

**Evaluation von Biomarkern für die präklinische
Bestimmung immunmodulatorischer und
immuntoxischer Effekte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jessica Kemmerling
aus Lüdenscheid

Dortmund, September 2017

aus dem Institut für Toxikologie
der Bayer Pharma AG in Wuppertal

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Hans-Werner Vohr

2. Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2018

Für meine Familie

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | IX |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Der komplexe Aufbau des Immunsystems | 1 |
| 1.2 Das Knochenmark ist der Bildungsort der Immunzellen | 2 |
| 1.3 Die vielfältigen Aufgaben der reifen Immunzellen | 4 |
| 1.4 Der Aufbau der lymphatischen Organe Thymus und Milz | 6 |
| 1.5 Der Zelltod als ständiger Begleiter im Thymus | 9 |
| 1.6 Die Bedeutung der Immuntoxikologie | 10 |
| 1.7 Die unterschiedliche regulatorische Betrachtung der immuntoxikologischen Prüfung | 11 |
| 1.8 Die histopathologische Untersuchung von lymphatischen Organen als eine Standarduntersuchung zur Ermittlung der Immuntoxikologie | 13 |
| 1.9 Knochenmarksuntersuchungen als wichtiger Teil in der Evaluation des hämatopoetischen Systems | 15 |
| 1.10 (Immun)toxische Risikobewertung | 16 |
| 1.11 Die Wirkung von ausgewählten Immunmodulatoren | 17 |
| 1.12 Die Anwendung von Biomarkern für die Untersuchung von immunmodulatorischer und immuntoxischer Wirkung | 21 |
| 1.13 Ziel der Arbeit | 23 |
| 2 Material und Methoden | 24 |
| 2.1 Material | 24 |
| 2.1.1 Tiere | 24 |
| 2.1.2 Zellen | 24 |
| 2.1.3 Substanzen, Chemikalien und Reagenzien | 24 |
| 2.1.4 Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 2.1.5 Laborgeräte | 26 |
| 2.1.6 Software | 27 |
| 2.1.7 Lösungen | 28 |
| 2.1.8 Antikörper | 28 |

| | |
|---|----|
| 2.1.9 Kits | 28 |
| 2.2 Methoden | 29 |
| 2.2.1 Etablierung von immunhistochemischen Biomarker in lymphatischen Organen .. | 29 |
| 2.2.1.1 Vorbemerkungen für die Anwendung der Immunhistochemie | 29 |
| 2.2.1.2 Archivierte Studien als histologisches Material..... | 30 |
| 2.2.1.3 Gewebeaufarbeitungen von lymphatischen Organen | 31 |
| 2.2.1.4 Herstellung von Paraffinschnitten | 32 |
| 2.2.1.5 Herstellung von Gefrierschnitten..... | 32 |
| 2.2.1.6 Übersichten über verwendete Primärantikörper in der Immunhistochemie | 32 |
| 2.2.2 Etablierung der immunhistochemischen Färbeprotokolle..... | 33 |
| 2.2.2.1 Färbeprotokoll für die immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode an Paraffinschnitten | 34 |
| 2.2.2.2 Färbeprotokoll für die Fluoreszenz-Färbung an Paraffinschnitten | 35 |
| 2.2.2.3 Färbeprotokoll für die Fluoreszenz-Färbung an Gefrierschnitten..... | 36 |
| 2.2.3 Beurteilung der immunhistochemisch-gefärbten (ABC-Methode) Gewebeschnitte | 36 |
| 2.2.4 Analyse der lymphatischen Organe mithilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie | 37 |
| 2.2.5 Durchführung einer subakuten, oralen Toxizitätsstudie an Ratten | 37 |
| 2.2.5.1 Allgemeine Informationen zu den Versuchstieren und Haltungsbedingungen.... | 38 |
| 2.2.5.2 Toxikologische Standarduntersuchungen | 38 |
| 2.2.5.3 Immuntoxikologische Untersuchungsmethoden..... | 40 |
| 2.2.5.3.1 Immunglobulin-Bestimmung im Serum | 40 |
| 2.2.5.3.2 Subpopulationsanalyse von Immunzellen der Milz und mesenterialen Lymphknoten | 40 |
| 2.2.6 PCA-Analyse und <i>Heatmap-Darstellung</i> | 42 |
| 2.2.7 Untersuchungen des hämatopoetischen Systems..... | 43 |
| 2.2.7.1 Anfertigung und Färbung von Knochenmarksaustriichen | 43 |
| 2.2.7.2 Aufarbeitung von <i>Femur</i> und <i>Sternum</i> für die H&E Diagnostik..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 2.2.7.3 Subpopulations-Analysen von Knochenmarkszellen mittels FACS..... | 44 |
| 2.2.7.4 CFU-Tests mit humanen CD34-Zellen bzw. <i>ex-vivo</i> mit Knochenmarkszellen aus der Ratte..... | 46 |
| 2.2.7.5 Anreicherungen der Knochenmarkszellen aus dem CFU-Assay für die Herstellung von Zytopräparaten | 50 |
| 2.2.7.6 Automatische hämatologische Analysen von Knochenmarkszellen der Ratte | 52 |
| 2.2.7.7 Zytologische Untersuchungen der Knochenmarkszellen anhand (Cytospots und Knochenmarksaustriche) | 53 |
| 2.2.8 Statistische Methoden | 55 |
| 3 Ergebnisse | 56 |
| 3.1 Etablierung der immunhistochemischen Biomarker und Untersuchung der Zielzellen hinsichtlich Lokalisation und Häufigkeit in den lymphatischen Organen..... | 56 |
| 3.2 Histopathologische Untersuchungen von lymphatischen Organen der Ratte aus archivierten toxikologischen Studien | 60 |
| 3.2.1 Azathioprin (AZA)..... | 63 |
| 3.2.2 Cyclosporin A (CSA) | 64 |
| 3.2.3 Oxazolidinone (OXA I - IV) | 65 |
| 3.2.4 Benzo(a)pyren (BAP)..... | 71 |
| 3.2.5 Hexachlorbenzol (HCB) | 72 |
| 3.2.6 Vergleich von LOELs zwischen H&E- und IHC-Färbungen | 74 |
| 3.2.7 Beispiele histopathologischer Effekte in Milz und Thymus im H&E-Schnitt..... | 76 |
| 3.2.8 Beispiele histomorphologischer Veränderungen in Milz und Thymus in IHC-Färbungen..... | 79 |
| 3.3 Untersuchungen von Zellen in den lymphatischen Organen mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie | 82 |
| 3.4 Studienplanungen auf Basis der Ergebnisse im Archivmaterial | 87 |
| 3.4.1 Standarduntersuchungen in toxikologischen Studien | 87 |
| 3.4.2 Histopathologische Ergebnisse..... | 89 |
| 3.4.3. Hauptkomponentenanalyse und <i>Heatmap</i> -Darstellung als Methode zur Auswertung und Visualisierung komplexer großer toxikologischer Datenmengen | 92 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.4 Untersuchungen der Immuntoxikologie | 96 |
| 3.4.4.1 Immunglobulin-Bestimmungen im Serum | 97 |
| 3.4.4.2 Subpopulationsanalysen in lymphatischen Organen | 98 |
| 3.5 Untersuchungen des hämatopoetischen Systems hinsichtlich hämatotoxischer Eigenschaften | 103 |
| 3.5.1 Histopathologische Untersuchung des Knochenmarks | 103 |
| 3.5.2 Subpopulationsanalyse von Knochenmarkszellen | 104 |
| 3.5.3 Automatische hämatologische Analysen von Knochenmarkszellen (Advia) | 108 |
| 3.5.4 Zytologische Untersuchung und Differenzierung der Knochenmarkszellen in Knochenmarksausstrichen und Zytopots | 110 |
| 3.5.5 Colony-Forming Unit Assay (CFU-Assay) mit Knochenmarkszellen | 111 |
| 4 Diskussion | 116 |
| 4.1 Etablierung immunhistochemischer Biomarker in lymphatischen Organen der Ratte an bis zu 20 Jahre alten archivierten Toxizitätsstudien | 116 |
| 4.2 Bis zu 20 Jahre alte Toxizitätsstudien bieten ausführliche Informationen über die zellulären Veränderungen nach immunmodulierenden Substanzen | 118 |
| 4.2.1 Die Wirkung von AZA auf die lymphatischen Organe der Ratte | 119 |
| 4.2.2 Die Wirkung von CSA auf die lymphatischen Organe der Ratte | 120 |
| 4.2.3 Die Wirkung von OXA auf die lymphatischen Organe der Ratte | 121 |
| 4.2.4 Die Wirkung von BAP auf die lymphatischen Organe der Ratte | 122 |
| 4.2.5 Die Wirkung von HCB auf die lymphatischen Organe der Ratte | 123 |
| 4.2.6 Die <i>Enhanced Histopathology</i> als geeignetes Mittel zur Auswertung von IHC-Färbungen in Milz und Thymus | 124 |
| 4.2.7 Sechs immunhistochemische Biomarker als Zusatzuntersuchung in toxikologischen Standarduntersuchungen | 125 |
| 4.3 Die Übertragbarkeit von immunmodulatorischen/-toxischen Effekten auf den Menschen | 127 |
| 4.4 Der Nutzen der Laser-Scanning-Mikroskopie im Vergleich zur lichtmikroskopischen Betrachtung von Paraffinschnitten | 128 |
| 4.5 Konsistenz/Inkonsistenz bei Immuneffekten in toxikologischen Studien | 129 |

| | |
|---|-----|
| 4.6 Die Betrachtung der Gesamtdaten zu Standardprüfungen in der Toxizitätsprüfung | 131 |
| 4.7 Die Hauptkomponentenanalyse und <i>Heatmap</i>-Darstellung als geeignetes Mittel zur Visualisierung von großen toxikologischen Datenmengen | 133 |
| 4.8 Immuntoxikologische Standarduntersuchungen | 136 |
| 4.9 Der Vergleich verschiedener Knochenmarksuntersuchungen zur Identifizierung von Hämatoxizität | 138 |
| 4.11 Ausblick | 144 |
| 5 Zusammenfassung | 147 |
| 6 Summary | 149 |
| 7 Literaturverzeichnis | 151 |
| Abbildungsverzeichnis | 161 |
| Tabellenverzeichnis | 165 |
| Eidesstattliche Erklärung | 167 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABC | <i>Avidin-Biotin-Complex</i> |
| AGQ | Albumin-Globulin-Quotient |
| AH | Arylhydrokarbon |
| ALAT | Alanin-Amino-Transferase |
| Aph | Alkalische Phosphatase |
| ASAT | Aspartat-Amino-Transferase |
| AZA | Azathioprin |
| BAP | Benzo(a)pyren |
| BFU | <i>Burst forming unit</i> |
| BFU-E | <i>Burst-forming unit-erythroid</i> |
| BGVV | Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin |
| Bili-T | Bilirubin total |
| BSS | <i>Bovine steer serum</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> (Oberflächenantigen) |
| CFU | <i>Colony-forming unit</i> |
| CFU-G | <i>Colony-forming unit –granulocyte</i> |
| CFU-GEMM | <i>Colony-forming unit -granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte</i> |
| CFU-GM | <i>Colony-forming unit -granulocyte-macrophage</i> |
| CFU-M | <i>Colony-forming unit -macrophage</i> |
| CK | Creatinkinase |
| Cl | Chlorid |
| Crea | Creatin |
| CSA | Cyclosporin A |
| DAB | 3, 3'-Diaminobenzidin |
| DAPI | Diamino-Phenylindol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EH | <i>Enhanced Histopathology</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |

| | |
|-----------|--|
| EM(E)A | <i>European Medicines Agency</i> |
| EPA | <i>Environmental Protection Agency</i> |
| EPO | Erythropoetin |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell scanning</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FFPE | Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettet |
| FIBR | Fibroblasten |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FSC | <i>Forward scatter</i> |
| Gamma-GT | Gamma-Glutamyltransferase |
| GLDH | Glutamatdehydrogenase |
| GLP | Die Gute Laborpraxis |
| HB | Hämoglobin |
| HCB | Hexachlorbenzol |
| HCT | Hämatokrit |
| H&E | Hematoxylin & Eosin |
| IC50/IC90 | Inhibitorische Konzentration um 50 oder 90% |
| ICH | <i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> |
| ICISIS | <i>International Collaborative Immunotoxicological Studies</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| ICH | Immunhistochemie |
| IMDM | <i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i> |
| LDH | Laktat-Dehydrogenase |
| LDS | Lithium dodecyl sulfate |
| LO(A)EL | <i>Lowest observed (adverse) effect level</i> |
| LSM | <i>Laser scanning microscope</i> |
| LYM | Lymphozyten |
| M | Männlich |
| MALT | <i>Mucosa-associated lymphatic tissue</i> |
| MCH | <i>Mean corpuscular haemoglobin</i> |

| | |
|---------|---|
| MCHC | <i>Mean corpuscular haemoglobin concentration</i> |
| MCV | <i>Mean cell volume</i> |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| MK | Mark (Thymus) |
| MZ | Marginalzone (Milz) |
| Na | Natrium |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| NO(A)EL | <i>No observed (adverse) effect level</i> |
| OD | <i>Optical density</i> |
| OECD | <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> |
| OT | Objektträger |
| OXA | Oxazolidinon |
| P | Phosphat |
| PALS | Periarterioläre lymphatische Scheide (Milz) |
| PCA | <i>Principal component analysis</i> |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| PT | <i>Prothrombin time</i> |
| PTT | <i>Partial thromboplastin time</i> |
| R | Rinde (Thymus) |
| RP | Rote Pulpa (Milz) |
| RT | Raumtemperatur |
| SSC | <i>Side scatter</i> |
| Tab. | Tabelle |
| THRO | Thrombozyten |
| W | Weiblich |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| WP | Weißer Pulpa (Milz) |

1 Einleitung

1.1 Der komplexe Aufbau des Immunsystems

Das Immunsystem gehört zu den komplexesten Organsystemen des menschlichen Organismus und erfüllt essentielle Aufgaben, die den Körper vor Krankheiten schützen und somit sein Überleben ermöglichen. Es ist maßgeblich an der Abwehr von eindringenden Erregern wie Bakterien, Viren und Pilzen, der Beseitigung von Tumorzellen sowie dem Schutz vor gefährlichen Fremdstoffen beteiligt. Neben seiner Komplexität ist die Dynamik das zweite Charakteristikum, die dafür verantwortlich ist, dass die verschiedenen Zellen des Immunsystems kommunizieren können. Um die körpereigene Abwehr sicherstellen zu können, sind die Immunzellen sehr mobil. Sie müssen genauestens aufeinander und auf die Gegebenheiten der Immunorgane abgestimmt sein, um eine Immunantwort einzuleiten. Strukturen, die eine Immunantwort auslösen können, werden als Antigene bezeichnet. Solche Antigene können von spezifischen Antikörpern (lösliche Antigene), aber auch durch spezifische Abwehrzellen (zelluläre Antigene) gebunden werden. Nach einer Aktivierungsphase kann so eine spezifische Immunreaktion induziert werden.

Klassischerweise wird das Immunsystem in ein angeborenes und erworbenes Immunsystem eingeteilt. Das angeborene Immunsystem reagiert am schnellsten und bildet die erste Verteidigungslinie. Ist die Antigenlast zu hoch bzw. gelingt es Krankheitserregern durch bestimmte Mechanismen, vom Antigen-unspezifischen, angeborenen Immunsystem nicht erkannt zu werden, greift ein flexiblerer Abwehrmechanismus ein, das adaptive bzw. erworbene, Antigen-spezifische Immunsystem. Dieses entwickelt daraufhin durch sogenannte *Memory*-Zellen im Prinzip ein Gedächtnis und bietet so einen erhöhten Schutz gegen das Antigen. Diesen Mechanismus macht man sich auch bei Impfungen zunutze.

Die lymphatischen Organe sind die Organe des Immunsystems. Nach ihrer Funktion wird zwischen zwei Typen von lymphatischen Organen unterschieden: Die zentralen, primären lymphatischen Organe und die sekundären lymphatischen Organe bzw. Gewebe in der Peripherie. Die primären lymphatischen Organe, zu denen Knochenmark und Thymus gehören, dienen der Bildung und Reifung der Immunzellen. Alle Zellen mit Ausnahme der T-Zellen entwickeln sich größtenteils im Knochenmark weiter. Dahingegen reifen die T-Zellen im Thymus und werden zu immunkompetenten Zellen ausgebildet. Unter „Reifung“ der Immunzellen ist bei B- und T-Zellen nicht nur die Differenzierung zu immunkompetenten Zellen zu verstehen, sondern auch die Selektion auf nicht autoaggressive Immunzellen (Toleranzinduktion).

Zu den sekundären lymphatischen Organen werden Milz, Lymphknoten und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (*mucosa-associated lymphatic tissue*, MALT) zusammengefasst.

Reife Lymphozyten (B- und T-Zellen) besiedeln diese Organe, nehmen Zellkontakt untereinander und mit den Zellen des angeborenen Immunsystems auf. Durch diesen Prozess kann dann eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden. Des Weiteren bilden die sekundären lymphatischen Organe einen Antigensammelplatz, zu dem die Antigene auf unterschiedlichen Wegen gelangen können. Über die Lymphgefäße können Antigene frei oder mithilfe von Makrophagen oder dendritischen Zellen zu den Lymphknoten transportiert werden, die im gesamten Körper verteilt sind. Über die Blutbahn gelangen die Antigene in die Milz, während das MALT über spezifische Mechanismen in der Schleimhaut erreicht wird (Rink et al., 2012).

1.2 Das Knochenmark ist der Bildungsort der Immunzellen

Alle Zellen des Immunsystems und des Blutes stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab.

Das Knochenmark ist eine mesenchymale komplexe Struktur, die aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und einer Mikroumgebung besteht, welche die Besiedlung und Erhaltung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ermöglicht und die Differenzierung und Reifung der Vorläufer unterstützt. Die Umgebung setzt sich aus Stromazellen, endothelialen Zellen und Osteoblasten zusammen. Diese heterogene Zellgruppe produziert hormonähnliche Proteine und Wachstumsfaktoren (Zytokine), durch die hämatopoetische Vorläuferzellen zur Differenzierung getrieben werden. Die dünnen venösen Sinus sind die vaskulären Bereiche im Knochenmark, welche die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten sicherstellen. Zusätzlich stellen sie eine Transportroute dar, über die reife Blutzellen das Knochenmark verlassen und langlebige Immunzellen in das Knochenmark zurückkehren.

Die hämatopoetische Stammzelle kann sich symmetrisch teilen, wodurch sie sich selbst erneuert, oder asymmetrisch teilen, wodurch myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen gebildet werden können. Je nach Art und Menge der vorhandenen Zytokine unterliegen die myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen einer raschen Zellteilung und bilden verschiedene Arten von unipotenten Vorläuferzellen, die sich nicht mehr selbst erneuern können. Eine Besonderheit der unipotenten Vorläuferzellen ist die Fähigkeit Kolonien auszubilden, die als sogenannte Kolonie-bildende Einheiten (*colony-forming units*, CFU) gemessen werden können.

Schließlich gehen aus Knochenmarkstammzellen drei grundsätzliche Zelllinien hervor (lymphoide, myeloide und erythroide), aus denen durch fortschreitende Differenzierung die folgenden reifen Blutzellen des Immunsystems entstehen: In der Erythropoese entstehen die roten Blutkörperchen (Erythrozyten). Aus der Myelopoese gehen Monozyten und polymorpkernige Lymphozyten (Granulozyten) hervor. Während der Thrombopoese entstehen aus Megakaryozyten die Blutplättchen (Thrombozyten). Schließlich bilden sich in der Lymphopoese T-, B- und NK-Zellen (Lodish et al, 2010; Naeim et al., 2013). Eine weitere Unterscheidung der Blutzellen kann zwischen roten und weißen Blutzellen gemacht werden. Die roten Blutzellen sind die Erythrozyten und enthalten den roten Farbstoff Hämoglobin. Alle anderen Zellen ohne diesen Farbstoff werden als weiße Blutzellen (Leukozyten) bezeichnet.

Die Abbildung 1 zeigt die Differenzierung der wichtigsten Immunzellen ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark.

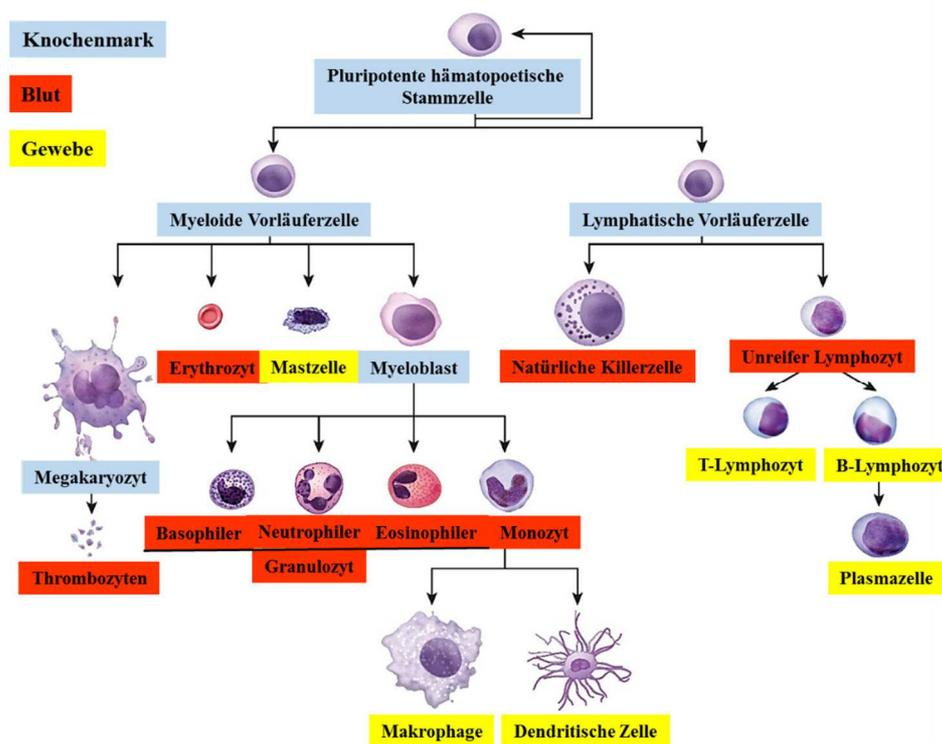


Abb.1 Differenzierung der Immunzellen (vereinfachte Darstellung). Aus den Stammzellen im Knochenmark differenzieren die Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems sowie die roten Blutzellen. (Verändert nach OpenStax, 2013).

