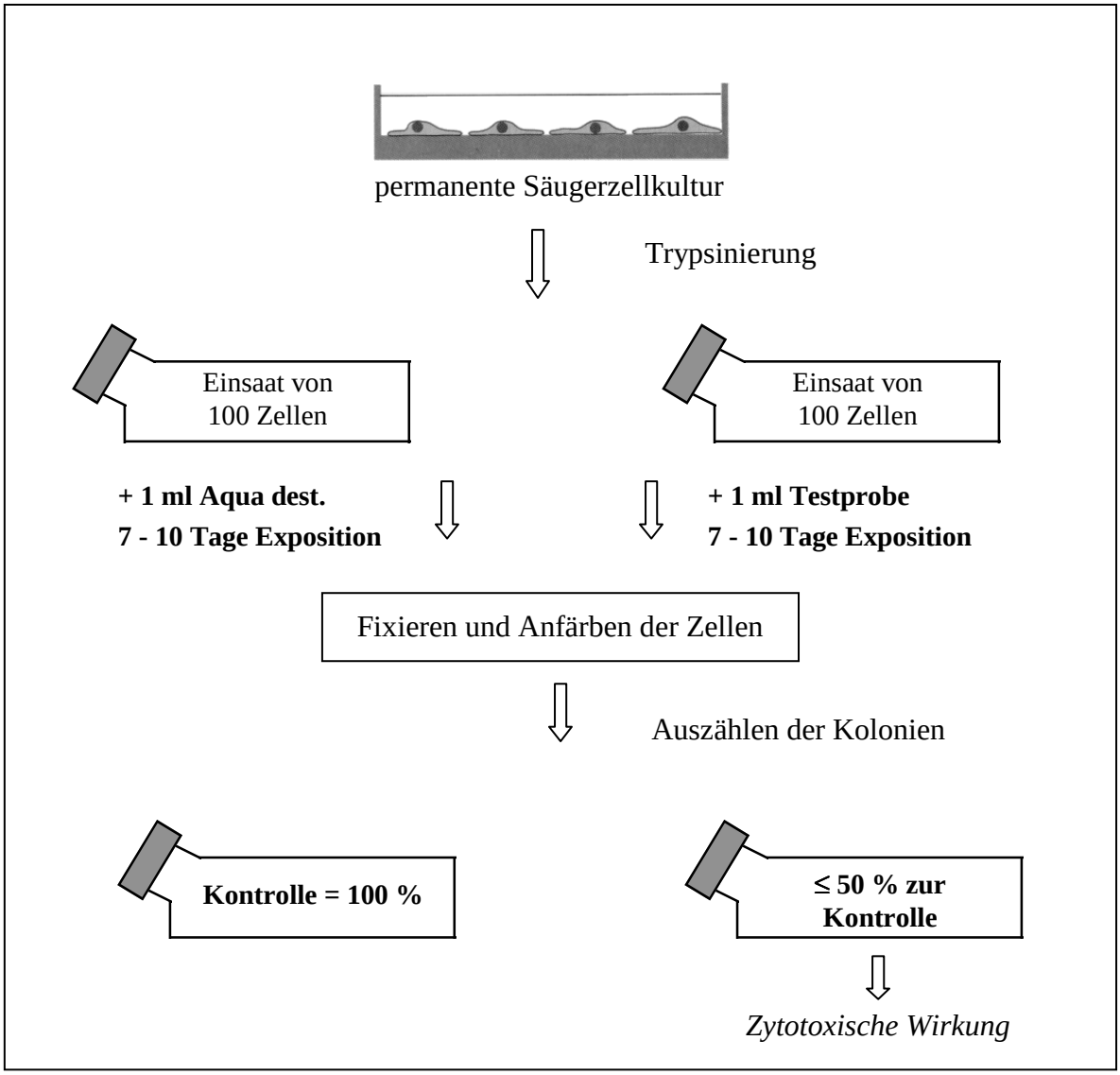


Abb. 4: Schematische Darstellung der Bestimmung der plating efficiency

4.3.3 Nachweis der Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um einen Hauptmechanismus des Zelltodes, und zwar um den physiologischen Zelltod („Selbstmord der Zelle“). Es kommt dabei zu einer Schrumpfung der Zelle, der Zellkern verändert sich und bricht auseinander. Er zerfällt in membranumhüllte Teile (apoptotische Körperchen).
Die Apoptoseuntersuchungen erfolgten an der Zelllinie U-937 (DSMZ Nr. ACC 5), die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig bezogen wurde. Die Zelllinie wurde aus einem menschlichen histiocytischen Lymphom etabliert und besitzt Marker und Eigenschaften von Monozyten. Zur Untersuchung auf apoptotische Wirkungen wurden zwei kommerzielle Testkits (Fa. Roche Diagnostics GmbH) eingesetzt:

- Zelltodbestimmung ELISA (CDD^+ ELISA)

  Dieser Test wird zum Nachweis der für den apoptotischen Zelltod charakteristischen Fragmente der genomischen DNA eingesetzt, die im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod vor einer Desintegration der Zellmembran gebildet werden. Diese Fragmente entstehen durch die systematische enzymatische Spaltung der DNA und werden als Nukleosomen bezeichnet. Nukleosomen sind DNA-Histon-Komplexe, die der angewendete ELISA durch den Einsatz von zwei monoklonalen Antikörpern, gegen DNA und Histone, nachweist. Dabei ist Anti-Histon an Biotin und Anti-DNA an Peroxydase gekoppelt. Durch Einsatz eines Peroxydasesubstrates erfolgt die Bildung eines farbigen Reaktionsproduktes in Abhängigkeit von den nachgewiesenen Nukleosomen. Dieses Reaktionsprodukt kann spektrophotometrisch gemessen werden. Der ELISA ist ein qualitativer Nachweis und es wird ein Index aus den Extinktionen substanzbelasteter und unbelasteter Zellen gebildet. Wenn dieser Index deutlich größer als 1 ist, zeigt er an, dass die Substanz apoptotisch wirksam ist.
  Zum Vergleich wird stets eine Positivkontrolle aus Zellen, die mit einer Substanz mit bekannter apoptotischer Wirkung belastet wurden, mitgeführt.

- Homogener Caspasentest

  Im Verlauf der apoptotischen Prozesse in der Zelle erfolgt die Aktivierung einer Kaskade von Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden. Der Aktivitätsnachweis dieser Caspasen ist ein biochemischer Nachweis der Apoptose. Der eingesetzte Test ist ein fluorimetrisches Verfahren. Es wird das Caspasensubstrat DEVD-R110 eingesetzt. Proportional zur Caspasenaktivität wird durch Umsetzung dieses Substrates das fluoreszierende Rhodamin 110 freigesetzt und kann mittels Fluoreszenzphotometer gemessen werden. Durch Mitführen einer Eichkurve von Rhodamin 110 erfolgt eine quantitative Bestimmung der Caspasenaktivierung .

Der apoptotische Zelltod ist durch den programmatischen Ablauf biochemischer und morphologischer Prozesse charakterisiert. Die Untersuchung chemischer Substanzen auf apoptotische Wirkungen sollte deshalb verschiedene Methoden beinhalten, die den zeitlichen Abläufen während der Apoptose Rechnung tragen.
Eines der initialen biochemischen Ereignisse der Apoptose ist die Aktivierung einer Kaskade spezifischer Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden. Der eingesetzte fluorimetrische Caspasenassay der Firma Roche quantifiziert sensitiv die Caspasen 2, 3 und 7, sowie mit deutlich geringerer Empfindlichkeit die Caspasen 6, 8, 9 und 10.
Ein relativ spätes Ereignis im Apoptoseverlauf, die nucleosomale Fragmentierung der DNA, wird mit dem Cell Death Detection ELISA ^{plus} der Firma Roche erfasst. Methoden, die die Spaltung der DNA in Mono- und Oligonukleosomen nachweisen, sind die allgemein

gebräuchlichsten Apoptosetests. Die Testdurchführung folgte den im Testkit beiliegenden Vorschriften.

4.3.4 Zytogenetik - Bestimmung der Chromosomenaberrationsrate (CA)

4.3.4.1 Zelllinie

Die für die zytogenetische Analyse eingesetzte Zelllinie V79 des Chinesischen Hamsters stammt aus Lungenfibroblasten männlicher Tiere. Die Zelllinie V79 zeichnet sich durch schnelles Wachstum und einen stabilen Karyotyp aus. Die hier verwendete Zelllinie wurde von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig“ bezogen.

4.3.4.2 Medium und Wachstumsbedingungen

Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO_2 in Minimal Essential Medium (MEM) nach EAGLE, das mit 10 % fetalem Kälberserum und Antibiotika supplementiert war, gezüchtet. Um die Zellen während des Versuches in der exponentiellen Wachstumsphase zu haben, wurden Stammkulturen angelegt, die nach Trypsinierung in die Versuchsreihe eingesät wurden. Die Zellzahl betrug bei den Versuchsansätzen für die Bestimmung der Chromosomenaberrationsrate 2 bis 3 x 10^6 Zellen pro Kulturgefäß. Die durchschnittliche Generationszeit der Zellen liegt bei oben beschriebenen Wachstumsbedingungen zwischen 12 und 14 Stunden.
Abbildung 5 zeigt einen Zellkulturausschnitt.