1.3 Die vielfältigen Aufgaben der reifen Immunzellen

Immunzellen sind im gesamten Organismus verteilt und lassen sich, wie bereits erwähnt, in Zellen des angeborenen oder adaptiven Immunsystems einteilen.

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und *Natürliche Killerzellen*. Die Vorläuferzellen der Makrophagen sind die Monozyten, die durch einen großen Kern charakterisiert sind. Sie verweilen für eine kurze Dauer im Blut, bevor sie in die Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen differenzieren. Makrophagen, die auch Fresszellen genannt werden, befinden sich in allen Geweben und stellen eine der ersten Verteidigungslinien dar. Sie phagozytieren Antigene, aber auch abgestorbene Körperzellen, indem sie die Zellen und Krankheitserreger in intrazelluläre Phagosomen aufnehmen, in denen sie nach der Fusion mit Lysosomen abgetötet und „verdaut“ werden. Außerdem sezernieren Makrophagen Botenstoffe wie Zytokine und können so eine Immunantwort induzieren.

Neben den Makrophagen stammen ebenfalls die dendritischen Zellen von Monozyten ab.

Unreife dendritische Zellen wandern aus dem Blut ins Gewebe, differenzieren dort und bilden kleine Verästelungen aus. Wenn sie Antigene aufgenommen haben, wandern sie über den Lymphstrom in Lymphknoten oder andere sekundäre lymphatische Organe ein und präsentieren das Antigen über bestimmte Moleküle den T-Zellen (T-Helfer-Zellen).

Granulozyten sind polymorphkernig und besitzen zytoplasmatische Granula. Aufgrund ihres unterschiedlichen Färbeverhaltens ihrer Granula im Blutausstrich werden sie in drei Typen eingeteilt: basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Bei Infektionen werden diese Zellen im großen Umfang im Knochenmark gebildet und wandern anschließend zum Infektionsherd. *Natürliche Killerzellen* (NK) sind Lymphozyten, die darauf selektioniert sind, Tumorzellen oder durch Antikörper „markierte“ Zellen durch zytotoxische Mechanismen zu eliminieren.

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören die Lymphozyten, die zu B- und T-Zellen differenzieren (s.o.). Die Lymphozyten haben einen großen Kern und weisen je nach Typ unterschiedlich klonal verteilte Rezeptoren auf, die Antigene binden können. Die Variabilität der Rezeptoren stellt eine hervorragende Eigenschaft des adaptiven Immunsystems dar. Als sogenannte Plasmazellen sind B-Zellen voll ausdifferenziert und können spezifische Antikörper sezernieren. Die B-Zellen können aber auch, wie dendritische Zellen und Makrophagen, Antigene an T-Helferzellen präsentieren. Unter den T-Zellen werden zwei Hauptpopulationen unterschieden: T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen.

T-Helferzellen unterstützen die Immunantwort, indem sie nach der Bindung mit einem Antigen B-Zellen oder zytotoxische T-Zellen und Makrophagen aktivieren. B-Zellen differenzieren daraufhin zu Antikörper produzierenden Plasmazellen. Zytotoxische T-Zellen sind dagegen darauf spezialisiert, infizierte Zellen zu töten.

Die verschiedenen Populationen von Immunzellen lassen sich durch ihr Profil an Oberflächenmerkmalen unterscheiden. Durch die Bindung von selektiven Antikörpern an diese Oberflächenmerkmale können die verschiedenen Immunzellen z.B. im histologischen Schnitt mithilfe der Immunhistochemie unterschieden werden. Diese Antikörper werden in sogenannten *cluster of differentiation* zusammengefasst. Das Molekül auf der Oberfläche der Immunzellen, das von solch einem Cluster gebunden wird, heißt CD (*cluster determinant*).

Die Verwendung von spezifischen Antikörpern in der Immunhistochemie oder zellulären Untersuchungsmethoden, die diese Cluster binden, ermöglichen eine Unterscheidung der Lymphozytenpopulationen. Abhängig von ihrem Differenzierungs- oder Aktivierungszustand exprimieren sie eine bestimmte Auswahl dieser Oberflächenmoleküle. T-Helferzellen exprimieren z.B. das CD4-Molekül, während zytotoxische T-Zellen CD8-positiv (CD8⁺) sind.

Antikörper, die auch Immunglobuline (Ig) genannt werden, sind Proteine, die einerseits als Transmembranrezeptoren auf der Zelloberfläche von B-Zellen zu finden sind. Andererseits werden diese als lösliche Antikörper von aktivierten B-Zellen (Plasmazellen) während der Immunreaktion in Körperflüssigkeiten sezerniert. Die Struktur von Antikörpern ist Y-förmig und erfüllt zwei Funktionen: Die beiden Arme der Y-Struktur stellen Antigenbindungsstellen dar und der Stamm sorgt für die immunologische Effektorfunktionen. In Säugetieren existieren fünf verschiedene Antikörperklassen (Isotypen), die sich in Struktur, Eigenschaft und Verteilung im Organismus unterscheiden: IgG, IgM, IgD, IgA und IgE. Diese Klassen können im Rahmen einer Immunantwort von jeweils einem B-Zellklon nacheinander synthetisiert werden (Isotypwechsel). Dabei ändern sich allerdings nicht die Bindungseigenschaften der entsprechenden Antikörper. Bei immuntoxischen Untersuchungen ist insbesondere die Messung der zwei Ig-Klassen IgG und IgM im Serum wichtig, um einen Eindruck über den Immunstatus eines Organismus zu bekommen. IgM wird bei einem Erreger-Erstkontakt gebildet und deutet eine frühe Phase der Immunreaktion an (Aktivierung des Komplement-Systems zur Zerstörung des Antigens).

IgG ist der am häufigsten vorkommende Immunglobulin-Isotyp. Die Erhöhung des IgG-Spiegels, ausgelöst durch sogenannte B-Gedächtniszellen (*Memory-Zellen*), kann ein Indikator für eine bestehende Infektion sein. Gedächtniszellen sind Lymphozyten, die ein immunologisches Gedächtnis darstellen und bei erneutem Kontakt mit dem Antigen schnell mit der Produktion von IgG reagieren (Janeway, 2002; Buchwalow et al., 2010; Schütt & Bröker, 2011; Rink et al., 2012).

1.4 Der Aufbau der lymphatischen Organe Thymus und Milz

Im Folgenden soll der Aufbau der lymphatischen Organe Thymus und Milz genauer beschrieben werden, die in dieser Arbeit eine besondere Rolle spielen.

Wie bereits erwähnt ist der Thymus ein primäres lymphatisches Organ, in das die Vorläufer-T-Zellen aus dem Knochenmark einwandern, proliferieren, selektioniert werden und differenzieren. Die reifenden T-Zellen werden auch als Thymozyten bezeichnet. Der Thymus liegt im Thorax im vorderen *Mediastinum*. Er bildet sich früh in der fetalen Entwicklung als erstes lymphatisches Organ in Hinblick auf die postnatale Antigenstimulation und die Bildung einer Vielzahl von reifen T-Zellen. Bei Ratten erreicht der Thymus während der sexuellen Reife seine Maximalgröße und bildet sich danach kontinuierlich zurück.

Der vollständig entwickelte Thymus besteht aus zwei Lappen, die von einer Bindegewebskapsel umschlossen sind. Von dieser ziehen zahlreiche Bindegewebsstränge (Trabekel) ins Innere des Organs, sodass es wiederum in unterschiedlich große Läppchen gegliedert ist. Jedes Läppchen besitzt lichtmikroskopisch in der Hematoxylin und Eosin-Färbung (H&E) eine äußere dunkle Zone, die Thymusrinde (Kortex), und eine zentrale helle Zone, das Thymusmark (Medulla). Die Rinde besitzt ein Grundgerüst epithelialer Zellen, in das unreife Thymozyten und einige Makrophagen eingelagert sind. Die dunkle Farbe kommt durch die dicht-gepackten Thymozyten und ihre stark mit Hämatoxylin gefärbten Kerne zustande. Im Mark befinden sich hauptsächlich reife Lymphozyten zwischen den epithelialen Zellen, die zusätzlich von Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen begleitet werden. Der Grund für die heller gefärbte Medulla liegt in den weniger dichten Lymphozyten und anderen Zytoplasma-reicheren Zelltypen. Die reifen, aber naiven T-Zellen verlassen den Thymus und wandern über den Blutstrom in die peripheren lymphatischen Organe, wo sie sich zunächst in den T-Zell-Regionen aufhalten.

Das Grundgerüst des Thymus bildet ein Netzwerk von epithelialen Zellen, die in verschiedenen Populationen je nach strukturellen Eigenschaften und Hormonbildung unterschieden werden. Dies ist der Grund, warum der Thymus als einziges lymphatisches Organ ein lymphoepitheliales Organ ist (Abb.2). Immunhistochemisch lassen sich die Epithelzellen mit einem Antikörper gegen Zytokeratin sichtbar machen.

Eine Besonderheit im Thymus von Wistar-Ratten stellen die epithelfreien Regionen dar, die keine Stromalen Elemente enthalten und im subkapsulären Bereich des Kortex liegen. Sie enthalten gelegentlich Makrophagen und Thymozyten mit einer hohen Proliferationsrate.

Die thymischen Arterien folgen den Bindegewebssträngen und treten in das Organparenchym an der Grenze zwischen Kortex und Medulla ein. Die kortikomedulläre Grenzregion beheimatet neben vielen Blutgefäßen auch (un-) reife T-Zellen, dendritische Zellen, B-Zellen und Plasmazellen. Die kortikomedullären Arteriolen verzweigen in Kapillaren, die Kortex und Medulla versorgen. Die Kapillaren im Kortex sind impermeabel für Antigene und verhindern dadurch ihren Kontakt mit den unreifen Thymozyten. Dahingegen sind medulläre Kapillaren für zirkulierende Antigene permeabel (Pearse, 2006).

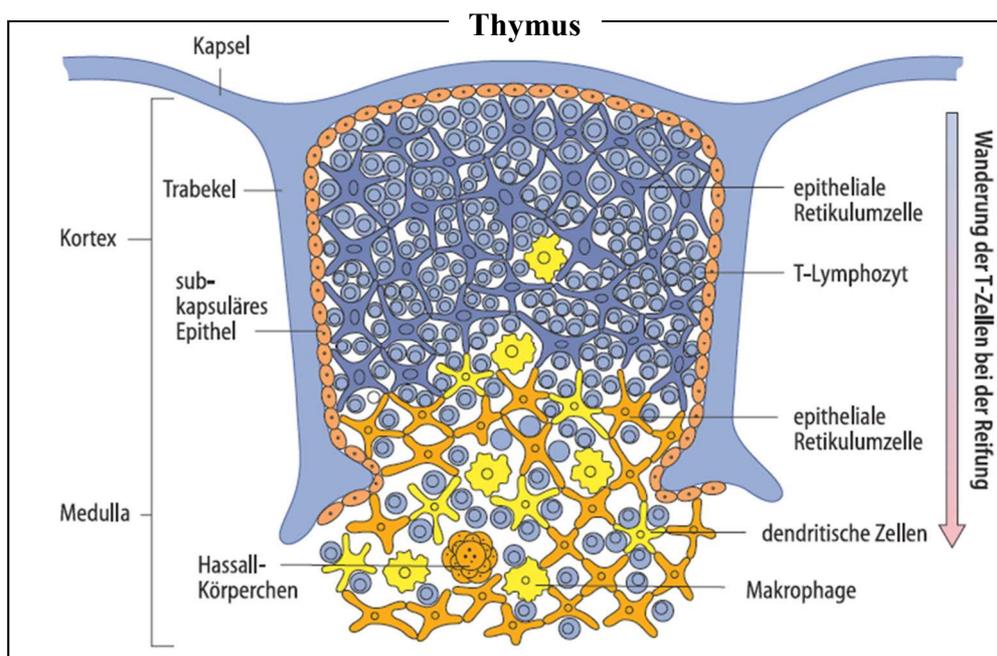


Abb.2 Zellulärer Aufbau des Thymus. (Verändert nach Junqueira & Carneiro, 2004)

Die längliche und im Querschnitt dreieckige Milz ist ein dunkel-rotes bis blau-schwarzes Organ, das sich im linken Bauchraum befindet. Sie stellt das größte sekundäre lymphatische Organ dar, das in die Immunantwort auf aus dem Blut stammende Antigene eingebunden ist. Die Milz ist von einer Kapsel umgeben, die aus fibrösem Gewebe, elastischen Fasern und glatter Muskulatur besteht.

Irreguläre Trabekel aus glatter Muskulatur und fibroelastischem Gewebe enthalten Blut-, Lymphgefäße, Nerven und ziehen von der Kapsel ins Innere des Organs.

Morphologisch und funktionell ist die Milz in zwei Kompartimente geteilt, die rote und die weiße Pulpa. Die rote Pulpa dient als Blutfilter, in der Fremdmaterial und beschädigte Erythrozyten entfernt werden, die über arterielle Gefäße in die Milz gelangen. Die rote Pulpa besteht aus einem dreidimensionalen Maschenwerk aus Fibroblasten, retikulären Fasern und venösen Sinus. In den Maschen befinden sich Blutzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen. Die rote Milzpulpa dient auch als Blutspeicher und kann, je nach Tierart, bei Bedarf zusätzliche Erythrozyten und Thrombozyten in die Zirkulation abgeben, indem sich die Milz kontrahiert. Insbesondere bei Nagern wie der Ratte ist die rote Milzpulpa ein Ort der Blutbildung.

Die weiße Pulpa ist der Ort der Immunantwort. Sie enthält wiederum drei Kompartimente, die periarterioläre lymphatische Scheide (PALS), die Follikel und die Marginalzone (siehe Abb.3). In ihr befinden sich Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Plasmazellen, Arteriolen und Kapillaren in einem retikulären Maschenwerk, ähnlich wie in der roten Pulpa.

Die Zentralarterie tritt über die rote Pulpa ein und ist von der PALS umgeben, die aus Lymphozyten und Fibroblasten besteht. Die innere PALS ist eine T-Zell-abhängige Region, die etwas intensiver als die äußere PALS gefärbt ist. Sie besteht größtenteils aus $CD4^+$ -T-Zellen und gelegentlich $CD8^+$ -T-Zellen, dendritische Zellen und B-Zellen. Die äußere PALS beinhaltet B- und T-Zellen, Makrophagen und Plasmazellen nach Antigenstimulation. Die Marginalzone ist eine einheitliche Region, die zwischen roter Pulpa und PALS liegt. Sie enthält Fibroblasten, dendritische Zellen und B-Zellen. Von einigen Wissenschaftlern wird sie als separates Kompartiment unabhängig der weißen Pulpa angesehen. Ihre Funktion liegt in der Überwachung der systemischen Zirkulation von Antigenen und Pathogenen und sie spielt eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation. Follikel befinden sich durchgehend in der PALS und sind von einer Ansammlung von B-Zellen (B-Zell-Corona) umgeben. Sie bestehen primär aus B-Zellen, dendritische Zellen und $CD4^+$ -T-Zellen. Nach Antigenstimulation können die Follikel Keimzentren ausbilden, die „*Tingible body*-Makrophagen“ und apoptotische B-Zellen enthalten (Cesta, 2006).

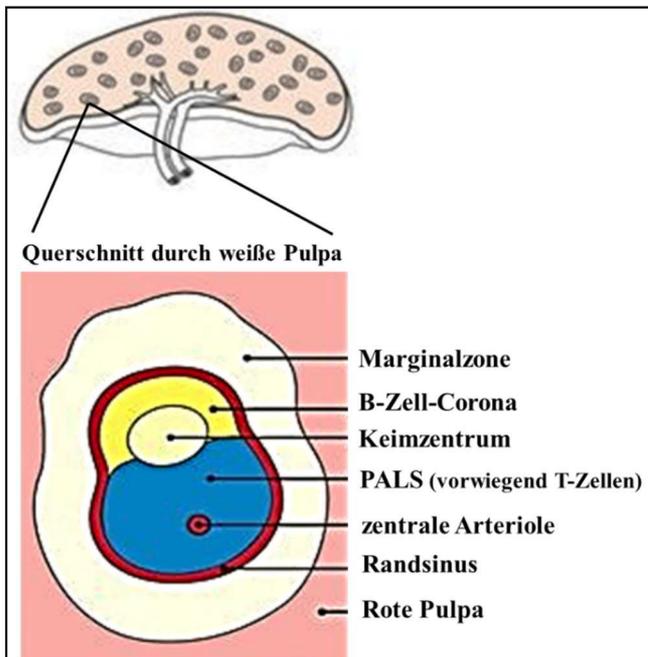


Abb.3 Aufbau der Milz.

Schematische Darstellung der Milz oben mit roter Pulpa (rosa) und Vergrößerung eines Querschnitts der weißen Pulpa. (Verändert nach Janeway, 2002)

1.5 Der Zelltod als ständiger Begleiter im Thymus

Im Immunsystem spielen sowohl der programmierte Zelltod „Apoptose“ als auch der pathologische Zelluntergang „Nekrose“ eine wichtige Rolle. Die Apoptose kann als homöostatischer Prozess zur Konstanthaltung von Zellpopulationen stattfinden oder im Rahmen eines pathologischen Prozesses vorkommen. Die Nekrose ist ein pathologischer Prozess hervorgerufen durch verschiedene Noxen wie Traumata oder Toxine. Die verschiedenen Mechanismen von Zelltod werden in der histopathologischen Untersuchung unterschieden.

Morphologisch sind apoptotische Zellen durch Schrumpfung charakterisiert, ohne die Membranintegrität zu verlieren, während Nekrose durch Kernveränderungen (z.B. Schwellung) und/oder schnellem Verlust der Membranintegrität gekennzeichnet ist. Ein weiteres Unterscheidungskriterium ist, dass der apoptotische Zelltod in den meisten Fällen keine Entzündungsprozesse auslöst, während nekrotischer Zelltod eine Entzündung stimuliert. Dennoch ist es praktisch oft nicht einfach Apoptose und Nekrose zu unterscheiden, und beide Formen des Zelluntergangs können auch parallel vorkommen.

Im Thymus ist der Zelltod ohne Induktion einer Entzündungsantwort oft ein normaler physiologischer Prozess, um nicht-funktionstüchtige T-Zellen während der Entwicklungsphase zu eliminieren (Negativselektion). Die apoptotischen Zellen werden von Makrophagen phagozytiert, die aufgrund ihres hellen Zytoplasmas und der Trümmer phagozytierten Zellmaterials als „*Tingible-body*-Makrophagen“ („Sternhimmelmakrophagen“) bezeichnet werden.

Im gesunden Thymus gibt es eine beachtliche Anzahl von apoptotischen T-Zellen, die nur schwer zu erkennen sind, da nur einzelne Zellen betroffen sind (Elmore, 2007; Rock und Kono, 2008). Eine Hilfe kann die immunhistochemische Färbung der apoptotischen Zellen mit Caspase-3 in einem Thymus-Gewebeschnitt darstellen. Caspase-3 ist ein Enzym, das die Apoptose einleitet. Die Behandlung einer Ratte mit einer immunmodulierenden Substanz kann eine Apoptose von pathologischer Natur im Thymus hervorrufen. Hierbei tritt eine vielfache Anzahl von apoptotischen Lymphozyten im Thymus auf, sodass die „Sternhimmelmakrophagen“ deutlich in der mikroskopischen Untersuchung zu sehen sind.

1.6 Die Bedeutung der Immuntoxikologie

Das Immunsystem ist ein sehr komplexes und fein abgestimmtes System, welches empfindlich gegenüber den Einflüssen von Medikamenten und Chemikalien reagieren kann. Chemikalien und ihre Metaboliten können Organe, Gewebe, Zellen und lösliche Faktoren des Immunsystems exponieren, in dem sie mit Zellmembranen, Rezeptoren oder internen Strukturen reagieren (Koller, 1987).

Seit Dekaden werden adverse Effekte auf die Immunfunktion des Menschen berichtet, sei es durch Chemikalienunfälle oder die Nebenwirkungen von Medikamenten. Folglich gewann die frühzeitige Abschätzung der Immuntoxizität von Substanzen in präklinischen Studien immer mehr an Bedeutung und wurde zu einem relativ neuen Feld in der Entwicklung von humanen Medikamenten. Es wird vermutet, dass etwa zehn Prozent aller adversen Reaktionen von Medikamenten durch eine Immuntoxizität hervorgerufen werden (Bala et al., 2005).

In der Immuntoxikologie werden unerwünschte Nebenwirkungen von Chemikalien (Industriechemikalien, Pflanzenschutzmitteln und Umweltchemikalien) und Medikamenten auf das Immunsystem untersucht (De Waal et al., 1994). Ihr Ziel ist es, eine Veränderung der normalen Struktur und/oder Funktion des Immunsystems zu beschreiben, welche in etablierten immunologischen und toxikologischen Methoden bestimmt wird (Boverhof et al., 2014). Die Testung erfolgt insbesondere im Rahmen toxikologischer Studien an Versuchstieren, welche die mögliche Exposition in Menschen nachahmen, um eine Risikobewertung des toxischen Potenzials von Xenobiotika auf das Immunsystem abzuschätzen (Schuurman et al. 1994). Hierbei ist die Ratte das Versuchsmodell der Wahl, da es standardmäßig in präklinischen Studien verwendet wird.

Immuntoxische Effekte werden im regulatorischen Kontext allgemeinen in zwei Kategorien gefasst: Immunsuppression (Reduktion in der Wirksamkeit oder Aktivierung des Immunsystems, welche zu erhöhter Infektionsanfälligkeit und Tumorbildung führen kann) und Immunstimulation (gesteigerte Immunantwort, die zu *Flu-like-Syndrom*, Allergie und Autoimmunität führen kann).

1.7 Die unterschiedliche regulatorische Betrachtung der immuntoxikologischen Prüfung

Seit den 1980er Jahren haben verschiedene Behörden begonnen, rechtliche Forderungen nach präklinischen Untersuchungen der Immuntoxizität von Chemikalien, Pflanzenschutzmitteln und Arzneimitteln zu entwickeln. Die amerikanische Umweltbehörde US EPA (*Environmental Protection Agency*) war die erste Behörde, die 1982 immuntoxikologische Untersuchungen von Agrochemikalien gefordert hat (Basketter et al., 1993). Heutzutage bestehen unterschiedliche regulatorische Herangehensweisen bei Chemikalien, Pflanzenschutzmitteln und pharmazeutischen Produkten.

Für Pflanzenschutzmittel, die auf den amerikanischen Markt kommen, hat die US EPA im Jahre 1998 eine Richtlinie veröffentlicht, die spezifische Untersuchungen zur Immuntoxizität vorschreibt (OPPTS 870.8700, 2013).

Für immuntoxische Untersuchungen von klassischen Arzneimitteln wurde 2006 die harmonisierte ICH-S8-Richtlinie (2006) der europäischen EM(E)A (*European Medicines Agency*) und amerikanischen FDA (*Food and Drug Administration*) veröffentlicht. Diese ähnelt der EPA-Guideline, wobei der Schwerpunkt stärker auf Subpopulationsanalysen mittels Durchflusszytometrie gesetzt wird, die an Hauptgruppen in Toxizitätsstudien durchgeführt werden können.

Aufgrund der Komplexität des Immunsystems ist ein einziger Immunparameter nicht verlässlich genug, um eine Immuntoxizität vorherzusagen, weshalb eine ganze Testbatterie verwendet wird. Die Regularien folgen im Wesentlichen einen zweistufigen „*tired approach*“ und einer „*weight-of-evidence*“-Strategie in der Immuntoxizitätstestung. Die erste Teststufe beinhaltet ein Screening durch allgemeine Toxizitätstest, das insbesondere immunpathologische und hämatologische Untersuchungen abdeckt. Besitzt die getestete Substanz möglicherweise einen Einfluss auf das Immunsystem, entweder aufgrund der Basistestung oder aufgrund anderer Erkenntnisse, wie z.B. Substanzcharakteristika, werden in nachfolgenden Tests spezifische Untersuchungen durchgeführt, wie z.B. Funktionstests von Immunzellen oder mechanistische Studien (De Jong & Van Loveren, 2007). Für die Auswahl der Tests ist hierbei Expertenwissen von entscheidender Bedeutung.

Für biotechnologisch hergestellte hochmolekulare Wirkstoffe, wie Antikörper und Zytokine, gibt es eine eigene harmonisierte Richtlinie (ICH S6), die seit 1997 besteht. Die ICH S6 schreibt für diese sogenannten *Biologicals* aufgrund heterogener Eigenschaften eine *case-by-case*-Betrachtung vor. Hierfür kommen routinetoxikologische Untersuchungen weniger zur Anwendung.

Für Chemikalien (außer Pflanzenschutzmittel) gibt es derzeit keine eigene Richtlinie. Hier wird in den meisten Fällen die OECD-Richtlinie Nr. 407 (2008) als toxikologische Standardprüfung nach wiederholter Gabe von 28 Tage verwendet, die grundsätzliche Informationen über den Einfluss von Substanzen auf das Immunsystem liefern kann. In dieser Routineprüfung werden Untersuchungen von klinisch-chemischen und hämatologischen Parametern (weiße Blutzellen, Differentialblutbild), Organgewichten (Lymphknoten, Milz, Thymus) und makroskopische/histopathologische Untersuchungen der lymphatischen Organe abgedeckt.

Darüber hinaus bestehen zwischen Chemikalien und Medikamenten weitere Unterschiede in der Risikobewertung durch Expositionsuntersuchungen. Bei Medikamenten sind die therapeutischen Dosen bekannt, eine Risiko-Nutzen-Analyse kann durchgeführt werden und mögliche Effekte können in humanen klinischen Studien durch Einschluss relevanter Parameter gezielt untersucht werden. Im Gegensatz dazu sind in chemischen Regularien die Minimierung oder das Verhindern von humanen Expositionen zielführend, um sicherzustellen, dass Chemikalien kein Risiko für Mensch und Umwelt darstellen (Boverhof, 2014). In manchen Fällen ist es zudem schwer abzuschätzen, welchen Dosen und Expositionsrouten der Mensch tatsächlich ausgesetzt sind.

Allen Richtlinien ist gemeinsam, wie immuntoxische Effekte zu definieren sind. Ein Effekt muss immer im Zusammenhang mit der Gesamtoxizität betrachtet werden. Man spricht erst von einem primär immuntoxischen Effekt einer Substanz, wenn das Immunsystem eines der empfindlichsten Zielorgane ist. Es muss klar gegen nicht-spezifische Effekte des Immunsystems abgegrenzt werden, da diese auch sekundär, z.B. durch Stress, ausgelöst werden können (Harleman, 2006).

Eine Anforderung der Behörden ist die Archivierung und Aufbewahrung von Aufzeichnungen und Materialien aus präklinischen Studien, die in Deutschland in der Regel 15 Jahre beträgt. Diese und weitere Rahmenbedingungen wurden in dem Qualitätssicherungssystem „Die Gute Laborpraxis“ (GLP) festgelegt (OECD, 1999). Die Aufbewahrung von Feuchtmaterial (Organe in Fixans) und Trockenmaterial (eingebettete Organe und Gewebeschnitte) aus der Pathologie geben die Möglichkeit einer späteren erneuten Untersuchung.

Die Archivierung von asserviertem Material kam dieser Arbeit für nachträgliche Untersuchungen von Immunorganen zugute.

1.8 Die histopathologische Untersuchung von lymphatischen Organen als eine Standarduntersuchung zur Ermittlung der Immuntoxikologie

Traditionell sind histopathologische Untersuchungsmethoden der Goldstandard, um den Ort und den Schweregrad eines toxischen Effekts zu identifizieren (Kilty et al., 2007). In einer toxikologischen Standardprüfung werden eine Vielzahl von Organen und Geweben untersucht, um mögliche primäre/sekundäre Wirkungsorte einer Substanz zu bestimmen.

Die Standardtechnik in der Histologie ist die Fixierung von Gewebe in gepuffertem zehnprozentigen Formalin, gefolgt von einer Paraffin-Einbettung und Färbung von Gewebeschnitten mit H&E. Anschließend betrachtet ein Pathologe die Gewebeschnitte unter dem Mikroskop, um mögliche Effekte durch Substanzen in den Organen zu identifizieren.

Die konventionelle Histopathologie des Immunsystems konzentriert sich auf Zellpopulationen, die sich in Größe, Zellmorphologie und Gewebelokalisation verändern können. Mit ihr können z.B. Degenerationen, Atrophien, Apoptosen, Nekrosen, Entzündungen, Hyperplasien und Neoplasien festgestellt werden. Eine genaue Untersuchung des Effekts auf bestimmte Zellpopulationen kann durch immunhistologische Techniken erleichtert werden (Kuper et al, 2013).

Die vergleichende Betrachtung von unterschiedlich dosierten Tieren gegenüber unbehandelten Kontrolltieren wird genutzt, um einen Effekt zu identifizieren und Spontaneffekte oder äußere Einflüsse wie Stress auszuschließen. Man geht von einem Effekt aus, wenn sich die Inzidenz dosiskorreliert gegenüber den Kontrolltieren derselben Untersuchungsreihe verändert. Eine langjährige Erfahrung des Pathologen und die Verwendung von historischen Daten sind für die Befundung von Effekten und die Bestimmung von Schweregraden unabdingbar. Als Qualitätskontrolle des pathologischen Berichts wird oft die Meinung eines zweiten Pathologen herangezogen.

Für die regulatorische Toxikologie ist die histopathologische Untersuchung von lymphatischen Organen die Grundlage zur Identifizierung von Immuneffekten (Kuper et al., 2000). Die Limitierung in der Histopathologie liegt allerdings darin, dass ein Gewebeschnitt einen statischen Zustand zeigt und die Dynamik des Immunsystems nicht wiedergibt (Kuper et al., 2013).

Im Jahr 2005 wurden *Best Practice*-Artikel, zur Untersuchung des Immunsystems in der Routinepathologie veröffentlicht (Haley et al., 2005; Rühl-Fehlert et al., 2005).

Für eine umfassende Untersuchung einer möglicherweise immunmodulatorischen Substanz oder als Teil der abgestuften Immuntoxizitätstestung wurde die sogenannte „*Enhanced Histopathology*“ (EH) eingeführt (*The ICISIS Group Investigators*, 1998; Elmore, 2010). Die EH des Immunsystems ist ein hilfreiches Werkzeug für den Pathologen, um Läsionen an lymphatischen Organen zu ermitteln. Für den Gebrauch der EH gilt es, drei Punkte zu beachten: Erstens besitzt jedes lymphatische Organ separate Kompartimente, die für spezifische Immunfunktionen sorgen. Zweitens sollten diese Kompartimente individuell betrachtet werden. Drittens sollte die Beschreibung von Veränderungen deskriptiv und nicht interpretativ sowie soweit möglich quantifizierend erfolgen. Diese Screening-Methode soll in Verbindung mit weiteren Studiendaten (u.a. klinische Befunde, Körpergewichte, Makroskopie, Gewichte von Milz/Thymus, weitere Organveränderungen), der Wahl von geeigneten Schwerheitsgraden und Färbemethoden, Einbeziehung von Kontrollen und weiteren Faktoren (wie Spontanbefunden, Umwelt, gesamter Gesundheitsstatus, Ernährung, Alter, Geschlecht und Stressbelastung) betrachtet werden. Letztlich soll die EH bei der Beantwortung von Fragen helfen, ob es sich um einen möglichen Effekt auf das Immunsystem handelt, wie und welche Zelltypen betroffen sind und wie der Wirkmechanismus ist (Elmore, 2012). Die Toxikopathologin Elmore hat 2006 mehrere Artikel veröffentlicht, wie die EH in den einzelnen Organen angewendet werden soll (Elmore, 2006a-e). Die EH ist ein wichtiger Bestandteil bei der initialen Evaluierung von immunmodulatorischen Effekten in subakuten (28-Tage) Toxizitätsstudien. Die verwendeten Begrifflichkeiten der EH, um Veränderungen in den lymphatischen Organen zu beschreiben, ist exemplarisch in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Befunde können nach Bedarf um weitere Organe, Kompartimente, Zellpopulationen (z.B. immunhistochemisch dargestellte Subpopulationen), und Effekte (z.B. Ablagerungen, Vorkommen von Fettzellen etc.) ergänzt werden.

Tab.1 Terminologie der *Enhanced Histopathology*. (Verändert aus Kuper et al., 2013)

| Organe | Veränderungen |
|--|---|
| Alle lymphatischen Organe, alle Kompartimente | Erhöhte oder verminderte Größe Erhöhte oder verminderte Zellularität von Zellen (Lymphozyten, Plasmazellen,...) Erhöhte Zahl von Zellen, nicht präsent oder in geringer Zahl: - <i>Tingible body</i> -Makrophagen - phagozytierende oder pigmentierte Makrophagen - Mastzellen - Granulozyten - Apoptotische Zellen - Nekrotische Zellen |
| Thymus | Erhöhtes oder erniedrigtes Verhältnis Kortex : Medulla Effekte auf die Zahl oder Größe der epithelfreien Regionen Erhöhte Menge an Epithelsträngen Anwesenheit von Follikeln/Keimzentren |
| Milz | Erhöhte oder erniedrigte Keimzentrumsentwicklung |

1.9 Knochenmarksuntersuchungen als wichtiger Teil in der Evaluation des hämatopoetischen Systems

Die Untersuchung von hämatologischen Routine-Parametern gehört zu den ersten Tests, um immuntoxische Veränderungen aufzudecken. Hämatopoetische Störungen der weißen Blutzellen (lymphatische und myeloide Zellreihe) schwächen in der Folge das Immunsystem, wenn nicht mehr genügend Immunzellen gebildet werden können. Eine verminderte Anzahl von Immunzellen in den lymphatischen Organen kann durch eine primär hämatotoxische oder immuntoxische Substanz verursacht werden, deren Wirkmechanismus es zu unterscheiden gilt. Eine Hämatotoxizität kann durch den direkten Einfluss der Substanz auf hämatopoetische Vorläufer, oder z.B. auf Zytokinproduktion, Zytokinrezeptoren, Bindungsstellen an Zelloberflächen und/ oder Sekretion ausgelöst werden (Pessina et al., 2001).

Die Wirkung einer Substanz auf die Hämatopoese kann auf verschiedene Weisen im Rahmen einer Toxizitätsstudie untersucht werden. In der Hämatologie wird das periphere Blut der Versuchstiere hinsichtlich seiner einzelnen Bestandteile in einem automatischen Hämatologie-Analysesystem gezählt. Auch wenn der toxische Effekt oft auf dem Level der Stamm- und Vorläuferzellen ansetzt, kann die Untersuchung ihrer Differenzierungsprodukte aus reifen, peripheren Blutzellen hier Aufschlüsse geben. Die Unterscheidung einer primären oder sekundären Hämatotoxizität kann allerdings nur durch eine Knochenmarksuntersuchung festgestellt werden (Rich, 2003; Bollinger, 2004).

In der Pathologie wird die histopathologische Untersuchung des Knochenmarks (i.d.R. ein Teil des Oberschenkelknochen und Brustbein) durchgeführt. Diese erlaubt eine Beurteilung der gesamten hämatopoetischen Zellulärität, wie z.B. eine Einschätzung zum Zellverhältnis von myeloiden und erythroiden Zellen sowie zur Anzahl von Megakaryozyten. Zusätzlich gibt die histopathologische Betrachtung Auskunft über Veränderungen der strukturellen Organisation der hämatopoetischen Umgebung, des Knochens, Fettgewebes und der Vaskularisation. Die Datenerhebung der Blutzählung in Verbindung mit der histologischen Untersuchung wird standardmäßig in den toxikologischen Studien durchgeführt, um den Einfluss der Testsubstanz auf das hämatopoetische System zu erfassen.

In einigen Fällen ist es notwendig, einen Effekt auf die verschiedenen Blutzelllinien weiter zu charakterisieren. Dies kann durch die lichtmikroskopische Betrachtung von gefärbten Abstrichen des Knochenmarks aus dem Oberschenkelknochen und/oder einer durchflusszytometrischen Analyse erfolgen. Welche Methoden zum Einsatz kommen, wird fallabhängig entschieden, kann in der Praxis aber auch von der Expertise und Präferenz des Labors abhängen.

Für die Gesamtbewertung des hämatopoetischen Systems in Nagern ist es wichtig, die histologische Auswertung der Milz einzubeziehen, da die rote Milzpulpa der Ratte ein hämatopoetisches Organ ist (Regan et al., 2011).

Wegen des hohen Arbeitsaufwandes histologischer und zytologischer Untersuchungen besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von automatischen Knochenmarksanalysen (Saad et al., 2000; Tan et al., 2014).

In vitro Methoden könnten ebenfalls zur Vorhersage von potenzieller Hämatotoxizität dienen, um dadurch den Einsatz von Versuchstieren zu reduzieren und spezifische Endpunkte zu untersuchen. Hierbei kann sich die Eigenschaft der hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Koloniebildung (CFU) zu Nutze machen (Pessina et al., 2001; Rich, 2003).

1.10 (Immun)toxische Risikobewertung

Die Risikobewertungen (*risk assessment*) von Chemikalien bezogen auf den Menschen basieren im Wesentlichen auf Daten aus toxikologischen Studien. Dieser Prozess besteht aus den vier Schritten: Gefahrenidentifizierung (*hazard identification*), -beschreibung (*hazard characterization*), Expositionsuntersuchung sowie Risikocharakterisierung (Arakawa, 2014).

Der erste Schritt in der Risikobewertung von Chemikalien und Medikamenten ist die Ermittlung von potenziellen adversen Effekten auf die Gesundheit.

In toxikologischen Studien werden induzierte Effekte im Versuchstier in adverse (gesundheitsgefährdend) oder nicht-adverse Effekte unterschieden.

Eine häufig verwendete Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) besagt: „Adversität ist eine Veränderung in der Morphologie, Physiologie, Wachstum, Entwicklung, Reproduktion oder Lebenserwartung eines Organismus, System oder (Sub)Population, das in einer Beeinträchtigung der funktionellen Eigenschaft, einer Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit zusätzlichen Stress zu kompensieren oder einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber anderen Einflüssen resultiert“ (IPCPS, 2004). Die Betrachtung der Adversität ist die Basis für die Ermittlung von Schwellenwerten, die keine oder eine beginnende Toxizität der Substanz angeben. Hierbei sind insbesondere der NOAEL (*no observed adverse effect level*), die höchste Dosis, bei der keine adverse Veränderung beobachtet wurde und der LOAEL (*lowest observed adverse effect level*), die niedrigste Dosis, die adverse Veränderungen gezeigt hat, zu nennen (Palazzi et al., 2016). Diese quantitative Untersuchung gehört zum zweiten Schritt der Risikobewertung (Gefahrencharakterisierung).

1.11 Die Wirkung von ausgewählten Immunmodulatoren

Ein Mensch kann bewusst im Rahmen einer pharmakologischen Therapie mit Medikamenten oder ungewollt mit chemischen Substanzen in Kontakt kommen, welche das Immunsystem beeinflussen können. Im Falle einer therapeutisch gewollten Beeinflussung des Immunsystems (z.B. durch Immunsuppressiva) ist eine geeignete Dosis zu wählen, die keine oder nur vertretbare toxische Wirkungen hervorruft. Hierfür kann eine Toxizitätsstudie an Tieren erste Anhaltspunkte liefern.

In toxikologischen Tierstudien erkennt der Pathologe während der histopathologischen Untersuchung typische Veränderungen der lymphatischen Organe, die durch eine mindestens dreiwöchige Behandlung mit einer immunmodulierenden Substanz ausgelöst wurden.

Eine gewöhnliche Chemikalie-bedingte Veränderung in den lymphatischen Organen ist der Zelltod von Lymphozyten, der sich in einer erniedrigten Zelldichte äußert.

Der Thymus gilt hierbei als das sensitivste lymphatische Organ, das als erstes mit den Verlust von Thymozyten nach Exposition gegenüber einer immunmodulierenden Substanz reagiert (Kuper et al., 2013). Allerdings ist der Thymus auch sehr empfindlich gegenüber unspezifischen Einflüssen, wie z.B. Stress und kann entsprechend auf verschiedenste Schädigungen des Organismus mit einer Abnahme von Lymphozytenvorstufen reagieren.

Im Folgenden werden fünf ausgewählte immunmodulatorische Substanzen beschrieben, die in dieser Arbeit näher untersucht werden: Zum einen die Medikamente Azathioprin (AZA), Cyclosporin A (CSA) sowie Vertreter der Substanzklasse der Oxazolidinone (OXA). Weiterhin werden die zwei Chemikalien Benzo[a]pyren (BAP) und Hexachlorbenzol (HCB) betrachtet, die als Umweltkontaminanten verbreitet auftreten, aber nicht gezielt produziert werden.

AZA und CSA sind immunsuppressive Pharmazeutika, die auf unterschiedliche Weisen wirken. AZA ist ein *Prodrug*, das seit über 50 Jahren in der Behandlung von bösartigen hämatologischen Tumoren, zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation und bei verschiedenen immunvermittelten Krankheiten eingesetzt wird (Maltzman & Koretzky, 2003, IARC 2012). Es wird nach der Resorption im Körper unter anderem zur Wirksubstanz 6-Mercaptopurin verstoffwechselt, welches ein Purinanalogen ist. 6-Mercaptopurin wird als „falscher Metabolit“ in die replizierenden DNA eingebaut und hemmt die Synthese von Purinnuklotiden (*de novo* Synthese). Dies führt wiederum zu einer Hemmung der Lymphozytenproliferation, da der Purinmetabolismus insbesondere für die Differenzierung der Thymozyten wichtig ist und seine Hemmung zur Apoptose von reifen T-Zellen führt. In hohen Dosen wirkt AZA unselektiv auf die sich teilenden Knochenmarkszellen und damit toxisch auf erythroide und myeloide Zelllinien (Schuurman et al., 1984, Caspritz & Hadden, 1987; Freissmuth et al., 2012, IARC, 2012).

CSA ist ein zyklisches Peptid und stammt aus einem Pilz der Gattung *Tolytlocadium inflatum*. Es wird in der Klinik zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen sowie zur Reduktion von Entzündungsreaktionen in Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis und rheumatoider Arthritis angewendet. Sein Wirkprinzip beruht auf die Inhibition von Calcineurin, einer Proteinphosphatase, die unter anderem in T-Zellen vorkommt. Ihre Hemmung führt zu einer verminderten Expression von Interleukin-2 und weiteren stimulierenden Zytokinen in aktivierten T-Zellen. Die Gabe von CSA führt zu einem selektiven immunsuppressiven Effekt, der insbesondere die zellvermittelte Immunantwort beeinflusst (Ho et al., 1996; Freissmuth et al., 2012). CSA wirkt primär auf die Thymus-Medulla und kann damit die negative Selektion von Thymozyten beeinflussen (Kuper et al., 2000).

Beide Immunsuppressiva sind in immuntoxikologischen Untersuchungen bekannte Modellsubstanzen zur Etablierung neuer Methoden, da ihr Wirkmechanismus sehr gut untersucht ist (De Waal et al., 1995; *The ICISIS Group Investigators*, 1998; Kuper et al., 2000; Schmeits et al., 2014).

Oxazolidinone (OXA) sind gesättigte heterozyklische Verbindungen, die in der Humanmedizin als synthetische Antibiotika zum Einsatz kommen. Ihre antibakterielle Wirkung wird durch die Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese in einer frühen Phase ausgelöst (Diekema & Jones, 2000). In dieser relativ neuen Antibiotikaklasse war Linezolid der erste auf den Markt erhältliche Wirkstoff. Er bekämpft erfolgreich gram-positive Bakterien und wird insbesondere gegen (multi)resistente Keime eingesetzt, die Lungen-, Haut- und Weichteilinfektionen auslösen (Wilcox, 2005). Längere Einnahmen dieses Antibiotikums können bei Patienten zu einer reversiblen Myelosuppression (Unterdrückung der Blutbildung im Knochenmark) führen, die sich klinisch als Erythrozytenabfall (Anämie) und Thrombozytopenie bemerkbar machen. Linezolid ist eines von vielen antimikrobiellen Substanzen, die eine Auswirkung auf das hämatopoetische System haben (Kuter & Tillotson, 2001). Wie Linezolid zeigten auch andere Oxazolidinone in präklinischen Untersuchungen ähnliche immuntoxische Effekte. Einige davon werden in dieser Arbeit näher untersucht.

BAP und HCB sind Umweltchemikalien, die unterschiedliche Wirkungen auf das Immunsystem gezeigt haben.