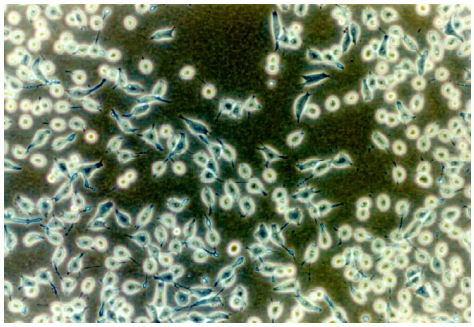


Abb. 5: Ausschnitt aus einer Zellkultur der Zelllinie V79 des Chinesischen Hamsters

4.3.4.3 Zytogenetische Untersuchungen

Die zytogenetische Untersuchung folgte der OECD-Richtlinie (www.oecd.org).
Die Kultivierung der Zellen zur Analyse der Chromosomenaberrationsrate erfolgte wie unter 4.3.4.2 beschrieben. Die in den Standardprotokollen geforderte Expositionszeit von 4 h erwies sich in früheren Untersuchungen mit sprengstofftypischen Verbindungen als nicht ausreichend für die Induktion von chromosomalen Schäden. Daher betrug die Expositionszeit gegenüber der Testsubstanz ausschließlich 24 h. Auf eine Zugabe des metabolischen Systems im Testansatz wurde auf Grund der direkten Aktivierung der Nitroaromaten verzichtet. Pro Testkonzentration wurden zwei Kulturansätze angelegt. Die Präparation der Zellkulturen zur Bestimmung der Chromosomenaberrationsrate erfolgte nach 24 h. Ca. 2 h vor Beginn der Chromosomenpräparation wurde den Zellkulturen Kolchizin zugegeben; die Aufarbeitung der Präparate erfolgte nach Standardprotokollen (Hypotonie, Fixierung und Giemsa-Färbung).

DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle (1 % des Kulturansatzes) und Triethylenmelamin (TEM) als Positivkontrolle in einer Endkonzentration von 250 ng/ml Medium eingesetzt.

4.3.4.4 Mikroskopische Auswertung

Die Zellpräparate wurden kodiert und die chromosomalen Veränderungen am Zeiss-Mikroskop (Typ Jenaval) bei 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion) ausgewertet. Zur Bestimmung der Chromosomenaberrationsrate wurden 100 gut gespreitete Metaphasen in der 1. Mitose einbezogen. Dabei werden strukturelle Aberrationen nach der Nomenklatur von Savage (1976)[3] erfasst.
In der Abbildung 6 ist eine normale Metaphasenplatte zu sehen. Abbildung 7 zeigt eine Metaphase mit multiplen Chromosomenaberrationen.

Abb. 6: Normale Metaphasenplatte aus einer Präparation der Zelllinie V79

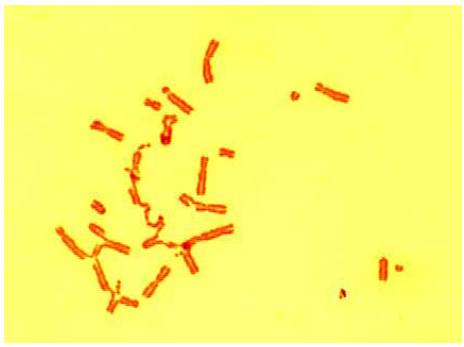


Abb. 7: Metaphase mit multiplen Chromosomenaberrationen aus einer Präparation der Zelllinie V79

4.3.4.5 Bewertung

Bei einem reproduzierbaren und dosisabhängigen Anstieg der Chromosomenaberrationsrate im Vergleich zur Negativkontrolle liegt eine gentoxische Wirkung vor.

[3] Savage JRK (1976): Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. Journal Medical Genetics 13, 103-122.

5. Ergebnisse und wissenschaftliche Bewertung der Datenlage

Nach der Gentoxizitätsprüfung der Einzelsubstanzen galt es die Frage zu beantworten, ob der primäre Wirkmechanismus einer Substanz als gentoxisch (primärer DNA-Schaden) oder als nichtgentoxisch (z. B. Beeinflussung der DNA-Reparatur oder Zytotoxizität) einzustufen ist. Dabei ist von entscheidender Bedeutung, dass für nichtgentoxische Mechanismen Schwellenwerte (Wirkschwellen), unterhalb derer keine nachweisbaren Effekte auftreten, angenommen werden. Hingegen wird für den Mechanismus Gentoxizität keine Wirkschwelle definiert.
Die eingesetzte Teststrategie (Gentoxizität) gibt Hinweise auf gentoxische Wirkungen und korrespondierende Wirkmechanismen. Zur Evaluierung dieser wurden weitere mechanistisch orientierte Untersuchungen durchgeführt. Diese Prüfungen umfassten die Generierung von Daten zur Zytotoxizität unter besonderer Berücksichtigung apoptotischer Prozesse. Die Testbatterie zur Gentoxizitätsprüfung bestand aus 2 In-vitro-Testverfahren zum Nachweis von Gen- und Chromosomenmutationen. Zur Abklärung mechanistischer Fragestellungen wurden mit der Bestimmung der plating efficiency und dem Nachweis von Apoptose Testverfahren zum Nachweis von Zytotoxizität herangezogen. Die Zahl der ausgewählten Testsubstanzen und die vorgeschriebenen Wiederholungen für die einzelnen Testsysteme führten zu einem sehr umfangreichen Datensatz. Da die wichtigste Aussage dieser Substanzprüfung in der Bewertung des toxikologischen Wirkprofils besteht, wird daher im Folgenden ein pragmatischer Ansatz gewählt und die Ergebnisse aus den einzelnen Testverfahren summarisch dargestellt. Die Einzeldaten der Gentoxizitätsprüfung sind im Anhang aufgelistet.
Die Resultate der In-vitro-Testung für die 1-fach substituierten Benzoesäuren mit den Einzelsubstanzen 2-Amino-, 3-Amino-, 4-Amino-, 2-Nitro-, 3-Nitro- und 4-Nitrobenzoesäure sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab. 2: Ergebnisse der In-vitro-Testung für 1-fach substituierte Benzoesäuren

Substanz	**Testsystem**				
	Ames		Chromosomen-aberrationen (CA)	Apoptose	plating efficiency
	1*	2*			
2-Aminobenzoesäure	–		–	–	–
3-Aminobenzoesäure	–		–	–	–
4-Aminobenzoesäure	–		–	–	–
2-Nitrobenzoesäure	+	–	–	–	–
3-Nitrobenzoesäure	+	–	–	–	–
4-Nitrobenzoesäure	+	–	–	–	–

1*: TA 98; TA 100 2*: Testansatz bei positiven Befunden unter 1* ; TA 98NR; TA 100NR

\+ positiv – negativ

Im Ames-Test (Genmutation) konnten für die Aminoverbindungen keine gentoxischen Effekte nachgewiesen werden. Die positiven Effekte für 2-, 3-, und 4-Nitrobenzoesäure in den Standardstämmen TA 98 und TA 100 bestätigten sich nach Testung in den Nitroreduktase-defizienten Stämmen TA 98NR und TA 100NR nicht. In der Säugerzellkultur (Chromosomenaberrationen) konnten für keine dieser 1-fach substituierten Benzoesäuren

gentoxische Effekte nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung der plating efficiency und eine Induktion von apoptotischen Prozessen war nicht zu beobachten.

Die wissenschaftliche Bewertung der Ergebnisse führt zur Einschätzung, dass **2-Amino-, 3-Amino-, 4-Amino-, 2-Nitro-, 3-Nitro- und 4-Nitrobenzoesäure** als **nichtgentoxisch** einzustufen sind (Tabelle 3).

Tab. 3: Wissenschaftliche Bewertung der Ergebnisse für 1-fach substituierte Benzoesäuren

Substanz	**Bewertung**	**Schaden**	**Risiko**
2-Aminobenzoesäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
3-Aminobenzoesäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
4-Aminobenzoesäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
2-Nitrobenzoesäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
3-Nitrobenzoesäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
4-Nitrobenzoesäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko

Für die 2-fach substituierten Benzoesäuren ergibt sich folgendes Bild (Tab. 4).

Die Verbindung 3,4-Diaminobenzoesäure zeigte im Ames-Test keine gentoxischen Effekte. Die in den Standardstämmen TA 98 und TA 100 ermittelten positiven Befunde für die Substanzen 3,5-Diamino-, 3,4-Dinitrobenzoesäure konnten mit den Nitroreduktase-defizienten Stämmen TA 98NR und TA 100NR nicht bestätigt werden. Die positiven Befunde im klassischen Ames-Test für die Substanzen 2-Amino-4-nitro-, 2-Amino-5-nitro- und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure waren nach Einsatz der Nitroreduktase-defizienten Stämme im Teststamm TA 98NR weiterhin nachweisbar. Hingegen konnten im Teststamm TA 100NR keine positiven Effekte für die Substanzen ermittelt werden.
Für die Substanzen 3,4-Diamino-, 3,5-Diamino-, 2-Amino-4-nitro-, 2-Amino-5-nitro- und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure war in der Säugerzellkultur keine Zunahme der CA-Rate zu verzeichnen. Parallel dazu ließen sich keine Induktion der Apoptose und Beeinflussung der plating efficiency nachweisen. Für die Substanz 3,4-Dinitrobenzoesäure war eine Induktion der CA-Rate bei gleichzeitiger Beeinflussung der plating efficiency zu beobachten.