BAP ist ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff (PAK), dessen Grundgerüst aus fünf Benzolringen besteht und der ausschließlich in Kombination mit weiteren PAKs auftritt. Es ist ubiquitär in der Umwelt zu finden, da es bei natürlichen (Waldbrand) und industriellen Verbrennungsprozessen (Verbrennung fossiler Brennstoffe, Motorenabgase) entsteht. Es gibt keine kommerzielle Verwendung von BAP, die Substanz wird lediglich zu Forschungszwecken produziert. Die menschliche Aufnahme kann durch bestimmte berufliche Tätigkeiten, wie die Arbeit in der Steinkohleindustrie, aber auch durch Luftverschmutzung, Rauchen oder über die Nahrung erfolgen. BAP ist ein Kanzerogen, das als DNA-reaktives Agent beim Tier insbesondere zu Tumoren der Lunge und der Haut führt. Es gibt starke Hinweise, dass die kanzerogene Wirkung auch beim Menschen besteht, die beruflich bedingt verschiedenen PAK-Mischungen ausgesetzt waren. Sowohl Tierstudien als auch epidemiologische Studien am Menschen zeigten ebenfalls in Assoziation mit der BAP-Aufnahme reproduktionstoxische, neurologische und immunologische Effekte (US EPA, 2017). In subchronischen Rattenstudien wurden immuntoxische Effekte von BAP in Form von reduzierten Thymusgewichten und verminderter Zahl an B-Zellen in der Milz berichtet (De Jong et al., 1999; Kroese et al., 2001).

Die Verstoffwechslung von BAP erfolgt über die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen CYP1A1 und CYP1B1 und über die Epoxidhydrolase zu weiteren toxischen Metaboliten (Uno et al., 2005). Da der Mensch gegenüber einer Mischung von PAKs exponiert ist, gibt es keine Studien mit der alleinigen Exposition von BAP, die den Einfluss auf die Immunfunktion beim Menschen untersuchen.

Uno et al. (2005) haben in *Knockout*-Mäusen ermittelt, dass es insbesondere über CYP1B1 zu einer toxischen Aktivierung und damit zu einer schädigenden Wirkung auf das Immunsystem kommt. Außerdem wird angenommen, dass BAP über den Arylhydrokarbon (AH)-Rezeptor auf die Immunzellen wirkt, welcher auf vielen Immunzellen und Vorläuferzellen der Hämatopoese zu finden ist (Hirabashi & Inue, 2009). Bezüglich des toxischen Effekts steht das mögliche kanzerogene Risiko gegenüber etwaigen Effekte auf das Immunsystem im Vordergrund. Kürzlich wurde allerdings auch ein Zusammenhang von BAP zwischen kanzerogenen und immuntoxischen Potenzialen entdeckt (Zaccharia & McClure, 2013).

HCB ist eine chlorierte aromatische Verbindung. Es gehört seit 2001 als eine von 12 extrem toxischen Substanzen zum sogenannten *dirty dozen* („Dreckigen Dutzend“) der Stockholm Konvention, wo es seit 2004 global verboten worden ist (Website der Stockholm Convention). Früher wurde HCB als Fungizid und Saatbeizmittel verwendet. HCB wird heutzutage nur für Forschungszwecke verwendet. Es ist ein Nebenprodukt in verschiedenen Produktionsprozessen von Chlorkohlenwasserstoffen und wird bei der Abfallverbrennung frei. HCB ist ubiquitär vorhanden und ist hauptsächlich im Erdboden, Sediment und Ozean, aber auch in der Luft und im Abwasser zu finden.

Tierstudien mit oraler Verabreichung von HCB zeigten unterschiedliche Spezies- und Stamm-abhängige Effekte, die sich sowohl als Immunsuppression als auch Immunstimulation äußern können (US ATSDR, 2005). Der genaue Wirkmechanismus der immunologischen Effekte von HCB ist unklar. Studien an Ratten haben gezeigt, dass Tetrahydrobenzochinone als Metaboliten des HCB immunmodulatorisch wirken können (Ezendam et al., 2003).

In großen Validierungsstudien, an denen jeweils mehrere Einrichtungen und Labore beteiligt waren, wurde ein Teil der oben genannten Immunmodulatoren als Positivsubstanzen ausführlich untersucht. Das Ziel dieser Ringstudien war es, den Nutzen und die Variabilität von zusätzlichen Tests in toxikologischen Routineuntersuchungen zu bestimmen und zu prüfen, ob die OECD Guideline 407 geeignet ist, Veränderungen am Immunsystem zu detektieren.

Die erste internationale Studie auf Basis der 28-Tage Toxizitätsstudie nach der OECD *Guideline* 407 an Industriechemikalien wurde 1986 initiiert und trug den Namen „ICISIS“ (*International Collaborative Immunotoxicological Studies*). Hier wurden Azathioprin und Cyclosporin A als potente immunsuppressive Substanzen eingesetzt (The ICISIS Group Investigators, 1998; Harleman, 2000; Kuper et al., 2000).

In einer weiteren großen Validierungsstudie, organisiert durch das damalige deutsche Bundesgesundheitsamt BGA, später BGVV (Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) wurde erneut Cyclosporine A als Immunsuppressivum und zusätzlich Hexachlorbenzol als Immunstimulans getestet (Richter-Reichhelm et al. 1995; Harleman, 2000; Vohr & Rühl-Fehlert, 2000; Schulte et al., 2002).

Diese Studien kamen zum Ergebnis, dass histopathologische Untersuchungen eine hohe Bedeutung für die Identifizierung von Effekten der Testsubstanzen auf das Immunsystem haben. Weitere Parameter (Organgewichtsmessung und Untersuchungen von weiteren lymphatischen Organen, semiquantitative Graduierung von Effekten in den Kompartimenten der lymphatischen Gewebe, durchflusszytometrische Untersuchungen von Immunzellen und Funktionstests), die nicht Bestandteil der toxikologischen Standardstudie nach OECD *Guideline* 407 waren, konnten die Immuntoxizität der beiden Substanzen mit hoher Empfindlichkeit detektieren. Insbesondere die Kombination der verschiedenen Methoden erschien erfolgversprechend.

1.12 Die Anwendung von Biomarkern für die Untersuchung von immunmodulatorischer und immuntoxischer Wirkung

Die Erforschung und Validierung von Biologischen Markern (Biomarker) spielt eine zentrale Rolle für präklinische Untersuchungen und Untersuchungen am Menschen, um Effekte bei Tier und Mensch zu detektieren und zu vergleichen.

Biomarker sind nach Hulka et al. (1990) definiert als „zelluläre, biochemische oder molekulare Veränderungen, die in biologischen Medien wie Gewebe, Zellen oder Körperflüssigkeiten messbar sind“. Sie können als Indikatoren von normalen biologischen, pathologischen Prozessen oder pharmakologischen Reaktionen bei einem therapeutischen Eingriff gemessen und bewertet werden (Naylor, 2003).

Es werden hauptsächlich zwei Typen von Biomarkern unterschieden, zum einen Biomarker von Expositionen, die in der Risikovorhersage verwendet werden und zum anderen Biomarker von Krankheiten, welche in Screening, Diagnose und der Überwachung von Krankheitsverläufen genutzt werden (Mayeux, 2004).

In der klinischen Untersuchung des Immunsystems wurden „Immun-Biomarker“ entwickelt, um verschiedene Krankheitstypen nachzuweisen: Krebs, Infektionen, Immundefekte, Allergien und Asthma sowie Autoimmunität (Zhang et al., 2013).

In der Toxikologie werden Biomarker hinsichtlich Exposition, Effekt und Empfindlichkeit klassifiziert. Die Entwicklung von Biomarkern in der Immuntoxikologie ist aufgrund der Komplexität des Immunsystems eine Herausforderung. Die Bestimmung von beispielsweise Oberflächenmarkern, Antikörpern und Zytokinen sind übliche Immunmarker, um den Immunstatus zu untersuchen und können im Gesamtblut, Serum oder Plasma von einer Vielzahl an Methoden nachgewiesen werden. Die Durchflusszytometrie ist hierbei eine leistungsstarke Technik für quantitative Einzelzellanalysen von Oberflächenmarkern und intrazellulären Antigenen, die auch in Hochdurchsatz-Screening verwendet wird (Duramad und Holland, 2011).

Kilty et al. (2007) definierten einige Charakteristika für optimale Biomarker. Diese Charakteristika treffen insbesondere auch für das Gebiet der Immuntoxikologie zu: optimale Biomarker zeigen Veränderungen in definierten Geweben und Organen, zeigen schnelle Veränderungen der Konzentration in gut zugänglichen Körperflüssigkeiten bei Schädigung des Organismus, haben einen geringen gleichmäßigen Spiegel in der Abwesenheit eines Effekts, sind zwischen verschiedenen experimentellen Modellen und Spezies übertragbar, sind mit spezifischen Methoden messbar und sind leicht automatisierbar.

Das Ziel der immuntoxikologischen Biomarker-Forschung ist es, in verschiedenen biologischen Proben in kürzester Zeit die größtmöglichen Informationen über das Immunsystem zu erhalten.

1.13 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen neue Biomarker im Rahmen von subakuten oralen Toxizitätsstudien in Ratten etabliert werden, die Nebenwirkungen von immunmodulierenden Substanzen auf das Immunsystem aufzeigen können. Damit soll eine Optimierung der Auswertung von Untersuchungen zur Immuntoxizität nach den internationalen Richtlinien erreicht werden.

Als erstes sollen immunhistochemische Biomarker in lymphatischen Organen an archiviertem Studienmaterial von bis zu über 20 Jahre alten subakuten Toxizitätsstudien an Ratten angewendet werden. In diesen Studien wurden bekannte immunmodulatorische Substanzen getestet: Die Immunsuppressiva Azathioprin und Cyclosporin A, Entwicklungssubstanzen aus der Antibiotikagruppe der Oxazolidinone und die zwei Umweltchemikalien Benzo[a]pyren und Hexachlorbenzol. Die angewendeten immunhistochemischen Färbungen werden routinemäßig nicht durchgeführt, weshalb sie im Vergleich zu der Routinefärbung Hämatoxylin-Eosin (H&E) evaluiert werden sollen. Zusätzlich soll die neuartige Technik der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie an alten Gewebeschnitten mit den Ergebnissen mittels konventioneller Lichtmikroskopie am H&E-Schnitt verglichen werden. Eine weitere Fragestellung ist hier, ob diese Techniken und Biomarker einen tieferen Einblick in den Wirkmechanismus dieser immuntoxischen Stoffen liefern können.

In einem zweiten Schritt sollen die gewonnenen Erfahrungen in einer neu geplanten subakuten oralen Toxizitätsstudie mit CSA und AZA angewandt werden. Neben den Routineprüfungen zur Immuntoxizität sollen in dieser Tierstudie neue immunologische *state-of-the-art* Methoden validiert werden. Interessant sind hierbei insbesondere Biomarker für den Nachweis hämatotoxischer Effekte, da die bestehenden Standardprüfungen zeitintensiv sind und ein enormes Expertenwissen erfordern. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Knochenmarksuntersuchungen (automatisch, manuell zytologisch und *in vitro*) soll ebenfalls im Rahmen dieser Studie durchgeführt werden.

Letztlich sollen die etablierten immuntoxischen Biomarker nicht nur zusätzliche Informationen liefern, sondern auch Grundlagen liefern, um durch optimiertere Ergebnisse die Zahlen der eingesetzten Versuchstiere zu reduzieren oder z. T. ganz zu ersetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Wistar-Ratte, Stamm RccHan:WIST, Harlan Laboratories (Horst, Niederlande)

2.1.2 Zellen

Primäre humane CD34⁺-Zellen (Knochenmark), Stemcell Technologies (Köln, Deutschland)

2.1.3 Substanzen, Chemikalien und Reagenzien

Die meisten Standardchemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Weitere Substanzen werden im folgendem aufgeführt:

Antibody Diluent, Zytomed Systems (Berlin, Deutschland)

Azathioprin, ≥ 98 %, CAS-Nr. 446-86-6, Sigma-Aldrich

Benzo(a)pyren, ≥ 96 %, CAS-Nr. 50-32-8, Sigma-Aldrich

Citrat Buffer (100x), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Coulter®Isoton II Diluent, Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)

Cyclosporin A, 99 + %, CAS-Nr. 59865-13-3, Alfa Aeser (Ward Hill, USA)

DAB Substrate Kit (Brown), Zytomed Systems

EDTA Buffer (100 x) pH 8, Thermo Fisher Scientific

Eindeckmittel Tissue-Tek® Glas Mounting Medium, Sakura Finetek
(AV Alphen aan Den Rijn, Niederlande)

ELISA Blocking/Coating Buffer, Stop/Wash Solution, Bethyl Laboratories
(Montgomery, USA)

FACSFlow TM , Becton Dickinson

Fast Enzyme Solution, Zytomed Systems

Formalin 10 %, neutral gepuffert, CAS-Nr. 50-00-0, Sigma-Aldrich

Goat serum, Art.Nr. G9023, Sigma-Aldrich

Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS) 1x + Ca/Mg (steril), Gibco ® Life Technologies
(Carlsbad, USA)

Hexachlorobenzol, ≤ 100 %, CAS-Nr. 118-74-1, Sigma-Aldrich

Hydrogen Peroxide Block, Thermo Fisher Scientific

Isocove's Modified Dulbecco's Medium mit 2 % Fetal Bovine Serum, Stemcell Technologies
May-Grünwald Lösung, Sigma-Aldrich
MethoCult® Medium H4434 Classic und GF R3774 Classic, Stemcell Technologies
Meyers Hämlaunlösung, Merck (Darmstadt, Deutschland)
Negativ-Kontroll-Serum (Maus, Rabbit), BioGenex (Hamburg, Deutschland)
O.C.T.TM Compound (Eindeckmedium für Kryogewebe), Sakura Finetek
Phosphat-gepufferte Saline (PBS, 5x) mit EDTA, Alfa Aesar
ProLong® Gold Antifade Reagent, Life Technologies
Proteinase K, Dako (Glostrup, Dänemark)
Puffertabletten nach Weise pH 7,2 , Merck
Waschpuffer SuperSensitive (20x), BioGenex
Xylol (Gemisch aus o-, m-, p-Xylol), CAS-Nr. 95-47-6, 108-38-3, 106-42-3, Azelis
(Sankt Augustin, Deutschland)
ZAP-OGLOBIN®, Beckman Coulter (Brea, USA)

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

96-Napf-Mikrotiterplatte Cellstar®, Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Cryomold® Intermediate 15 x 15 x 5 mm, Sakura Finetek
Deckel für Einbettkassette, Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Eisenroth, Deutschland)
Deckgläser 24x50 mm Stärke 1 , Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Einbettkassetten und Deckel, Kabe Labortechnik
Einmalkanülen Fine-Ject® 0,9x40 mm und 1,60x40 mm, Henke Sass Wolf
(Tuttlingen, Deutschland)
Einweg-Filtereinheiten 200 µm, Becton Dickinson
Einweg-Injektionsspritze Luer-Lok® 3 ml, Becton Dickinson
Filterpapier, Whatman (Maidstone, UK)
Kulturschalen 35 mm, Stemcell Technologies
Metallsiebe steril, grobmaschig, interne Herstellung
Mikrotommesser, Feather (Osaka, Japan)
Nadel mit stumpfem Ende (Blunt-End Needles) Stärke 16, Stemcell Technologies
Objekträger Menzel-Gläser SuperFrost, 76x26 mm geschliffen 90°, Thermo Fisher Scientific
Pap-Pen, BioGenex
Petrischalen 150x15 mm Falcon®, Becton Dickinson
Petrischalen (steril) Easy Grip® 60x15 mm, Becton Dickinson

Pipettenspitzen epT.I.P.S. ® diverse Größen, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polystyrene Tubes Falcon® Round-Bottom Polystyrene Tubes 14 ml, Becton Dickinson
Probengefäß 1,3 ml K3E, Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße 1,5 ml , 2 ml, Eppendorf
RL-Pen, R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Röhrchen für Durchflusszytometrie (FACS Röhrchen) 5 ml, Sarstedt
Spritzen mit Luer-Lock Fassung 3cc, Stemcell Technologies
Stempel von 5ml Einwegspritzen Omnifix ®, B Braun (Melsungen, Deutschland)
Tissue-Tek ® mega-Cassette, Sakura Finetek
Transferpette steril, Sarstedt
Transferpipetten 3,5 ml, Sarstedt
Zellfilter Fisherbrand® 70 µm steril, Thermo Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen (steril) 50 ml Corning®, Sigma-Aldrich

2.1.5 Laborgeräte

Advia ® 2120i Hämatologie-System, Siemens (Erlangen, Deutschland)
Axio Scan.Z1, Zeiss (Jena, Deutschland)
Blutbild-Differenziergerät Counter AC-15 Assistent, Hecht
(Sondheim v.d.Rhön, Deutschland)
Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂ und > 95 % Luftfeuchtigkeit) HERAcell® 150 Heraeus,
Thermo Fisher Scientific
Brutschrank Kelvitron Heraeus B6060, Thermo Fisher Scientific
Coulter Counter Multisizer 3, Beckmann Coulter (Brea, USA)
Dampfkochtopf Sicomatic t-plus, Silit (Riedlingen, Deutschland)
Einbettstation Tissue-Tek TEC, TEC 5 EM E-2, Sakura Finetek
Eindeckautomat Tissue-Tek Glas, Glas g2-E2, Sakura Finetek
Eismaschine ZBE 150, Ziegra (Isernhagen, Deutschland)
Entwässerungsautomat Tissue-Tek VIP, VIP 6-E2 , Sakura Finetek
FACSCanto II, Becton Dickinson
Färbeautomat Cellstain 6, Tharmac (Waldsolms, Deutschland)
Färbeküvetten, Thermo Fisher Scientific
Handzählgerät, Baumer (Friedberg, Deutschland)
Invert-Mikroskop, Axiovert25, Zeiss
Kassetten-Drucker VCP 90, Vogel (Gießen, Deutschland)
Knochenschere, Aesculap

Kryostat CM3050, Leica (Wetzlar, Deutschland)
Kühlplatte PEC 2001, Tespa (Gießen, Deutschland)
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 700 (Laser: 405, 488, 555, 639 nm), Zeiss
Mikroskop Axioskop, Zeiss
Mikroskop DMRB, Seriennummer 172140, Leica
Neubauer-Zählkammer, Brand (Wertheim, Deutschland)
Objektive: Plan-Apochromat 5x/0,16 M27, Plan-Apochromat 10x/0,45 M27 DICII,
EC Plan-Neofluar 20x/0,50 M27, EC Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil DIC M27, Zeiss
Objektträger-Drucker VSP-3001, Vogel
Pipetten 10 µl, 100µl, 1000µl, 2500µl, Eppendorf
Präparierbesteck, Aesculp (Tuttlingen, Deutschland)
Reagenzglas-Schüttler REAX 2000, Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Rotationsmikrotom Art.Nr. RM2255, Leica
Scanner Mirax Scan, Carl Zeiss Microscopy GmbH
Skalpellklingen steril, Otto Rütgers (Solingen, Deutschland)
Absorbance Microplate Reader EL808, BIO-TEK Instruments (Winooski, USA)
Waage, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad, Enno Vieth (Wiesmoor, Deutschland)
Wässerungskasten, Eigenbau
Zentrifuge 5415R, Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Multifuge 4KR, Thermo Fisher Scientific
Zytoclip Cytoclip® Slide Clip, Thermo Fisher Scientific
Zytofunnel Shandon Double Cytofunnel, Thermo Fisher Scientific
Zytozentrifuge Cytospin 4, Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Software

BD FACSDiva Software Version 6.1.3 (build 2009), Firmware Version 1.47
(BD FACSCanto II), Becton Dickinson
GraphPad Prism 6 für Windows, Version 6.0.Luli 17, 2012, GraphPad Software
(La Jolla, USA)
MIRAX Viewer, Version 1,12,22,0, Carl Zeiss MicroImaging GmbH Developed by
3D HISTECH
Zen 2 (blue edition) Version 2.0, Zeiss
Zen 2011 SP3 (black edition), Version 8.1, Zeiss
Zen 2012 (blue edition), Version 6.1.7601 Service Pack 1 Build 7601, Zeiss

2.1.7 Lösungen

Citrat-Ameisensäure: 5,25 l Lewatitwasser, 680 g tri-Natriumcitrat-dihydrat, 1,75 l, 90 %ige Ameisensäure

Gepuffertes Lewatitwasser: Eine Puffertablette auf ein l Lewatitwasser (pH 7,2)

Giemsa Lösung: 15 ml Azur-Eosin-Methylenblaulösung mit 200 ml gepuffertem Lewatitwasser verdünnen

LDS-Verdünnung 1:10 in Methanol

May-Grünwald-Lösung: Eosin-Methylenblaulösung filtriert

Waschpuffer FACS: PBS + 0,02 % Natriumazid

2.1.8 Antikörper

Alexa Fluor® 488 anti-rat CD3, BioLegend (San Diego, USA)

Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ Fragment of Goat Anti-Mouse IgG (H + L), Goat Anti-rabbit IgG (H + L), Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse, Life Technologies

Caspase-3 (cleaved) rabbit polyclonal, Zytomed Systems

Caspase-3 anti-active + pro, CD79a mouse monoclonal, Abcam (Cambridge, UK)

CD3 rabbit polyclonal, Dako

CD4, Novus Biologicals (Minneapolis, USA)

CD3 PE CD4 FITC, CD45 FITC, CD45RA PE, CD45RC PE, CD5 PE, CD71 PE, CD8a

FITC Mouse Anti-Rat (G4.18, OX-1, OX-33, OX-35, OX-22, OX-19, OX-26, OX-8),

Becton Dickinson

CD68, CD8 alpha mouse monoclonal, Bio-Rad Abd Serotec (Puchheim, Deutschland)

Cytokeratin, pan (mixture) mouse monoclonal, Sigma-Aldrich

IgG1 FITC Mouse und IgG2a PE Mouse, κ Isotyp-Kontrollen, Becton Dickinson

LDS 751, Life Technologies

MHC Class II RT1Bu/I:FITC Mouse Anti-rat (OX-3), Bio-Rad Abd Serotec

2.1.9 Kits

Peroxidase (Myeloperoxidase) Leukocyte Kit, DAB substrate kit, Sigma-Aldrich

Rat IgA/IgG/IgM ELISA Quantification Set, Bethyl Laboratories

Vectastain ABC Kit Mouse IgG/ Rabbit IgG, Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Etablierung von immunhistochemischen Biomarker in lymphatischen Organen

2.2.1.1 Vorbemerkungen für die Anwendung der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine immunologische Technik, die von Albert H. Coons entwickelt und im Jahr 1941 veröffentlicht wurde (Coons et al., 1941). Seitdem wurde sie stetig weiter entwickelt und ist bis heute eine bewährte Methode in der Diagnostik und Forschung, um mithilfe spezifischer Antikörper Antigene in Gewebeschnitten nachzuweisen.