Tab. 4: Ergebnisse der In-vitro-Testung für 2-fach substituierte Benzoesäuren

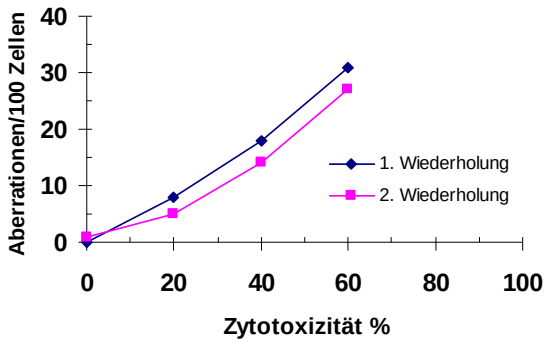
Substanz	**Testsystem**				
	Ames		Chromosomen-aberrationen (CA)	Apoptose	plating efficiency
	1*	2*			
3,4-Diaminobenzoesäure	**–**		**–**	**–**	**–**
3,5-Diaminobenzoesäure	+	**–**	**–**	**–**	**–**
3,4-Dinitrobenzoesäure	+	**–**	+	**–**	+
2-Amino-4-nitrobenzoesäure	+	+	**–**	**–**	**–**
2-Amino-5-nitrobenzoesäure	+	+	**–**	**–**	**–**
5-Amino-2-nitrobenzoesäure	+	**(+)**	**–**	**–**	**–**

1*: TA 98; TA 100 2*: Testansatz bei positiven Befunden unter 1* ; TA 98NR; TA 100NR
+ positiv – negativ (+) schwach positiv

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen den Toxizitätsdaten und der Induktion von Chromosomenaberrationen (CA) verdeutlicht einen starken Anstieg der Aberrationsrate bei gleichzeitiger Zunahme der Zytotoxizität (Tab. 5).

Tab. 5: Vergleich von Zytotoxizität und Anzahl der Chromosomenaberrationen
- 3,4-Dinitrobenzoesäure -

% Zytotoxizität	Anzahl Chromoso-menaberrationen	
	1. Wiederholung	2. Wiederholung
0	0	1
20	8	5
40	18	14
60	31	27
80	toxisch	toxisch
100	toxisch	toxisch



Die Induktion von Chromosomenaberrationen für die Substanz 3,4-Dinitrobenzoesäure stellt offenbar nicht den primären Mechanismus dar, sondern ist eine Folge der starken Zytotoxizität, wobei für diesen Mechanismus ein Schwellenwert angenommen wird.
Unterstützt wird diese Aussage durch die Analyse der Datensätze aus In-vivo-Experimenten. Substanzen mit geringer Toxizität erwiesen sich als positiv für Klastogenität/Kanzerogenität. Hingegen konnten keine Hinweise für Klastogenität/Kanzerogenität für Verbindungen mit hoher Toxizität (hier: 3,4-Dinitrobenzoesäure) gefunden werden.

Diese Tatsache führt zu der Einschätzung, dass sowohl **3,4-Dinitro-,** als auch **3,4-Diamino-** und **3,5-Diaminobenzoesäure** als **nichtgentoxisch** einzustufen sind.
Für die Substanzen **2-Amino-4-nitro-, 2-Amino-5-nitro- und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure** bestehen durch die positiven Effekte im Ames-Test **Verdachtsmomente** auf eine **gentoxische Wirkung** (Tab. 6). In weiteren Untersuchungen gilt es, die biologische Relevanz dieser Ergebnisse (hier: Rolle des Metabolismus; Versuchsansatz Komplementierung des S9-Mixes und Zielzelle; Einsatz von Teststämmen mit spezifischen adäquaten Enzymmustern) abzuklären. Inwieweit diese weiteren Prüfungen als zwingend notwendig erscheinen, ist in Bezug zu den realen Expositionsbedingungen zu entscheiden.
Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass bei der Beurteilung der Datenlage Ames-Test positiv / Chromosomenmutationstest in vitro negativ für die Nitroaromaten zwei Aspekte eine wesentliche Rolle spielen:

(1) unterschiedliche Metabolisierung in Bakterien und Säugerzellen; positive Effekte als Ergebnis eines bakterienspezifischen Metabolismus
(2) geringe Korrelation zwischen positiven Befunden im Ames-Test und Kanzerogenität im Säuger.