In der Immunhistochemie wird grundsätzlich zwischen direkter und indirekter Färbemethode unterschieden. In der direkten Variante ist das Enzym direkt an dem Primärantikörper gekoppelt. Dies ist eine schnelle und einfache Methode, jedoch für die heutigen Anwendungen nicht sensitiv genug. In dieser Arbeit wurde die sogenannte ABC (*Avidin-Biotin-Complex*)-Methode als modifizierte indirekte Methode verwendet. Hier besteht die praktische Reihenfolge der Reagenzien aus Primärantikörper, biotinylierten Sekundärantikörper gefolgt von einem (Strept)Avidin (Hühnereiweiß)-Biotin (Vitamin) - Enzym-Komplex. Als Substrat für das Enzym (hier Meerettich-Peroxidase) dient DAB, das nach der Reaktion als braunes Präzipitat in der Lichtmikroskopie zu sehen ist. Im Anschluss erfolgt zur Kontrastierung eine Gegenfärbung mit dem Farbstoff Hämalaun (Ramos-Vara, 2005).

Für einen guten Erhalt der Antigene im Gewebe ist es wichtig, dass eine schonende Fixierung mit Formalin stattfindet, um die Autolyse des Gewebes zu verhindern. Die Fixierung kann jedoch eine Veränderung der Tertiärstruktur der Proteine auslösen und somit die Bindung des Antikörpers an das Antigen erschweren (Hayat, 2002). Eine Lösung stellt der zusätzliche Schritt der „Antigen-Demaskierung“ dar, die die nachfolgende Quervernetzung durch Paraffin auflöst und das Antigen zugänglich macht. Grundsätzlich werden enzymatische (z.B. Proteinase K) und thermische (z.B. über Dampftopf, Mikrowelle, Wasserbad) Demaskierungs-Methoden unterschieden (Battifora et al., 1986; Jacobsen, 1980), die beide angewandt wurden.

Bei der Auswahl von Antikörper können monoklonale oder polyklonale Antikörper gewählt werden. Monoklonale Antikörper stammen von einem Klon einer einzigen Plasmazelle ab, d.h. alle Antikörpermoleküle besitzen denselben Isotyp. Ihre Vorteile sind eine hohe Homogenität, Spezifität und zudem haben sie keine Chargenvariabilität.

Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen Zellen hergestellt und reagieren mit verschiedenen Bindungsstellen (Epitopen) auf dem Antigen gegen das sie gerichtet sind. Diese Antikörper besitzen eine höhere Sensitivität zum Antigen, aber es besteht die Gefahr der Kreuzreaktion, wenn unterschiedliche Epitope erkannt werden (Harboe et al., 1983; Boenisch, 1999).

In dieser Arbeit wurde sich bei der Auswahl von Antikörper insbesondere an deren Verfügbarkeit orientiert, da wenige Anti-Ratten Antikörper für diese Anwendung zu erwerben sind.

Die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Bindung wird durch die Kopplung von verschiedenen Molekülen ermöglicht. Die Antikörper können mit Fluorochromen für die Durchführung einer Immunfluoreszenz-Färbung oder klassischerweise mit Enzymen konjugiert werden (Luttmann, 2009). Das Enzym (z.B. Alkalische Phosphatase, Peroxidase) bindet an einem Sekundärantikörper und geht mit einem Substrat bzw. Chromogen (z.B. DAB) einen Komplex ein, um einen Farbstoff zu bilden (Ramos-Vara, 2005). In dieser Arbeit wurden sowohl Chromogene als auch Fluorochrome verwendet.

2.2.1.2 Archivierte Studien als histologisches Material

In dieser Arbeit wurden acht archivierte toxikologische Standardstudien mit ausgewählten Substanzen der Bayer AG (Forschungszentrum Aprath, Wuppertal) zum Gegenstand dieser Untersuchung. Das archivierte Studienmaterial (fixierte Organe und Gewebeblöcke) wurde für die nachträgliche immunhistochemische Färbung und histologische Auswertung wiederverwendet (Tab.2).

Da die Studien zwischen 1993 und 2012 durchgeführt wurden, sind die Sektionen der Tiere, das Blocken der paraffinierten Gewebeproben sowie das Anfertigen von Schnitten für die H&E-Färbungen von Mitarbeitern der Bayer AG vorgenommen worden. Dies erfolgte nach den gegenwärtigen Standard der Pathologie.

Die Schnitte von den meisten Studien mussten für die Arbeit nachgeschnitten und mit H&E gefärbt werden, da die lange Lagerung zu Artefakten geführt hatte.

Tab.2 Studienübersicht von archivierten Toxizitätsstudien für die (Immun-) Histologische Auswertung.

| Substanz | Dosen [mg/kg] | Geschlecht | Anzahl Tiere Pro Dosis und Geschlecht | Sektionsdatum | Fixierungs- dauer |
|------------------------|---------------------|------------|---|---------------|----------------------|
| Azathioprin | 0 - 5 - 10 - 20 | ♂ | 6 | 05.2012 | 1 Woche |
| Benzo(a)pyren | 0 - 37,5 - 75 - 150 | ♂ | 5 | 05.2010 | 3 Wochen |
| Cyclosporin A | 0 - 1 - 5 - 25 | ♂, ♀ | 10 | 02.1993 | 1 Monat |
| Hexachlorbenzol | 0 - 3 - 30 - 100 | ♂, ♀ | 10 | 07.1997 | 2 Monate |
| Oxazolidinon 1 | 0 - 25 - 75 - 225 | ♂, ♀ | 5 | 04.1995 | 3 Wochen |
| Oxazolidinon 2 | 0 - 25 - 75 - 225 | ♂, ♀ | 5 | 11.1996 | 3 Wochen |
| Oxazolidinon 3 | 0 - 75 - 225 - 500 | ♂, ♀ | 5 | 12.1995 | 2 Monate |
| Oxazolidinon 4 | 0 - 25 - 75 - 225 | ♂, ♀ | 5 | 02.1996 | 2 Wochen |

2.2.1.3 Gewebeaufarbeitungen von lymphatischen Organen

Die Gewebeaufarbeitung in einer pathologischen Untersuchung beinhaltet die Entnahme, die Konservierung und die Lagerung des Untersuchungsmaterials. Für eine histologische Untersuchung ist die Erhaltung der morphologischen Struktur der Zellen bzw. des Gewebes von besonderer Bedeutung. Hierbei können verschiedene Möglichkeiten der Fixation und Gewebearbeitung, wie Einbettung und Dekalzifizierung für Knochen sowie besonderen Bearbeitungstechniken, wie Gefrierschnitte und Ausstriche, bedient werden.

Routinemäßig wurde Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes (*formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE) Gewebe für die histologische Untersuchung verwendet. Nach der Entnahme wurden die Organe in eine zehn prozentige Formalin-Lösung zur Fixierung eingelegt. Um bestmögliche Ergebnisse in der immunhistochemischen Färbung zu erhalten, wurden die Organe vollständig von Formalin bedeckt und 24 - 48 Stunden darin gelagert. Die Organe wurden im Anschluss in ca. 4 mm große Stücke zugeschnitten und in Kapseln gelegt.

Mit folgenden Arbeitsschritten wurde anschließend in einem Vakuum-Infiltrations-Prozessor über Nacht entwässert: Erstens, 70, 80, 90 % Alkohol bei 35 °C für je 1:15 Std. Zweitens, viermal 100 % Alkohol bei RT für je 1:10 Std. Drittens, dreimal Xylol für je 35 °, 40 ° und 45 °C für je eine Std und viermal Paraffin (einmal 62 °C bei 45 min, drei mal 60 °C je eine Std). Zur vollständigen Einbettung der Gewebestücke wurde in speziellen Formen an Einbettstationen Paraffin über das Gewebe gegossen und auf einer Kühlplatte gehärtet.

2.2.1.4 Herstellung von Paraffinschnitten

Mithilfe eines Rotationsmikrotoms wurden von den auf - 8 °C gekühlten Paraffinblöcken 4 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden zur Streckung in ein warmes Wasserbad (42 - 45 °C) gebracht und auf Adhäsions-Objektträgern aufgezogen. Die Trocknung und weitere Streckung der Schnitte erfolgte über Nacht im Wärmeschrank bei 42 °C. Die Zwischenlagerung erfolgte luftdicht verpackt bei Raumtemperatur.

2.2.1.5 Herstellung von Gefrierschnitten

Die gefrorenen Gewebeblöcke wurden an einen Kryostaten (Leica CM3050, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) bei - 20 °C in 10 µm dünne Schnitte geschnitten und auf Adhäsions-Objektträgern übertragen. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Gefrierschnitte bei - 20 °C gelagert werden.

2.2.1.6 Übersichten über verwendete Primärantikörper in der Immunhistochemie

Die Antikörperwahl beruht auf Erfahrungen, auf Angaben aus der Fachliteratur sowie Verfügbarkeit und Funktionsfähigkeit.

Die Tabelle 3 stellt Informationen über die verwendeten Antikörper, die für eine Färbung nach der ABC-Methode verwendet wurden, bereit.

Tab.3 Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern für die ABC-Methode.

| Antigen/ Primärantikörper | Klon | Isotyp | Klonalität | Wirt | Zielzellen |
|------------------------------|---|--------------------|------------|--------|-----------------------|
| Caspase-3 | unbekannt | IgG | polyklonal | Rabbit | Apoptotische Zellen |
| CD3 | unbekannt | Nicht angegeben | polyklonal | Rabbit | T-Zellen |
| CD8 | OX-8 | IgG1 | monoklonal | Mouse | Zytotoxische T-Zellen |
| CD68 | ED1 | IgG1 | monoklonal | Mouse | Makrophagen |
| CD79 | HM47/A9 | IgG1 | monoklonal | Mouse | B-Zellen |
| Zytokeratin | C-11, PCK-26, CY-90, KS-1A3, M20, A53-B/A2 (Mix) | IgG1, IgG2a | monoklonal | Mouse | Epithelzellen |

In der Anwendung der Immunfluoreszenz-Färbung konnten ein Teil der Antikörper (CD8, CD68, CD79 und Zytokeratin), die in der ABC-Methode verwendet wurden (Tab.3), ebenfalls genutzt werden. Zusätzlich verwendete Antikörper, die nur in der Immunfluoreszenz-Färbung angewendet wurden, sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tab.4 Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern für die Fluoreszenz.

| Antigen/ Primärantikörper | Klon | Isotyp | Klonalität | Wirt | Zielzellen |
|------------------------------|--------------------|--------|------------|--------|------------------------|
| Caspase-3 | Nicht angegeben | IgG | polyklonal | Rabbit | Apoptotische Zellen |
| Alexa Fluor ® 488 CD3 | 1F4 | IgM | monoclonal | Mouse | T-Zellen |
| CD4 | Nicht angegeben | IgG | polyklonal | Rabbit | T-Helfer-Zellen |

2.2.2 Etablierung der immunhistochemischen Färbeprotokolle

Zur Testung der verwendeten Antikörper wurden zunächst Paraffinschnitte von Kontrollblöcken unbehandelter Ratten verwendet, die Milz, Thymus und mesenteriale Lymphknoten einer Ratte enthielten, um damit die Spezifität der Bindung an das zu untersuchende Antigen nachzuweisen. Hierfür wurden Antikörper verschiedener Hersteller und verschiedener Klone verglichen, um eine optimale Darstellung der Zielantigene zu erreichen. Jeder Antikörper wurde für die beiden Färbemethoden (ABC-Methode, Immunfluoreszenz), mit verschiedenen Antigen-Demaskierungs-Methoden, in verschiedenen Konzentrationen (1:50 – 1:1000) und mit verschiedenen Inkubationszeiten (30 min bis über Nacht) getestet. Die genaue Antigen-Demaskierungs-Methode und Verdünnung bzw. Inkubationszeit des Primärantikörpers werden hier nicht genannt, da sie bei jeder Studie und jedem Antikörper unterschiedlich waren. Dies ist durch die Lagerungszeit und die nicht-optimale Fixierung des archivierten Materials geschuldet.

Bei jeder Färbung wurden eine positive Kontrolle, deren Gewebe bekanntlich das nachzuweisende Antigen exprimiert, und eine Negativkontrolle, um die Spezifität der Sekundärantikörper und des Detektionssystems zu testen, mitgeführt.

Bei Antikörpern, die aus der Maus oder den Kaninchen stammen, wurden die jeweiligen ABC-Kits verwendet (Vectastain® ABC Kit Mouse IgG oder Rabbit IgG).

Für die Erarbeitung der Färbeprotokolle an Gefrierschnitten mussten insbesondere die Trocknungs- und Fixierungszeiten ausgetestet werden, um optimale Ergebnisse zu erhalten.

Der Ablauf der histologischen Arbeitsschritte bis zur IHC-Färbung und die verwendeten Medien, in die das Gewebe inkubiert wurde, sind in einem Fließdiagramm (Abb. 4) vereinfacht dargestellt.

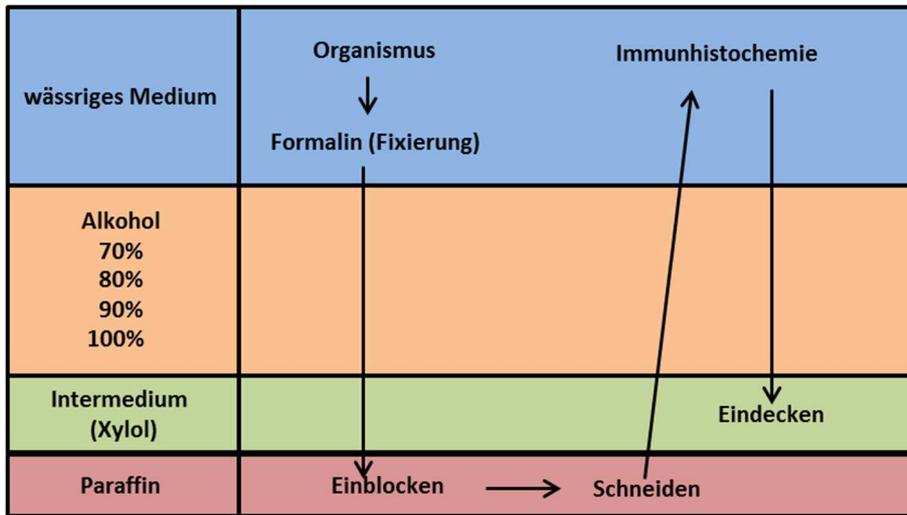


Abb.4 Ablauf der histologischen Arbeitsschritte.

2.2.2.1 Färbeprotokoll für die immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode an Paraffinschnitten

1. Deparaffinieren der Schnitte in Xylol 3x3 min
2. Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe:
 - a. 100 % Ethanol: Erstens Kammer kurz spülen, Zweitens Kammer 1 min
 - b. 90 % Ethanol: Erstens Kammer kurz spülen, Zweitens Kammer 1 min
 - c. 80 % Ethanol: Erstens Kammer kurz spülen, Zweitens Kammer 1 min
 - d. 70 % Ethanol: Erstens Kammer kurz spülen, Zweitens Kammer 1 min
 - e. Lewatitwasser
3. Vorbehandlung mit thermischer Antigen-Demaskierung: Im Dampfkochtopf mit Citratpuffer (pH 6) oder EDTA-Puffer (pH 8) (beide Thermo Fisher Scientific) sechs min kochen, 15 min abkühlen und spülen mit Waschpuffer (BioGenex) 5 min
4. Blockieren der endogenen Peroxidasen mit gebrauchsfertigem *Hydrogen Peroxide Block* (Thermo Fisher Scientific) 15 min
5. Spülen mit Waschpuffer 5 min
6. Blockieren der unspezifischen Bindungen mit Normalserum (Vectastain ABC-Kit) 20 min
7. Inkubation mit dem Primärantikörper [Verdünnung in *Antibody Diluent* (Zytomed Systems); 100 µl/Schnitt] bei verschiedene Inkubationszeiten bei Raumtemperatur
8. Spülen mit Waschpuffer 5 min
9. Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (100 µl/Schnitt) 30 min bei Raumtemperatur (Vectastain ABC-Kit)
10. Spülen mit Waschpuffer 5 min
11. Inkubation mit Vectastain ABC Reagent, das Avidin und biotinylierte Horseradish Peroxidase enthält (Vectastain ABC-Kit) 30 Min bei Raumtemperatur

12. Spülen mit Waschlösung 5 min
13. Visualisierung mit DAB 5 bis 10 min bis zur gewünschten Farbintensität
14. Spülen mit Waschlösung 5 min
15. Inkubieren der Schnitte in fließendem Leitungswasser mindestens 10 min
16. Gegenfärben der Zellkerne mit Meyer's Hämalun 30 – 40 sek
17. Bläuen in fließendem Leitungswasser 10 min
18. Entwässern der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol:
 - a. 70 % Ethanol 30 sek
 - b. 80 % Ethanol 30 sek
 - c. 90 % Ethanol 30 sek
 - d. 100 % Ethanol 30 sek
 - e. 100 % Ethanol 30 sek
 - f. Xylol 30 sek
 - g. Xylol 30 sek
19. Eindecken der Schnitte mit in Xylol-löslichen Eindeckmedium im Eindeckautomaten

2.2.2.2 Färbeprotokoll für die Fluoreszenz-Färbung an Paraffinschnitten

1. Deparaffinieren der Schnitte in Xylol 3x3 min
2. Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe:
 - a. 100 % Ethanol: Erstens Kammer kurz spülen, Zweitens Kammer 1 min
 - b. 90 % Ethanol: Erstens Kammer kurz spülen, Zweitens Kammer 1 min
 - c. 80 % Ethanol: Erstens Kammer kurz spülen, Zweitens Kammer 1 min
 - d. 70 % Ethanol: Erstens Kammer kurz spülen, Zweitens Kammer 1 min
 - e. Leitungswasser
3. Vorbehandlung zur Antigen-Demaskierung:
 - a. Hitzevorbehandlung im Dampfkochtopf mit Citratpuffer (pH 6) oder EDTA-Puffer (pH 8) 6 min kochen, 15 min abkühlen und spülen mit Waschlösung (BioGenex) 5 min
 - b. oder enzymatische Vorbehandlung mit *Fast Enzyme* (Zytomed Systems), 10 min bei Raumtemperatur und spülen mit Waschlösung 5 min
4. Blockieren der endogenen Peroxidasen in gebrauchsfertigen *Hydrogen Peroxide Block* (Thermo Fisher Scientific) 15 min
5. Spülen mit Waschlösung 5 min
6. Blockieren der unspezifischen Bindungen mit 5 % *goat serum* (Sigma-Aldrich) 30 min
7. Inkubation mit dem Primärantikörper [Verdünnung in *Antibody Diluent* (Zytomed Systems); 100 µl/Schnitt] verschiedene Inkubationszeiten bei Raumtemperatur
8. Spülen mit Waschlösung 5 min
9. Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200 in Waschlösung, 100 µl/Schnitt) 1 Std bei Raumtemperatur
(Ab hier werden die Schnitte lichtgeschützt)
10. Spülen mit Waschlösung 5 min
11. Kernfärbung mit Diamino-Phenylindol (DAPI), Verdünnung 1:1000 in Waschlösung 10 min

12. Spülen mit Waschpuffer 5 min
13. Eindecken der Schnitte mit speziellen Eindeckmedium (*ProLong Gold*, Life Technologies) für eine langhaltbare Fluoreszenzfärbung
14. Nach 24 Std luftdichte Versiegelung des Deckglases mit herkömmlichen Nagellack und Trocknung

2.2.2.3 Färbeprotokoll für die Fluoreszenz-Färbung an Gefrierschnitten

1. Trocknen der Gefrierschnitte über Nacht bei Raumtemperatur
2. Fixieren in eiskalten Aceton 10 min und warten bis zur Verdampfung für mindestens 20 min unter Abzug
3. Spülen mit Waschpuffer 5 min
4. Blockieren der endogenen Peroxidasen in gebrauchsfertigen *Hydrogen Peroxide Block* (Thermo Scientific) 15 min
5. Spülen mit Waschpuffer 5 min
6. Blockieren der unspezifischen Bindungen mit 5 % *goat serum* (Sigma-Aldrich) 30 min
7. Inkubation mit dem Primärantikörper [Verdünnung in *Antibody Diluent* (Zytomed Systems); 100 µl/Schnitt] verschiedene Inkubationszeiten bei Raumtemperatur
8. Spülen mit Waschpuffer 5 min
9. Inkubation mit dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200 in Waschpuffer, 100 µl/Schnitt) eine Std bei Raumtemperatur (Ab hier werden die Schnitte lichtgeschützt)
10. Spülen mit Waschpuffer 5 min
11. Kernfärbung mit DAPI, Verdünnung 1:1000 in Waschpuffer 10 min
12. Spülen mit Leitungswasser mindestens 5 min
13. Eindecken der Schnitte mit speziellen Eindeckmedium für eine langhaltbare Fluoreszenzfärbung (*ProLong Gold*, Life Technologies)
14. Nach 24 h luftdichte Versiegelung des Deckglases mit herkömmlichen Nagellack und Trocknung

2.2.3 Beurteilung der immunhistochemisch-gefärbten (ABC-Methode) Gewebeschnitte

Die eingedeckten Schnitte wurden an einem Lichtmikroskop (Leica) betrachtet und hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Färbung beurteilt. Zunächst wurde die Intensität der immunhistochemischen Färbung, die sich in eine braune Farbe durch die Zugabe des Chromogens DAB äußert, beurteilt. War das Farbergebnis nicht wie gewünscht, wurden bestimmte Schritte (z.B. Antikörperkonzentration, -inkubation) im Protokoll geändert bis die geeignete Farbintensität erreicht war. War die Färbung zu schwach, konnte dies an unzureichender Antikörper-Menge, DAB oder zu kurzer Inkubationszeit liegen. Der Einsatz zu hoher Antikörperkonzentration kann im Gegensatz falsch-positive Bindungen des Antikörpers hervorrufen.

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte zusätzlich anhand morphologischer Merkmale wie die Lokalisation der Zellen in den lymphatischen Organen, um zu überprüfen, ob es sich bei den markierten Zellen um die Zielzellen handelt. Hierbei wurde sich an den Angaben in der Literatur, dem Antikörper-Datenblatt des Herstellers und insbesondere an den der eigenen Erfahrung bzw. die der Pathologen orientiert.

2.2.4 Analyse der lymphatischen Organe mithilfe der konfokalen

Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe des konfokalen Laser-Raster Mikroskops LSM 700 von Zeiss (engl. *laser scanning microscope*, LSM) können hochauflösende Bilder von fluoreszierenden biologischen Proben (hier Gewebeschnitte von lymphatischen Organen) erreicht werden.

Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie, in der die Transformation vom Objekt zum Bild für alle Objektpunkte gleichzeitig parallel erfolgt, wird in einem konfokalen LSM die Probe punktweise bestrahlt. Dies bedeutet, dass die serielle Bestrahlung die physikalische Wechselwirkung in Form von Fluoreszenz, die das Laserlicht in der gerade bestrahlten Objektstelle hervorruft, auslöst und punktweise gemessen wird. Mit einem konfokalen LSM ist es somit möglich, aus dicken Proben bis 100 µm eine dünne Präparatschicht optisch abzubilden („optischer Schnitt“). Bei Mehrfachfärbungen kann eine simultane Aufnahme und Darstellung der einzelnen Laserkanäle (405, 488, 555, 639 nm) ermöglicht werden.

Für die Analyse der Färbung an lymphatischen Organen wurden die Objektive für eine 20 bis 40 fache Vergrößerung verwendet.

Die Bedienung des Gerätes erfolgte in Anlehnung an das Bedienungshandbuch von Zeiss.

2.2.5 Durchführung einer subakuten, oralen Toxizitätsstudie an Ratten

Eine orale 28-Tage Toxizitätsstudie mit wiederholter Exposition in weiblichen Wistar-Ratten wurde nach den Richtlinien der OECD Test-Guideline Nr. 407 (2008) und der EMA *Guideline on Repeat Dose Toxicity* (2010) durchgeführt. Die Testsubstanzen Cyclosporin A und Azathioprin wurden in verschiedenen Dosierungen, wie in der Tabelle 5 beschrieben, oral per Schlundsonde (*gavage*) verabreicht. Die Kontrollgruppe (Dosisgruppe 1) erhielt Olivenöl als Vehikel.

Tab.5 Dosierungsgruppen der subakuten oralen Toxizitätsstudie.

| Dosisgruppe | Substanz | Dosen [mg/kg] | Geschlecht | Anzahl Tiere |
|-------------|---------------|---------------|------------|--------------|
| 1 | Cyclosporin A | 0 | ♀ | 10 |
| 2 | Cyclosporin A | 1 | ♀ | 10 |
| 3 | Cyclosporin A | 5 | ♀ | 10 |
| 4 | Cyclosporin A | 25 | ♀ | 10 |
| 5 | Azathioprin | 20 | ♀ | 10 |

Die geforderten Untersuchungsmethoden beinhalten insbesondere klinische Beobachtung der Tiere, Körpergewichtsbestimmung, Organgewichtsbestimmung, hämatologische und klinisch-biochemische Serumuntersuchung, makroskopische Pathologie und Histopathologie. Zusätzlich wurden unabhängig der Guidelines weitere Untersuchungen des Immunsystems und hämatopoetischen Systems durchgeführt, die sich in das Standardprotokoll einbauen ließen.

2.2.5.1 Allgemeine Informationen zu den Versuchstieren und Haltungsbedingungen

Weibliche Wistar-Ratten (Harlan Laboratories BV) vom Stamm RccHan:WIST waren zum Studienstart sieben bis acht Wochen alt und wogen 160 – 200 g.

Ihr Stamm wurde gewählt, da er einer von den international empfohlenen Ratenspezies in toxikologischen Studien ist und viele Hintergrunddaten für diese Spezies zur Verfügung stehen. Nach der Lieferung der Ratten erfolgte eine einwöchige Akklimatisierungsphase.

Die Ratten wurden in Gruppen von zwei bis drei Tieren pro Käfig gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %. Die Ratten hatten eine Lichtperiode von 12 Std inklusive Musikbeschallung und eine Dunkelperiode von 12 Std. Das Futter und Wasser wurden *ad libitum* verabreicht. Zur Bereicherung des Lebensumfeldes bekamen die Ratten einen Holzblock zum Nagen.

2.2.5.2 Toxikologische Standarduntersuchungen

Die Erhebung von Daten zu Körper-, Organgewichten, Blutuntersuchungen, Mortalitäten, klinischen Befunden, makroskopischen Organuntersuchungen und zur Histopathologie gehört zu den Standardprüfungen in toxikologischen Studien. Die Standarduntersuchungen wurden von erfahrenen Personal aus der Abteilung für Toxikologie der Bayer Pharma AG in Wuppertal durchgeführt.

Die Messung von Körpergewichten wurde täglich zur gleichen Uhrzeit an jedem Tier durchgeführt.

Klinische Befunde wie Verhalten der Tiere oder äußerliche Auffälligkeiten wurden täglich dokumentiert. Ebenso wurden Mortalitäten festgehalten.

Nach der Sektion wurden die terminalen Organgewichte ausgesuchter Organe gemessen und in Relation zum Körpergewicht berechnet.

Am Sektionstag wurde das Serum (retrobulbäre Blutentnahme) der Tiere für die Messung von Standard-Blutparametern, wie in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt, entnommen.

Tab.6 Liste von Parametern für Hämatologie und Blutgerinnung.

| Rote Blutparameter | Blutgerinnung | Weißer Blutparameter |
|---|------------------------------|-----------------------------|
| Erythrozyten | Thrombozyten | Leukozyten gesamt |
| Hämoglobin | Thromboplastinzeit | Differentialblutbild |
| Hämatokrit | Partielle Thromboplastinzeit | Neutrophile |
| Mittleres korpuskuläres Hämoglobin | Fibrinogen | Basophile |
| Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration | | Eosinophile, |
| Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen | | Lymphozyten |
| Retikulozyten | | Monozyten |
| | | atypische Zellen |

Tab.7 Liste von Parametern für Klinische Chemie.

| Enzyme | Substrate | Elektrolyte |
|----------------------------|------------------|------------------------|
| Alanin-Aminotransferase | Glukose | Chlorid |
| Aspartat-Aminotransferase | Cholesterin | Calcium |
| Alkalische Phosphatase | Triglyzerin | Inorganisches Phosphat |
| Glutamat-Dehydrogenase | Kreatin | Kalium, |
| Laktat-Dehydrogenase | Urea | Natrium |
| Gamma-Glutamyl-Transferase | Bilirubin | Magnesium |
| Kreatinkinase | Gesamtprotein | |
| | Albumin | |

Während der Sektion wurden die Organe makroskopisch auf Anomalitäten, wie z.B. veränderte Größe oder Farbveränderung, untersucht. Danach folgte die histopathologische Untersuchung von relevanten Organen.

Die Gewebeaufarbeitung bis zur immunhistochemischen Färbung der lymphatischen Organe erfolgte wie unter 2.2.1.3, 2.2.1.4, 2.2.2.1, 2.2.3 beschrieben.

Es wurden die gleichen Primärantikörper wie unter 2.2.1.6 für die Färbung nach der ABC-Methode verwendet.

Da bei dieser Toxizitätsstudie optimal fixiertes (48 Stunden) und frisches Material vorlag, wie bei einer gewöhnlich durchgeführten Toxizitätsstudie, war die Testung der Bedingungen für die Primärantikörper weniger aufwendig wie für die archivierten Studien. Einen Überblick über die praktische Verwendung der Primärantikörper gibt die Tabelle 8 wieder.

Tab.8 Informationen zur Verwendung der Antikörper in der subakuten oralen Toxizitätsstudie.

| Primärantikörper | Vorbehandlungsmethode | Verdünnung | Inkubationszeit |
|-------------------------|------------------------------|-------------------|------------------------|
| CD3 | | 1:300 | 1 h |
| CD8 | | 1:300 | 40 min |
| CD68 | Dampfkochtopf, | 1:500 | 30 min |
| CD79 | Citrat-Puffer | 1:500 | 40 min |
| Caspase-3 | | 1:100 | 1 Std |
| Zytokeratin | | 1:1000 | 1 Std |

2.2.5.3 Immuntoxikologische Untersuchungsmethoden

2.2.5.3.1 Immunglobulin-Bestimmung im Serum

Für die Konzentrationsbestimmung der Immunglobuline (Ig) IgA, IgG und IgM im Serum wurden die *ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Quantification Kits* von Bethyl Laboratories verwendet. Die Werte wurden mithilfe eines Plattenlesegerätes (*Absorbance Microplate Reader EL808, BIO-TEK Instruments*) ermittelt, der die optische Dichte (Delta OD, *optical density*) von Lösungen in einer 96-Well Mikrotiterplatte misst.

Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

Pro Tier wurde eine Dreifachmessung der Delta OD 450 durchgeführt, aus der ein Mittelwert und später die Konzentration des Ig im Serum berechnet wurde.

2.2.5.3.2 Subpopulationsanalyse von Immunzellen der Milz und mesenterialen

Lymphknoten

Für die Markierung relevanter Subpopulationen wurden vier Doppelfärbungen durchgeführt: CD45RC/CD4, CD45RA/MHCII, CD5/CD8 und CD3/CD8.

Als erstes wurden ein Drittel der Milz (Endstück) und drei große hintereinander folgende mesenteriale Lymphknoten in mit BSS-Lösung vorgefüllten Zentrifugenröhrchen gegeben, die bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert werden.

Aus zeitlichen Gründen wurden die Milzorganstücke nicht am Sektionstag aufgearbeitet, sondern einen Tag später. Bis dahin wurden die Milzen in BSS-gefüllten Zentrifugenröhrchen auf Eis bei 4°C aufbewahrt.

Vor der Aufarbeitung der Lymphknoten wurden diese mithilfe zweier Pinzetten weitestgehend von Fettanteilen präpariert. Zur Aufarbeitung eines Organstücks wurde dieses samt der im Röhrchen befindlichen BSS-Lösung in ein Metallsieb dekantiert, das sich in einer Petrischale befindet. Mit dem Stempel einer 5 ml-Einwegspritze wurde das Organ vollständig zerrieben, nur bei der Milz bleibt ein heller Geweberest (Bindegewebe) im Sieb zurück. Anschließend wurde die Suspension mit einer Pasteurpipette in der Petrischale einige Male suspendiert. Die aus der Petrischale entnommene Zellsuspension wurde über eine Einweg-Filtereinheit (200 µm) gefiltert, die sich auf einem zweiten Röhrchen befindet. Zuletzt wurden das Sieb und die Petrischale erneut mit BSS-Lösung gespült, um alle restlichen Zellen zu gewinnen. Diese Zellen wurden ebenfalls in das zweite Röhrchen überführt, das mit BSS-Lösung aufgefüllt war. Die aufgefüllten Röhrchen werden nun 10 min bei 300g/min und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in den Röhrchen vorsichtig dekantiert, *ad* 10 ml bei Milz und *ad* 5 ml bei Lymphknoten mit BSS-Lösung aufgefüllt und das Zellpellet gründlich resuspendiert.

Anschließend erfolgte die manuelle Zellzahlbestimmung an lebenden Zellen mithilfe von Trypanblau und der Neubauer-Zählkammer. Ein Aliquot der resuspendierten Zellsuspension wird mit Trypanblau (1:10 Verdünnung mit PBS) versetzt. Die toten Zellen wurden dadurch blau angefärbt und die Zahl der lebenden Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Hierbei wurde mindestens ein Großquadrat zur Zählung ausgewertet, wobei mindestens 100 Zellen aus statistischen Gründen gezählt werden sollten. Die Zellzahl wurde bei der verwendeten Verdünnung mit Trypanblau für ein Großquadrat folgendermaßen berechnet: $\text{Zellzahl} \cdot 10^5$ Zellen pro ml.

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Röhrchen mit einer vorher berechneten Menge an BSS-Lösung aufgefüllt, sodass eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml in jedem Röhrchen erreicht war. Aus der Zellsuspension wurden 1×10^6 Zellen in jedes FACS-Röhrchen verteilt und mit 2 ml Waschpuffer (PBS-Acid) gewaschen (10 min Zentrifugation bei 300 g, 4 °C). Der Waschpuffer wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit in vorher verdünnter und in Vorversuchen austitrierter Antikörperlösung (200 µl) resuspendiert. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper inklusive Verdünnung ist in der Tabelle 9 dargestellt.

Die Röhrchen wurden aufgeschüttelt und für mindestens 15 min im Kühlschrank inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Proben zweimal gewaschen und mit 2 ml PBS-Acid aufgefüllt (10 min Zentrifugation bei 300 g, 4 °C). Die FACS-Probenröhrchen wurden vorsichtig dekantiert und mit 500 µl Füllflüssigkeit (FACSflow) aufgefüllt. Damit waren die Proben zur Aufnahme im Durchflusszytometer bereit.

Tab.9 Verwendete Antikörper für die Subpopulationsanalyse von Milz- und Lymphknotenzellen.

| Antikörper | Zielzellen | Verdünnung in Färbepuffer |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| FITC-CD4 | T-Helferzellen | 1:200 |
| FITC-CD8a | Zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen | 1:400 |
| PE-CD5 | Periphere T-Zellen | 1:100 |
| FITC-MHC Class II RT1Bu/l | Antigen-präsentierende Zellen | 1:100 |
| PE-CD45RA | B-Zellen | 1:200 |
| PE-CD3 | T-Zellen | 1:200 |
| PE-CD45RC | Leukozyten | 1:200 |

Die quantitative Bestimmung der Oberflächenmerkmale der Milz und Lymphknoten erfolgt am FACSCanto II mithilfe der Software FACSDiva.

Für die Messung wurde eine bestimmte Anzahl von „Events“ eingestellt, die bei den Lymphknotenzellen 15.000 und bei den Milzzellen 30.000 Zellen betrug.

2.2.6 PCA-Analyse und *Heatmap-Darstellung*

Ausgewählte Effekte der klinischen Chemie, Hämatologie, Organ- /Körpergewichte und Histopathologie wurden mit einer *Principal Component Analysis* (PCA) analysiert. Hierfür wurde das Programm *GeneData* verwendet.

Da die Ergebnisse aus kontinuierlichen (Klinischen Chemie, Hämatologie und Organ-/Körpergewichte) und kategorischen (Histologie, Angabe in Graden) Daten bestanden, wurden die Daten in Excel standardisiert, um ähnliche Werte-Bereiche zu erhalten. Die Standardisierung (Z-Transformation) wurde folgendermaßen berechnet:

Wert (Einzeltier) – Mittelwert der jeweiligen Parametergruppe

Standardabweichung der jeweiligen Parametergruppe (n-1-Methode)

2.2.7 Untersuchungen des hämatopoetischen Systems

Im Folgenden wird die Durchführung von verschiedenen Untersuchungsmethoden des hämatopoetischen Systems beschrieben.

2.2.7.1 Anfertigung und Färbung von Knochenmarksaustriechen

In der Regel wird zur histologischen Beurteilung ein Oberschenkelknochen (*Femur*) für Knochenmarksaustrieche verwendet, da dieser der längste Röhrenknochen ist und somit die meisten Knochenmarkszellen enthält. Die Knochenmarksaustrieche wurden aus logistischen Gründen vom rechten Oberarmknochen (*Humerus*) hergestellt. Hierbei wurde das Ende des *Humerus* in eine Kanülenspitze (1,60 x 40 mm) eingeführt und das Mark durch einen kurzen kräftigen Stempeldruck auf einen gereinigten OT ausgeblasen. Die Markflüssigkeit wurde mit einem weiteren Objektträger wellenförmig ausgestrichen. Danach erfolgte eine Trocknung von mindestens 4 Stunden und eine Fixierung in Methanol für 10 sek. Nach einer kurzen Lufttrocknung wurden die Austrieche in Kästen bei 4 °C bis zur Färbung aufbewahrt.

Es wurden zwei Knochenmarksaustrieche pro Tier angefertigt, die jeweils mit May-Grünwald oder Myeloperoxidase gefärbt wurden.

Für die Durchführung der May-Grünwald-Färbung wurden die luftgetrockneten Austrieche wie in der Tabelle 10 beschrieben behandelt.

Tab.10 Protokoll May-Grünwald-Färbung von Knochenmarksaustriechen.

| Methodenschritt | Zeitangabe |
|--|-----------------------|
| 1. May-Grünwald-Lösung | 3-5 min |
| 2. Abspülen im gepufferten Lewatitwasser | 2x Kurz |
| 3. Giemsa-Lösung | 15-18 min |
| 4. Abspülen im gepufferten Lewatitwasser | Kurz |
| 5. Färbeständer abtropfen lassen, trocknen | 6 Std oder über Nacht |
| 6. Eindeckung der OTs | - |

Die Durchführung der Peroxidase-Färbung wurde mithilfe des Peroxidase (Myeloperoxidase) Kit (Sigma Aldrich) nach Herstellerangaben bis zum Schritt - Kupfernitratlösung - durchgeführt. Danach wurden die Objektträger in gepufferten Lewatitwasser abgespült, luftgetrocknet und eine May-Grünwald-Färbung (wie oben beschrieben) als Gegenfärbung durchgeführt.

2.2.7.2 Aufarbeitung von *Femur* und *Sternum* für die H&E Diagnostik

Die zu entkalkenden Knochenstücke wurden zunächst in Formalin fixiert und anschließend in Tissue Tek III Kapseln ca. eine halbe bis eine Std gewässert. Die Entkalkung der Knochen erfolgte mit Citrat-Ameisensäure bei Raumtemperatur für eine bestimmte Zeit, abhängig von Tierart und Alter der Spezies. Nach dem Entkalken wurden die Knochen ca. 16 Std gewässert, in 70 % Ethanol gegeben und wie gewöhnlich weiterverarbeitet (Entwässerung, Paraffineinbettung).

2.2.7.3 Subpopulations-Analysen von Knochenmarkszellen mittels FACS

Die Durchführung der FACS-Analyse von Knochenmarkszellen wurde in Anlehnung an eine Veröffentlichung (Saad, et al., 2000) etabliert.

Es wurde je Knochen (*Femur*) ca. 1,5 cm des Mittelteils zur Zellzahlbestimmung verwendet, nachdem anhängenden Muskelreste entfernt wurden. Anschließend wurde mit einer mit BSS-Lösung gefüllten Spritze das Knochenmark herausgespült. Das Knochenstück wurde solange durchgespült bis dieses nicht mehr rot erschien, sodass das Knocheninnere vom rötlichen Mark gereinigt wurde. Die Knochenmarkszellen wurden anschließend in der Petrischale mithilfe einer Kanülenspitze gründlich suspendiert. Dies diente der Beseitigung grober Zellklumpen und musste vorsichtig durchgeführt, um die Zellen nicht zu zerstören. Danach wurde nochmals mithilfe einer Pasteurpipette eine möglichst homogene Zellsuspension hergestellt. Die nun erhaltene Zellsuspension wurde über eine Einweg-Filtereinheit gegeben, welche in ein Zentrifugenröhrchen gestellt wurde. Hierdurch wurde eine Abtrennung von Geweberesten und Knochensplintern erreicht. Danach wurde die Petrischale mit BSS-Lösung durchgespült und die restliche Suspension ebenfalls wie zuvor filtriert. Die Röhrchen wurden nun *ad* 10 ml mit BSS-Lösung aufgefüllt. Vor der Zellzählung wurden die Probenröhrchen nochmals geschüttelt, eventuell entstandene Sedimente aufgewirbelt und die Röhrchen ca. 30 sec. abgestellt, damit feste Bestandteile, wie z.B. kleinere Knochensplinter, sedimentieren konnten. Für die Zellzahlbestimmung wurde mit einem Dispenser 20 ml ISOTON II-Lösung in ein 20 ml Probengefäß (Accuvette) vorgelegt, sodass sich durch Zugabe von 40 µl Zellsuspension eine Verdünnung von 1:500 ergab. Vor der EDV gestützten Messung am Coulter-Beckmann Multisizer 3-Zellzählgerät wurden jeder Messprobe drei Tropfen ZAP-O-GLOBIN (Beckmann Coulter) zugegeben, um die Erythrozyten zu lysieren, die die Messung beeinträchtigen. Nach ca. 2 min Inkubation mit dem Lyse-Puffer wurden die Proben zügig gemessen.

Für die nachfolgende Dreifach-Färbung der Knochenmarkszellen wurden Antikörper wie in der Tabelle 11 beschrieben, verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte für die FACS-Färbung sind in der Tabelle 12 aufgezählt.

Tab.11 Verwendete Antikörper für die Subpopulationsanalyse von Knochenmarkszellen.

| Antikörper | Zielzellen |
|--------------------------|---|
| PE Mouse Anti-Rat CD71 | Erythroide Vorläuferzellen (Transferrin-Rezeptor) |
| FITC Mouse Anti-Rat CD45 | Leukozyten (<i>Leukocyte Common Antigen</i>) |
| LDS 751 | Doppelstrang-DNS |

Tab.12 Protokoll FACS-Färbung von Knochenmarkszellen.

| Methodenschritt | Inkubationszeit |
|---|--|
| 1. Einstellung der Zellzahl auf 1×10^6 Zellen pro FACS-Röhrchen | |
| 2. Zugabe von 2ml PBS + 0,02 Na-Acid, vortexen, zentrifugieren | Zentrifugation bei 160 g, 4 °C, 10 min |
| 3. Überstand verwerfen | |
| 4. Zugabe von 5 µl FITC (CD45) + 10 µl PE (CD71) in jedes Röhrchen und vortexen | 20 min bei Dunkelheit und 4 °C |
| 5. Waschen mit 2 ml PBS + 0,02 Na-Acid, vortexen und zentrifugieren | Zentrifugation bei 1200 rpm, 4 °C, 5 min |
| 6. Überstand verwerfen | |
| 7. Zugabe von 400 µl PBS + 0,02 Na-Acid und 20 µl LDS (1mg/ml Methanol) | 30 min bei Dunkelheit, 4 °C |
| 8. Waschen mit 2 ml PBS + 0,02 Na-Acid, vortexen und zentrifugieren | Zentrifugation bei 1200 rpm, 4 °C, 5 min |
| 9. Überstand verwerfen | |
| 10. Zugabe von 400 µl FACS-Flow, vortexen und am FACSCanto messen | |

2.2.7.4 CFU-Tests mit humanen CD34-Zellen bzw. *ex-vivo* mit Knochenmarkszellen aus der Ratte

Der CFU-Test wurde zum einen mit humanen CD34-Zellen und zum anderen *ex vivo* mit Knochenmarkszellen aus der Ratte (subakute Studie, Abschnitt 2.2.5) durchgeführt.