Diese Aspekte und hinzunehmend die Erfahrungen aus der Industriechemikalienbewertung, wenn nämlich der Ames-Test in weiterführenden Untersuchungen der einzig positive Befund

blieb, lassen es gerechtfertigt erscheinen, dass die hier gefundenen positiven Ergebnisse im Ames-Test bei der gegebenen Datenlage nicht überbetont werden müssen, sie aber dennoch einer Abklärung bedürfen.

Tab. 6: Wissenschaftliche Bewertung der Ergebnisse für 2-fach substituierte Benzoesäuren

Substanz	Bewertung	Schaden	Risiko
3,4-Diaminobenzoesäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
3,5-Diaminobenzoesäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
3,4-Dinitrobenzoesäure	nichtgentoxisch	multipler Zellschaden	kein Risiko unter Wirkschwelle
2-Amino-4-nitrobenzoesäure	Verdachtsmomente	Abklärung der Relevanz	Abklärung der Relevanz
2-Amino-5-nitrobenzoesäure	Verdachtsmomente	Abklärung der Relevanz	Abklärung der Relevanz
5-Amino-2-nitrobenzoesäure	Verdachtsmomente	Abklärung der Relevanz	Abklärung der Relevanz

Die Ergebnisse der In-vitro-Testung für die untersuchten Toluolsulfonsäuren sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7: Ergebnisse der In-vitro-Testung für Toluolsulfonsäuren

Substanz	Testsystem				
	Ames		Chromosomen-aberrationen (CA)	Apoptose	plating efficiency
	1*	2*			
4-Aminotoluol-3-sulfonsäure	–		–	–	–
4-Nitrotoluol-2-sulfonsäure	–		–	–	–

1*: TA 98; TA 100 2*: Testansatz bei positiven Befunden unter 1* ; TA 98NR; TA 100NR
+ positiv – negativ

Beide Substanzen aus der Gruppe der Toluolsulfonsäuren zeigten in keinem der durchgeführten Gentoxizitäts- und Zytotoxizitätstests positive Befunde.

Die 2 getesteten **Toluolsulfonsäuren** können somit als **nichtgentoxisch** eingestuft werden (Tab. 8).

Tab. 8: Wissenschaftliche Bewertung der Ergebnisse für Toluolsulfonsäuren

Substanz	Bewertung	Schaden	Risiko
4-Aminotoluol-3-sulfonsäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
4-Nitrotoluol-2-sulfonsäure	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Substanztestung für die Gruppe der Nitrophenole zusammengefasst. Die Substanzen 3-Methyl-4-nitrophenol und 4-Methyl-2,6-dinitrophenol zeigten positive Effekte im klassischen Ames-Test, die sich nach Prüfung mit den Nitroreduktase-defizienten Stämmen nicht bestätigten. Die 4 weiteren Substanzen 2-Methyl-3-nitrophenol, 3-Methyl-2-nitrophenol, 4-Methyl-2-nitrophenol und 5-Methyl-2-nitrophenol waren im klassischen Ames-Test negativ.
Von den 6 Verbindungen aus der Substanzklasse der Nitrophenole induzierten 4 Vertreter (2-Methyl-3-nitrophenol, 3-Methyl-2-nitrophenol, 3-Methyl-4-nitrophenol und 4-Methyl-2,6-dinitrophenol) eine Erhöhung der Chromosomenaberrationsrate bei gleichzeitiger Induktion von Apoptose und Hemmung der plating efficiency als Zytotoxizitätsmarker. Die Substanz 5-Methyl-2-nitrophenol erwies sich als negativ in der Gentoxizitätsprüfung, die Induktion von Apoptose führte zu keiner Erhöhung der Chromosomenaberrationsrate. Die Substanz 4-Methyl-2-nitrophenol zeigte weder in der Zytotoxizitäts- noch in der Gentoxizitätstestung positive Effekte.