Präparation der humanen CD34⁺-Knochenmarkszellen

Die humanen CD34⁺-Zellen wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und unter der Sterilbank mit einer Eppendorf-Pipette vorsichtig in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Das Cryo-Röhrchen, in dem die Zellen gelagert wurden, wurde einige Male mit je 1 ml IMDM-Medium ausgespült. Dieses Medium wurde ebenfalls in das Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde auf 10 ml mit IMDM-Medium aufgefüllt und für 10 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig mit einer Einweg Transfer-Pipette abgenommen und das Zellpellet wird in 2 ml frischen IMDM-Medium vorsichtig resuspendiert.

Kultivierung der hämatopoetischen Stammzellen für den CFU-Assay mit Ratten-Knochenmarkszellen

Für den CFU-Assay wurden die restlichen Zellen aus dem Femurknochen verwendet, die, wie unter 2.2.7.3 beschrieben, gewonnen und verarbeitet wurden.

Durchführung des CFU-Assays

Die Substanzen AZA, BAP, CSA und HCB wurden hinsichtlich ihrer hämatotoxischen Eigenschaften auf humanen CD34⁺-Zellen miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die aus der Ratte stammenden Knochenmarkszellen aus der *in vivo* Studie in diesem Test verwendet, um die hämatotoxischen Eigenschaften von AZA und CSA *ex vivo* zu untersuchen.

Das benötigte voraliquotierte MethoCult™-Medium wurde über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Die gewünschte Zellzahl von $1,5 \times 10^4$ /ml (Human) und 1×10^6 /ml (Ratte) in der Zellsuspension wurde auf die MethoCult™-Röhrchen verteilt. Hierbei wurde eine Dreifachbestimmung angesetzt, die jeweils aus 0,4 ml Zellsuspension zu 4 ml MethoCult™ besteht. Die Röhrchen wurden gut vermischt und für mindestens fünf min stehen gelassen, um eventuelle Luftblasen an die Oberfläche steigen zu lassen.

Das semisoliden Wachstumsmedium MethoCult™, in dem die Zellen kultiviert wurden, war eine gebrauchsfertige Mischung aus angereichertem IMDM mit einigen rekombinanten Zytokinen (SCF, GM-CSF und IL-3) und Methylcellulose, das den hämatopoetischen Vorläuferzellen die optimalen Wachstums- und Differenzierungsbedingungen bot. Durch die halbfeste Konsistenz konnten die Zellen in Kolonien wachsen und fielen bei der kleinsten Vibration nicht auseinander.

Die Zytokine ermöglichten das Wachstum von myeloiden und erythroiden Kolonien, letztere allerdings nur bis zum primitiven BFU-E-Stadium. Für die *ex vivo* gewonnenen Rattenzellen wurde das MethoCult™ R3774 verwendet, für Humanzellen das MethoCult™ H4434.

Das MethoCult™ H4434 enthielt als Besonderheit Erythropoetin (EPO), sodass erythroide Kolonien über das primitive BFU-E-Stadium hinaus wachsen konnten.

Die Substanzen, die in dem humanen CFU-Assay eingesetzt wurden, wurden mit dem Lösungsmittel DMSO vorverdünnt (50 mg/ml). Deshalb wurde die Medium-Kontrolle mit 0,2 % DMSO in IMDM hergestellt. In einem Vorversuch (Screening) wurden die Substanzkonzentrationen 1, 10, 100, 1000, 10.000 und 100.000 ng/ml in IMDM-Medium inklusive 22 % DMSO getestet. In dem Hauptexperiment wurden die Konzentrationen 1000, 3000, 10.000, 30.000 und 100.000 ng/ml pro Substanz und Schale eingesetzt. Zusätzlich wurde für AZA, BAP und HCB 300 ng/ml und für BAP 30 und 100 ng/ml angesetzt. Das Ziel war es die geeigneten Konzentration zu wählen, um später die Schwellenwerte IC₅₀- bzw. IC₉₀- und NOAEL zu berechnen.

Als Positivkontrolle wurde Topotecan in den Konzentrationen 5 und 10 ng/ml verwendet.

Bei dem *ex vivo* CFU-Assay an Ratten wurde als Positivkontrolle Topotecan in den Konzentrationen 8 und 35 ng/ml pro Schale eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Medium-Kontrolle getestet. Für beide Kontrollen wurden Triplikate angesetzt aus denen ein Mittelwert berechnet wurde.

Als nächstes erfolgte die Ausplattierung jeder Probe mit der gewünschten Menge Substanz auf drei kleinen Petrischalen (35 mm). Dies erfolgte mithilfe von drei ml Spritzen, die mit *Blunt-End*-Kanülen (Stärke 16) versehen waren. Je 1,1 ml der Probe wurden vorsichtig mittig auf eine Petrischale gegeben, ohne dass die Spitze den Boden berührte. Unter langsamen kreisenden Bewegungen des Schälchens wurde die Probe auf dem gesamten Boden bis hin zum Rand aufgetragen und mit einem Deckel verschlossen.

Die drei zusammengehörenden Petrischalen der Triplikate wurden in eine größere Petrischale (150 mm) gestellt. Zusätzlich wurde eine vierte geöffnete kleine Petrischale beige gestellt, die steril filtriertes Wasser zur Feuchtigkeitssättigung enthält. Die belegten großen Petrischalen wurden mit einem Deckel verschlossen und inkubierten bei 37 °C, 5 % CO₂ und ≥ 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Die Inkubationszeit ist abhängig von der Art der eingesetzten Zellen und betrug für die humanen Zellen zwölf Tage und für die Rattenzellen acht Tage.

Eine vereinfachte Darstellung zum Ablauf des CFU-Assays ist in der Abbildung 5 zu sehen.

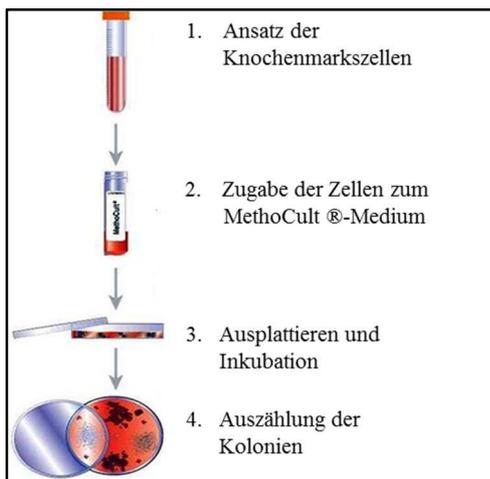


Abb.5 Ablauf des CFU (*colony-forming unit*)-Assay. (Abbildung verändert aus www.stemcell.com)

Zählkriterien für humanen Kolonien

In dem humanen CFU-Assay konnte nur ein kleiner Teil der Kolonien, die normalerweise während der Hämatopoese im Knochenmark entstehen, betrachtet werden (siehe Abb.6).

Bei der Auswertung der humanen Kolonien konnte zwischen CFU- und BFU (*burst-forming unit*)-Kolonien unterschieden werden. CFU-Kolonien haben eine diffuse, zellstreuende Morphologie. Im Gegensatz dazu sind BFU-Kolonien kompakt, rötlich gefärbt und bestehen aus mehreren klar zu erkennenden runden Clustern. Diese bilden die frühen Stadien der erythroiden Zelllinie. Eine genaue Differenzierung in CFU-G oder CFU-M war aufgrund der technischen Ausstattung nicht möglich. Die *multi-lineage*-Kolonie CFU-GEMM wurde nicht gezählt, da sie selten vorkommt und häufig mit einer CFU-GM und BFU-E verwechselt werden kann, die meistens in der unmittelbaren Umgebung wachsen.

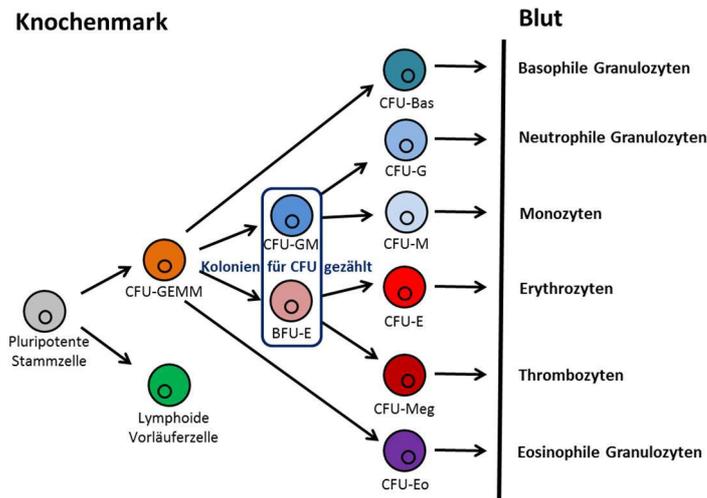


Abb.6 Hämatopoese im Knochenmark und die gezählten CFU-Kolonien für den humanen CFU-Assay. Bas (*basophil*); BFU (*burst-forming unit*) CFU (*colony-forming unit*); E (*erythroid*); Eo (*eosinophil*); GEMM (*granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte*); GM (*granulocyte-macrophage*); Meg (*megakaryocyte*). (Abbildung verändert nach Socolovsky et al., 1998).

Zählkriterien für Kolonien der Ratten

Für die Auswertung der Kolonien aus den Knochenmarkszellen der Ratte wurden nur die BFU gezählt, sodass nur eine Hemmung oder ein Wachstum von Kolonien gegenüber verschiedenen Prüfsubstanzen gezeigt werden konnte.

Auswertungsprozedur

Nach der definierten Inkubationszeit wurden die Kolonien-Platten aus dem Brutschrank entnommen und an einem inversen Mikroskop mit Handzählgerät ausgezählt. Zur Vereinfachung wurden die einzelnen 35 mm-Petrischalen auf eine 60 mm-Petrischale mit Gittereinteilung gestellt. Als Kolonie wurde ein Zellverband von mindestens 50 Zellen definiert.

Für die Auswertung wurden Balkendiagramme erstellt, bei denen die Kolonienanzahl, die aus dem Mittelwert der Dreifachbestimmung berechnet wurde, der jeweiligen Substanzmenge gegenübergestellt. Schließlich sollte die Substanzmenge ermittelt werden, bei der das Kolonienwachstum um 50 % bzw. 90 % inhibiert war. Diese Werte wurden als IC₅₀- bzw. IC₉₀-Wert angegeben.

2.2.7.5 Anreicherungen der Knochenmarkszellen aus dem CFU-Assay für die Herstellung von Zytopräparaten

Prinzip der Zytocentrifuge

Die *Cytospin* Zytocentrifuge von Thermo Fisher Scientific ermöglicht Dünnschichtpräparationen aus einer beliebigen flüssigen Matrix, wie in diesem Fall Knochenmarkszellen aus dem CFU-Assay. Mithilfe geringer Zentrifugalkräfte werden Zellmonolayer (sog. *Zytospots*) auf Objektträgern (*Cytoslides*) übertragen, wobei die Zellintegrität erhalten bleibt. Dadurch wird eine gute Darstellung der Zellen mithilfe der Mikroskopie erreicht (siehe Abb.7).

Das Prinzip beruht auf Zentrifugalkräfte im *Cytospin*, die Zellen in einem klar definierten Bereich eines Objektträgers sedimentiert. Während des Betriebs werden durch Rotation des Gerätes die Probenkammern (*Cytofunnel*) in eine aufrechte Position gebracht und Zellen auf das Sedimentationsfeld des Objektträgers zentrifugiert, sodass alle Zellen konzentriert auf einem *Zytospot* dargestellt werden. Die Zellen werden außerdem abgeflacht, um eine gute Zellkerndarstellung zu erhalten. Die Restflüssigkeit wird über eine Filterkarte der *Cytofunnel* absorbiert. In der Belade- oder Stopp-Position wird durch die Neigefunktion innerhalb des Gerätes Zellverlust verringert, indem verhindert wird, dass die Restflüssigkeit mit dem Objektträgern in Kontakt kommt (Online Produktinformation Thermo Fisher Scientific).

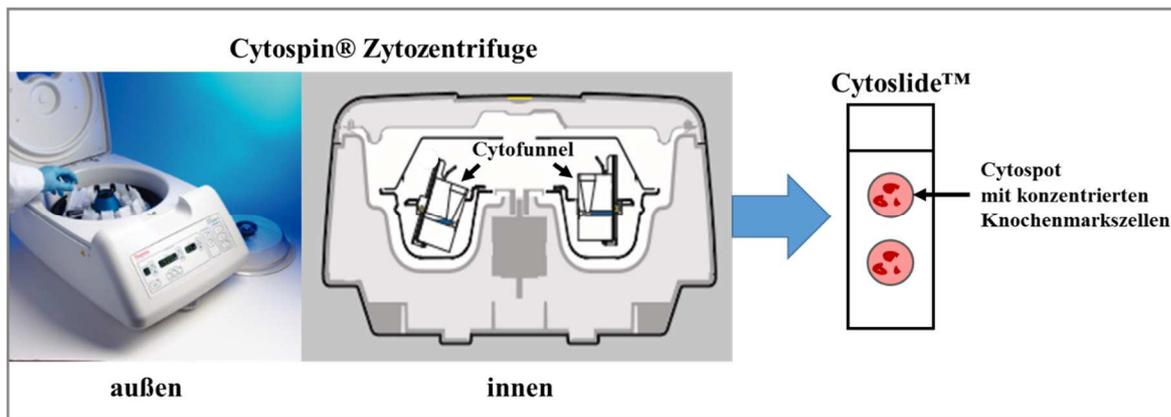


Abb.7 Darstellung der Zytocentrifuge *Cytospin*. Äußere und innere Gerätedarstellung und als Resultat *Cytoslides* mit konzentrierten Knochenmarkszellen (*Zytospots*), die sich mikroskopisch untersuchen lassen. Darstellung außen und innen übernommen von Thermo Fisher Scientific.

Verflüssigung der Knochenmarkszellen aus dem IMDM-Medium und Herstellung von Zytopräparaten

Um alle Zellen aus den Methylcellulose Kulturen zu verflüssigen und zu ernten, wurde 2 ml von Isocove's MDM mit 2 % FBS (IMDM, Stemcell Technologies) auf die 35 mm CFU-Platten gegeben. Die Platten wurden mind. 15 min bei 4 – 8 °C im Kühlschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platten mit einer Pipette (Einstellung auf ein ml) vermischt und in ein steriles 15 ml Falcon übertragen. Danach wurde zweimal 1 ml IMDM auf die Platten dazugeben, vermischt und der Inhalt in das 15 ml Falcon übertragen damit alle Zellen geerntet wurden. Am Ende befanden sich ca. 4,5 ml Zellflüssigkeit im Falconröhrchen, die bei 160 g 10 min bei 4 °C zentrifugiert wurde.

Anschließend wurde der Überstand vorsichtig verworfen und die Zellen ein zweites Mal gewaschen. Hierzu wurden 3 ml IMDM hinzugegeben, resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig verworfen, das Pellet in 1,8 ml IMDM resuspendiert und der gesamte Inhalt in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte über dem Advia 2120i (Siemens). Die Einstellung der Zellzahl erfolgte bei 1×10^5 Zellen/ml.

Für die Herstellung der Zytopräparate wurden als erstes die *Cytoslides* mit Ethanol gereinigt und beschriftet. Die Objektträger und *Cytofunnel* wurden in jeweils einem *Cytospin*-Gestell platziert, die Halterung fest verschlossen und in dem *Cytospin* gestellt. Danach wurde in jedes der zwei Felder der *Cytofunnel* 200 µl FCS vorgelegt und anschließend die berechnete Zellmenge von 2×10^5 Zellen/Feld zugegeben. Nach der Befüllung des Cytospins folgte die Zentrifugation bei 500 rpm und 5 min.

Anschließend wurden die Cytoslides über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung in einer Aceton-Methanol-Mischung (3:2) für 7 min und eine erneute Lufttrocknung über Nacht. Als letztes wurden die Zytospots gefärbt, eine Hälfte May-Grünwald und die andere Hälfte Peroxidase-May-Grünwald.

2.2.7.6 Automatische hämatologische Analysen von Knochenmarkszellen der Ratte

Eine automatische hämatologische Analyse von Knochenmarkszellen wurde mit dem Standardgerät Advia 2120i (Siemens) für hämatologische Untersuchungen von Rattenserum in Toxizitätsstudien durchgeführt.

Messprinzipien des Advia

Mithilfe des sog. „Peroxidase-Halogenlampen-Messkanals“ können folgende weiße Blutzellen optisch gemessen und differenziert werden: neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten.

In diesem Messkanal werden die Erythrozyten im ersten Schritt lysiert und als nächstes die Leukozyten mit speziellen Färbereagenzien (u.a. Peroxidase-Färbung) angefärbt. Mithilfe der hydrodynamischen Fokussierung werden die weißen Blutzellen jeweils als singuläre Zellen gemessen. Auf Grundlage des zellulären Enzymmusters der endogenen Peroxidaseaktivität (Absorption) und der Zellvolumenbestimmung (Vorwärtsstreulicht) wird eine Trennung der Zellpopulationen erreicht und in einem Zytoprogramm (Leukogramm) projiziert.

Durchführung der automatischen Knochenmarksanalyse

Während der Sektion der Ratten wurde der linke Oberarmknochen (*Humerus*) für diese Untersuchung entnommen und sein Muskelgewebe per Skalpell befreit. Der Oberarmhals wurde durch Kappen mittels einer Zange vom Oberarmkopf und dem unterem Ende befreit. Es erwies sich als vorteilhaft, das Knochenmark mit einer Lösung aus ein ml PBS mit EDTA vorsichtig mit einer Spritze (26G x 7/8“ 0,45x23mm) in ein Mikro-Probengefäß (1,3 ml K3E) auszuwaschen. Die Zellsuspension wurde filtriert (70 µm Filter) und das Filtrat in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (CentriStar™) aufgefangen. Nach erneutem Überführen des Filtrats in ein Mikro-Probengefäß (1,3 ml K3E) konnte anschließend am Advia gemessen werden.

Ein Vergleich der gewöhnlichen manuellen Zählung der Knochenmarkszellen (wie unter 2.2.7.1 beschrieben) mit der automatischen Knochenmarksanalyse durch den Advia ist in der Abbildung 8 zu sehen.

Aus der analysierten Knochenmarkssuspension wurde, wie unter 2.2.7.5 beschrieben (ab Zellzahlbestimmung), ebenfalls *Zytospots* hergestellt, um eine mikroskopische Untersuchung der Zellen zu ermöglichen.

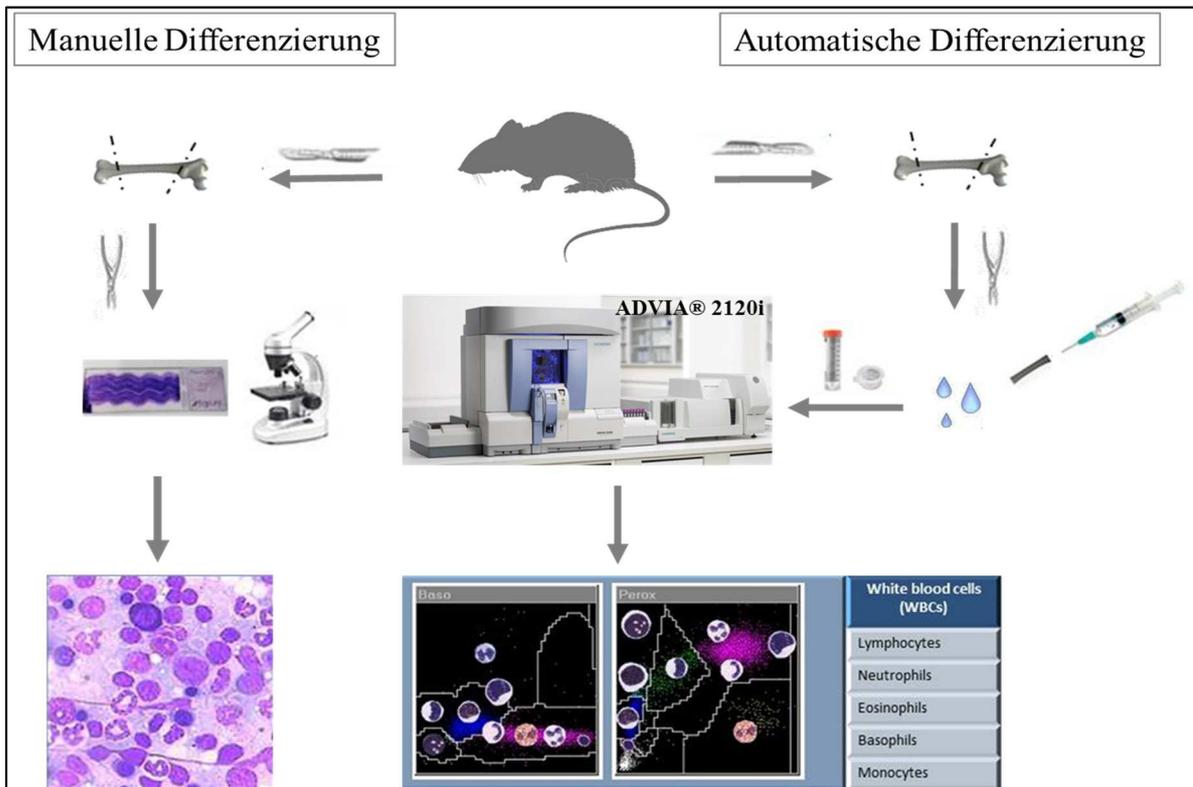


Abb.8 Vergleich der manuellen und automatischen Knochenmarksanalyse mit dem Advia Hämatologie-System.

2.2.7.7 Zytologische Untersuchungen der Knochenmarkszellen anhand (Cytospots und Knochenmarksaustriche)

Für die zytologische Untersuchung der Knochenmarkszellen wurden die zwei Färbungen (May-Grünwald und Peroxidase-May-Grünwald) und die beiden Methoden Knochenmarksaustriche und *Zytospots* miteinander verglichen.

Die Knochenmarkszelldifferenzierung im Ausstrich und der *Zytospots* wurde von erfahrenen Laboranten der Bayer Pharma AG am Mikroskop durchgeführt. Bei ca. 100-facher Vergrößerung wurde ein möglichst dünner und gleichmäßiger Abschnitt für die Auswertung ausgewählt, wobei Randbezirke ausgeschlossen waren. Bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl wurde mäanderförmig der Bereich betrachtet, der für die Auswertung gewählt wurde. Es wurden aus mindestens zwei Gesichtsfeldern 500 intakte kernhaltige Zellen differenziert, die alle im Raster lagen. Die Auszählung erfolgte unter zur Hilfenahme eines Differenzierungsgerätes (Counter AC-15 Assistent, Hecht). Die Anteile der Zellgruppen wurden in Promille angegeben.