Tab. 9: Ergebnisse der In-vitro-Testung für Nitrophenole

Substanz	**Testsystem**				
	Ames		Chromosomen-aberrationen (CA)	Apoptose	plating efficiency
	1*	2*			
2-Methyl-3-nitrophenol	–		+	+	+
3-Methyl-2-nitrophenol	–		+	+	+
3-Methyl-4-nitrophenol	+	–	+	+	+
4-Methyl-2-nitrophenol	–		–	–	–
5-Methyl-2-nitrophenol	–		–	+	–
4-Methyl-2,6-dinitrophenol	+	–	+	**(+)**	+

1*: TA 98; TA 100 2*: Testansatz bei positiven Befunden unter 1* ; TA 98NR; TA 100NR
+ positiv – negativ (+) schwach positiv

Aus langjährigen Erfahrungen mit der Bestimmung der CA-Rate in der Säugerzellkultur ist bekannt, dass dieses Testsystem auch bei richtiger Anwendung des Standardprotokolls zu „falsch positiven“ Ergebnissen über die Induktion verschiedener Mechanismen, wie z. B. Zytotoxizität, führen kann. Durch eine Analyse nicht nur der Anzahl der Chromosomenaberrationen, sondern auch eine Aufschlüsselung nach Typen der Chromosomenaberrationen kann eine Verifizierung der erhobenen Befunde erfolgen (Tab. 10).

Tab. 10: Spezifizierung der zytogenetischen Analyse durch Erfassung der Typen der Chromosomenaberrationen

Konzentration (mg/Kulturansatz)	**Aberrationen/100 Zellen**							
	2-Methyl-3-nitrophenol		**3-Methyl-2-nitrophenol**		**3-Methyl-4-nitrophenol**		**4-Methyl-2,6-dinitrophenol**	
	1 a/b	*2* a/b	*1* a/b	*2* a/b	*1* a/b	*2* a/b	*1* a/b	*2* a/b
5	**-**	**-**	-	**-**	**-**	**-**	**4/3**	**0/0**
2,5	**-**	**-**	-	**-**	**-**	**-**	**5/3**	**0/0**
1	**6/7**	**0/0**	**7/5**	**0/0**	**6/4**	**0/0**	**2/4**	**0/0**
0,5	**5/6**	**0/0**	**6/5**	**0/0**	**5/3**	**0/0**	**2/2**	**0/0**
0,25	**4/3**	**0/0**	**3/4**	**0/0**	**6/4**	**0/0**	**1/0**	**0/0**
0,1	**2/3**	**0/0**	**2/1**	**0/0**	**3/5**	**0/0**	**1/1**	**0/0**
0,05	**2/1**	**0/0**	**0/1**	**0/0**	**2/1**	**0/0**	**0/1**	**0/0**
0,025	**0/1**	**0/0**	**1/1**	**0/0**	**0/1**	**0/0**	**0/0**	**0/0**
0,01	**0/0**	**0/0**	**1/0**	**0/0**	**1/0**	**0/0**	**0/0**	**0/0**

1-Chromosomen- und Chromatidbrüche *2*-Chromatidaustausch
a-1. Wiederholung b-2. Wiederholung - zytotoxisch

Für alle Verbindungen konnten nur Chromosomen- und Chromatidbrüche und keine Chromatidaustausche nachgewiesen werden. Dies ist aus der Natur des primären DNA-Schadens zu erklären. In Zellen mit primären DNA-Schäden findet DNA-Reparatur statt und führt zu Chromatidaustauschen. In der Praxis heißt das, dass ein hoher Anteil von Chromosomen- und Chromatidbrüchen ohne Chromatidaustausche auf apoptotische Prozesse bei der Induktion von Brüchen hinweist.
Da für die 4 Verbindungen eine Induktion der Apoptose gemessen wurde, scheint dieser Mechanismus primär zu sein und die Induktion von Chromosomenaberrationen als sekundär einzustufen.
Damit können die 6 Verbindungen aus der Gruppe der **Nitrophenole** als **nichtgentoxisch** bewertet werden. Für die zytotoxischen und apoptotischen Mechanismen sind Wirkschwellen anzunehmen, unterhalb derer kein Risiko zu erwarten ist (Tab. 11).

Tab. 11: Wissenschaftliche Bewertung der Ergebnisse für Nitrophenole

Substanz	**Bewertung**	**Schaden**	**Risiko**
2-Methyl-3-nitrophenol	nichtgentoxisch	multipler Zellschaden	kein Risiko unter Wirkschwelle
3-Methyl-2-nitrophenol	nichtgentoxisch	multipler Zellschaden	kein Risiko unter Wirkschwelle
3-Methyl-4-nitrophenol	nichtgentoxisch	multipler Zellschaden	kein Risiko unter Wirkschwelle
4-Methyl-2-nitrophenol	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
5-Methyl-2-nitrophenol	nichtgentoxisch	keiner	kein Risiko
4-Methyl-2,6-dinitrophenol	nichtgentoxisch	multipler Zellschaden	kein Risiko unter Wirkschwelle

Zusammenfassung:

Die In-vitro-Testung (Prüfung auf Gentoxizität) ermöglicht erste Aussagen über toxikologische Wirkprofile der Substanzen im Sinne einer ja/nein-Antwort (gentoxisch/nichtgentoxisch). Gleichzeitig konnten durch weiterführende Untersuchungen (Prüfung auf Zytotoxizität) mechanistische Fragestellungen abgeklärt werden.
Für gentoxische Kanzerogene wird von einer Dosis-Wirkung-Beziehung ohne Wirkschwelle ausgegangen. Die praktischen Konsequenzen sind weitreichend, denn bei Nichtvorhandensein einer Schwelle im Niedrig-Dosis-Bereich sind enorme Anstrengungen zur Vermeidung oder Verringerung der Exposition und ein umfangreiches Überwachungsprogramm gefordert.
Deutlich ist geworden, dass die Induktion von Apoptose zu einer Überbewertung des genetischen Potenzials, und zwar insbesondere für Chromosomenaberrationen, führen kann. Dies wurde durch eine Typisierung der Chromosomenanalyse und dem Nachweis von Apoptose relativiert. Zytotoxische Mechanismen werden allgemein als ein „low risk“-Mechanismus der Kanzerogenese beschrieben.
Für einige Vertreter der polaren Nitroaromaten kann das **neue Paradigma für Humankanzerogene** angenommen werden, wonach als primäre Wirkung die Beeinflussung verschiedener zellulärer Mechanismen unter **Annahme einer Wirkschwelle** zu definieren ist.

Fazit der Stoffbewertung:

1. Für die Substanzen 2-Amino, 3-Amino-, 4-Amino-, 2-Nitro-, 3-Nitro- und 4-Nitrobenzoesäure (1-fach substituierte Benzoesäuren), 3,4-Diamino- und 3,5-Diaminobenzoesäure (2-fach substituierte Benzoesäuren), 4-Aminotoluol-3- und 4-Nitrotoluol-2-sulfonsäure (Toluolsulfonsäuren) sowie 4-Methyl-2-nitrophenol und 5-Methyl-2-nitrophenol (Nitrophenole) waren **keine zytotoxischen und gentoxischen Wirkungen** nachweisbar.
2. Für Vertreter aus den Substanzgruppen der 2-fach substituierten Benzoesäuren (3,4-Dinitrobenzoesäure) und der Nitrophenole (2-Methyl-3-nitrophenol, 3-Methyl-2-nitrophenol, 3-Methyl-4-nitrophenol und 4-Methyl-2,6-dinitrophenol) sind **zytotoxische Wirkungen als primärer Wirkmechanismus unter Annahme einer Wirkschwelle zu definieren**.
3. Für die Substanzen 2-Amino-4-nitro-, 2-Amino-5-nitro- und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure aus der Gruppe der 2-fach substituierten Benzoesäuren bestehen auf Grund der Datenlage Ames-Test/positiv und Chromosomenaberrationen/negativ **Hinweise auf Verdachtsmomente einer gentoxischen Wirkung**.

Ausblick:

Mit der Erstbewertung (Standard-Testprogramme) wurde eine Problemeingrenzung hinsichtlich spezifischer Wirkungen (Zytotoxizität/Gentoxizität) und eine Prioritätensetzung für weiterführende Arbeiten erreicht. Zur abschließenden stoffspezifischen Risikobewertung sind zusätzliche mechanistisch orientierte Untersuchungen für die oben unter 2 und 3 aufgeführten Verbindungen notwendig.

Für diese weiterführenden Arbeiten ergeben sich aus der vorliegenden Datenbasis folgende Schwerpunkte:

→ **Abklärung der Relevanz der Gentoxizitätsbefunde**
Bei der stabilen Ausprägung von DNA-Schäden spielen Reparaturmechanismen eine entscheidende Rolle. Dem UDS-Test (Messung der Induktion von DNA-Reparatur) wird eine dezisive Funktion zugewiesen bei der weitergehenden Prüfung zur Abklärung der Bedeutung von Verdachtsmomenten auf gentoxische Wirkung.
Substanzspektrum: 2-Amino-4-nitro-, 2-Amino-5-nitro- und 5-Amino-2-nitro-benzoesäure

→ **Aufnahme von Dosis-Wirkung-Beziehungen im Niedrig-Dosisbereich für den kritischen Mechanismus Zytotoxizität**
Die detaillierte Kenntnis der Dosis-Wirkung-Beziehung stellt das Fundament der Risikobewertung bei nichtgentoxischen Wirkmechanismen dar.
Substanzspektrum: 3,4-Dinitrobenzoesäure, 2-Methyl-3-nitrophenol, 3-Methyl-2-nitro-phenol, 3-Methyl-4-nitrophenol und 4-Methyl-2,6-dinitrophenol

Anhang

- Einzeldaten -