Die Zellen wurden zu den nachstehend aufgeführten Zellgruppen zugeordnet:

1. BLAST : Blasten (Myeloblast, undifferenzierte Blasten)
2. E 1-3 : Unreife Erythropoese (E1 = Proerythroblast, E2 = Makroblast, E3 = Basophiler Normoblast)
3. E 4+5 : Reife Erythropoese (E4 = Polychromatischer Normoblast, E5 = Oxyphiler Normoblast)
4. M 2-4 N: Unreife neutrophile Granulozytopoese (M2 N = Promyelozyt I, M3 N = Promyelozyt II, M4 N = Myelozyt)
5. M 5+6 N: Halbreife neutrophile Granulozytopoese (M5 N = Metamyelozyt, M6 N = Stabkerniger Granulozyt I)
6. M 7+8 N: Reife neutrophile Granulozytopoese (M7 N = Stabkerniger Granulozyt II, M8 N = Segmentkerniger Granulozyt)
7. M 2-4 E: Unreife eosinophile Granulozytopoese (M2 E = Promyelozyt I, M3 E = Promyelozyt II, M4 E = Myelozyt)
8. M 5-8 E: Halbreife und reife eosinophile Granulozytopoese (M5 E = Metamyelozyt, M6 E = Stabkerniger Granulozyt I, M7 E = Stabkerniger Granulozyt II, M8 E = Segmentkerniger Granulozyt)
9. M2-4 B: Unreife basophile Granulozytopoese (M2 B = Promyelozyt I, M3 B = Promyelozyt II, M4 B = Myelozyt)
10. M 5-8 B: Halbreife und reife basophile Granulozytopoese (M5 B = Metamyelozyt, M6 B = Stabkerniger Granulozyt I, M7 B = Stabkerniger Granulozyt II, M8 B = Segmentkerniger Granulozyt)
11. MOM: Monozyten
12. LYMB: Lymphozyten
13. PLA: Plasmazellen
14. MEGK: Megakaryozyten
15. MC: Mastzellen (Gewebsbasophile)
16. RC: Retikulumzellen
17. MIT: Mitosen
18. UD: Undifferenzierbare Zellen/intakte Zellen (z.B. Mehrkernige Zellen, Mitosestörungen)

Da die Ergebnisse mit denen verglichen wurden, die mit dem Advia Hämatologie-Gerät erzeugt wurden, wurden einige Gruppen nochmals zusammengefasst, damit diese den Zellgruppen im Advia entsprachen. Daraus resultierten folgende vereinfachte Zellgruppen:

Blasten, Erythropoese (2 + 3), neutrophile Granulozytopoese (4 - 6), eosinophile Granulozytopoese (7 + 8), basophile Granulozytopoese (9 + 10), Monozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, Megakaryozyten, Mastzellen, Retikulumzellen, Mitosen, undifferenzierte Zellen.

2.2.8 Statistische Methoden

Mithilfe der Software GraphPad Prism wurden alle Balkendiagramme erstellt inklusive der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

Ebenfalls wurde mit GraphPad Prism die statistische Signifikanz mit der Angabe eines p-Wertes (Signifikanzwert) berechnet. Je nach Diagrammtyp wurden die Kontrollgruppe mit den jeweiligen Dosisgruppen oder nur die Dosisgruppen mit den CSA behandelten Tieren untereinander verglichen. Ein direkter Vergleich der statistischen Signifikanz zwischen den mit CSA oder AZA behandelten Tieren wurde nicht durchgeführt, da der Mechanismus der beiden Substanzen grundlegend verschieden ist. Für den Vergleich zwischen Kontrolle und den CSA-Dosisgruppen untereinander wurde ein *one-way ANOVA* Test (*Bonferroni's multiple comparison test*) gewählt. Für den Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Dosisgruppe AZA 20 mg/kg wurde ein ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur ausgewählt.

3 Ergebnisse

Teil 1: Immunhistochemische Biomarker in lymphatischen Organen der Ratte angewandt an bis zu 20 Jahre alten archivierten Toxizitätsstudien

3.1 Etablierung der immunhistochemischen Biomarker und Untersuchung der Zielzellen hinsichtlich Lokalisation und Häufigkeit in den lymphatischen Organen

Für die immunhistochemische Untersuchung von archivierten Toxizitätsstudien in der Ratte wurden sechs Biomarker ausgewählt, um Informationen über die zellulären Zustände in den lymphatischen Organen nach Gabe einer immunmodulatorischen Substanz zu erhalten. Die Auswahl an sechs immunhistochemischen Biomarkern (Caspase-3, CD3, CD8, CD68, CD79 und Zytokeratin) sollte die wichtigsten Immunzellen in mesenterialen Lymphknoten, Milz und Thymus sowie interagierende Zellen nachweisen. Die verschiedenen Antigene sind auf folgenden Zellen exprimiert (Tab.13):

Tab.13 Verwendete Antigene und ihre Zielzellen.

| Antigen (Name des Antikörpers) | Zielzellen | Lokalisation der Färbung |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Caspase-3 | apoptotische Zellen | Zytoplasma |
| CD3 | pan-T-Lymphozyten | Zytoplasma und/oder Zellmembran |
| CD8 | zytotoxische T-Zellen | Zytoplasma |
| CD68 | Makrophagen | Zellmembran |
| CD79 | B-Zellen | Zellmembran |
| Zytokeratin | thymische Epithelzellen | Zytoplasma |

Die immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst an Paraffinschnitten von lymphatischen Organen unbehandelter Kontrolltiere etabliert. Ziel der Etablierung war es, eine adäquate Stärke der Färbung der Zielzellen (apoptotische Zellen, T-Zellen, zytotoxische T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Epithelzellen) in Form eines Brauntons (durch das Chromogen DAB) unter Vermeidung einer unspezifischen Färbung anderer Zellen zu erreichen. Bei Erreichung der gewünschten Färbung wurde die Lokalisation der Zielzellen in Milz und Thymus von unbehandelten Kontrolltieren aus den verschiedenen Toxizitätsstudien detailliert untersucht und verglichen.

Im Folgenden wird die zelluläre Lokalisation der verschiedenen markierten Zielzellen in Milz und Thymus beschrieben als auch bildlich dargestellt.

Die aktivierte Caspase-3 ist ein Apoptose-Marker und findet sich relativ gleichmäßig verteilt im Thymus. Apoptose ist im Thymus ein natürlicher Vorgang, da eine sog. positive Selektion der T-Lymphozyten in der Rinde (R) und eine sog. negative Selektion der T-Lymphozyten im Mark (MK) stattfinden [Abb.9 (1)]. In der Milz gibt es wenige apoptotische Zellen, die sich überwiegend in aktiven Keimzentren finden, in denen ebenfalls im Zuge der Selektion antigenspezifischer B-Lymphozyten Apoptose stattfindet [Abb.9 (2)].

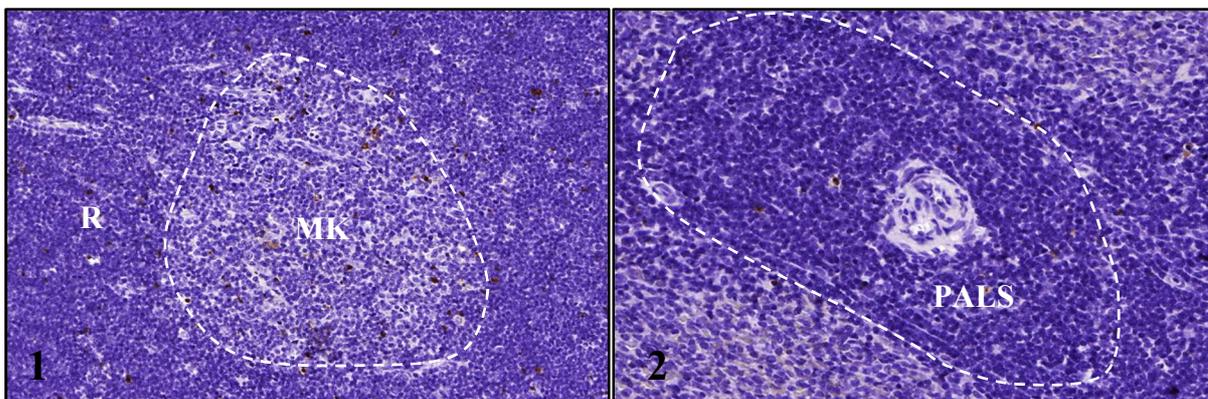


Abb.9 Zelluläre Lokalisation der aktivierten Caspase-3.
(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x15), (2) Milz periarterioläre lymphatische Scheiden (PALS) (x20)

Das Oberflächenmerkmal CD3 befindet sich auf allen reifen T-Zellen und ihren unreifen Vorläufern, den Thymozyten der Thymusrinde, und ist somit ein guter Marker für die Gesamtpopulation. Sowohl Rinde als auch Mark des Thymus enthalten CD3⁺-Zellen. Die Thymusrinde ist aufgrund der dichten Lagerung der Thymozyten sehr dunkel gefärbt und im Mark befinden sich - weniger dicht gelagert - ausdifferenzierte T-Zellen [Abb.10 (1)]. Das T-Zell-Areal in der Milz ist die PALS. Relativ viele (rezirkulierende) T-Zellen finden sich in der roten Pulpa (RP). Während sich in den B-Zell-Follikeln (BF) und in der Marginalzone (MZ) nur sehr wenige T-Lymphozyten nachweisen lassen [Abb.10 (2)].

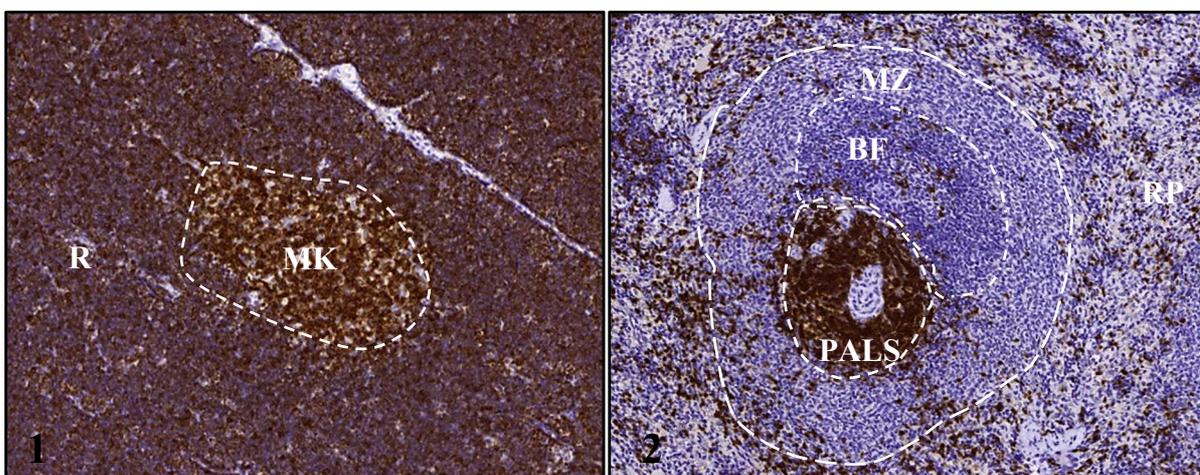


Abb.10 Zelluläre Lokalisation von CD3.
(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x7), (2) Milz mit periarterioläre lymphatische Scheiden (PALS), B-Zell-Follikeln (BF), Marginalzone (MZ) und rote Pulpa (RP) (x8)

CD8 ist ein Antigen auf der Oberfläche von Thymozyten, die CD4/CD8 doppelt-positiv sind, sowie der zytotoxischen T-Lymphozyten. Alle in der Thymusrinde befindlichen Thymozyten sind CD8⁺-positiv. Im Mark befinden sich die ausdifferenzierten CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, die aber gegenüber den CD4⁺-Zellen in der Minderheit sind [Abb.11 (1)]. Der Nachweis von CD4⁺ gelingt jedoch in Paraffinschnitten von Rattenorganen nicht, sodass die CD4⁺-Lymphozyten sich nur indirekt durch Subtraktion der CD8⁺- von den CD3⁺-T-Lymphozyten ergeben. Entsprechend sind in der Milz in den gleichen Kompartimenten wie bei der CD3⁺-Färbung zytotoxische T-Zellen vorhanden, aber in geringerer Anzahl [Abb.11 (2)].

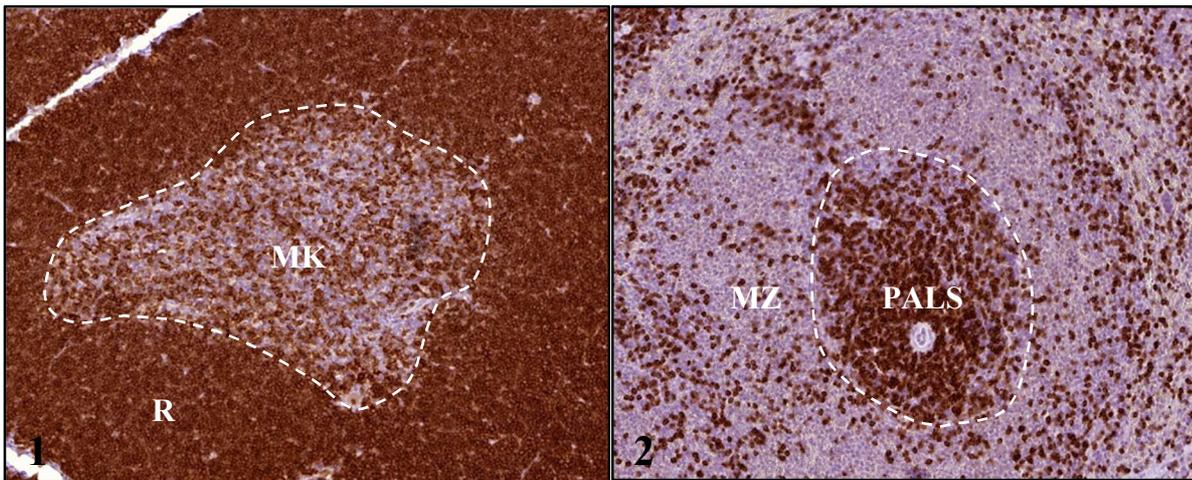


Abb.11 Zelluläre Lokalisation von CD8.

(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x8), (2) Milz mit periarteriolarer lymphatischer Scheide (PALS) und Marginalzone (MZ) (x8)

Im Thymus befinden sich CD68⁺ Makrophagen im Mark und besonders konzentriert in der Übergangszone zwischen Rinde und Mark. In der Thymusrinde liegen sie locker eingestreut [Abb.12 (1)]. In der Milz befinden sich zahlreiche Makrophagen in den Marksträngen der roten Pulpa, wo sie gealterte oder beschädigte Erythrozyten abbauen. Wenige Makrophagen sind hingegen in der weißen Pulpa (WP) vorhanden. Hier sind sie am dichtesten in den Marginalzonen und aktiven Keimzentren der B-Zellfollikel vorhanden [Abb.12 (2)].

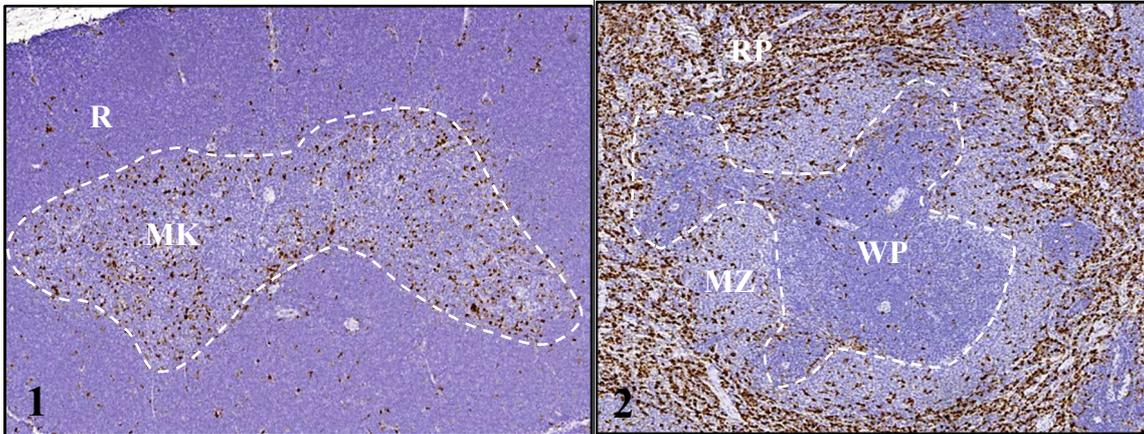


Abb.12 Zelluläre Lokalisation von CD68.

(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x5), (2) Milz mit weiße Pulpa (WP), Marginalzone (MZ) und rote Pulpa (RP) (x5)

Der B-Zellnachweis mit CD79 zeigt im Thymus geringe Mengen von B-Zellen im Mark, die sich insbesondere an der Grenze zur Rinde konzentrieren [Abb.13 (1)]. In der Milz lassen sich mit diesem Marker die Kompartimente Marginalzone und B-Zellfollikel darstellen, die eine hohe Dichte an B-Lymphozyten besitzen. B-Zellen kommen des Weiteren in der äußeren PALS vor. Wenige (rezirkulierende) B-Zellen finden sich in der roten Pulpa [Abb.13 (2)].

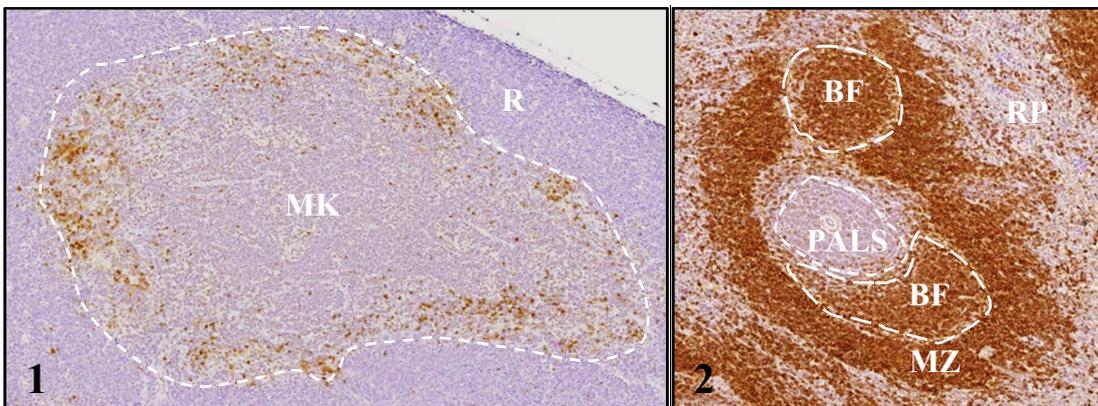


Abb.13 Zelluläre Lokalisation von CD79a.

(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x6), (2) Milz mit periarteriolar lymphatische Scheiden (PALS), B-Zell-Follikeln (BF), Marginalzone (MZ) und rote Pulpa (RP) (x5)

Der verwendete Zytokeratin-Antikörper erkennt die Zytokeratine 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18. Im Thymus lassen sich mithilfe der Zytokeratin-Färbung die verzweigten Epithelzellen darstellen, die das Gerüst des Organs bilden. In der Rinde liegen in den Maschen der Epithelzellfortsätze die reifenden Thymozyten. Abhängig von ihrer Zahl ist das Maschenwerk der Epithelzellfortsätze unterschiedlich stark gekammert. In der äußeren Rinde sind bei Wistar-Ratten große „epithelfreie Bereiche“ (siehe Pfeile) typisch. In der Medulla sind unregelmäßige, teilweise dickere Züge von Epithelzellfortsätzen vorhanden (Abb.14).

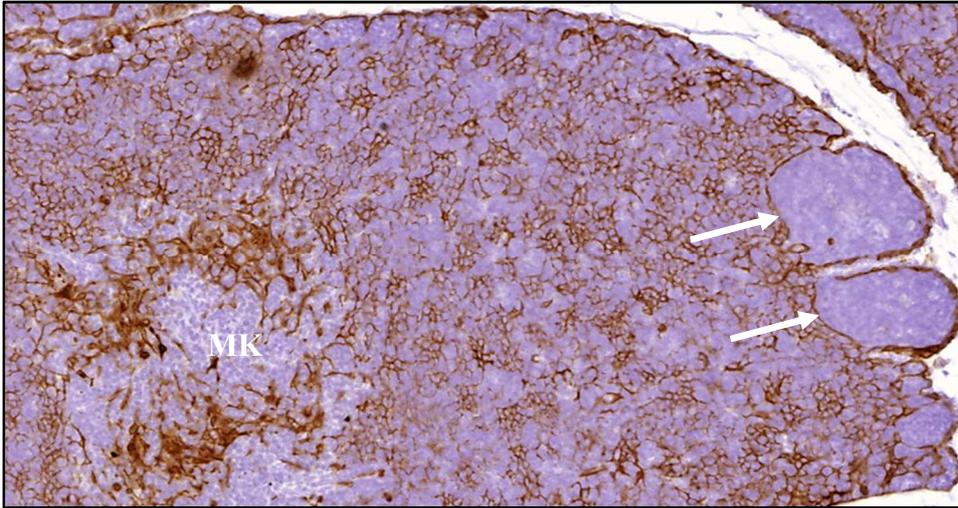


Abb.14 Zelluläre Lokalisation von Zytokeratin.
Thymus mit epithelfreien Bereichen (Pfeile) und dicke Epithelzellfortsätze in der Medulla (MK) (x10)

3.2 Histopathologische Untersuchungen von lymphatischen Organen der Ratte aus archivierten toxikologischen Studien

Für die histopathologische Untersuchung der lymphatischen Organe in der Ratte wurden als Grundlage acht archivierte toxikologische Studien [subakute orale Toxizitätsstudien mit zwei oder vier Wochen (gem. *Testguideline* OECD 407) Behandlungsdauer] ausgewählt, in denen immunmodulatorische Substanzen verabreicht wurden.

Von allen Studien wurden die archivierten H&E-gefärbten Paraffinschnitte mikroskopisch untersucht.

Zusätzlich zu den bereits vorhandenen H&E-Färbungen wurden alle Studien mit den etablierten sechs immunhistochemischen Biomarkern gefärbt, um eine umfassendere Untersuchung von einzelnen Zellen in den lymphatischen Organen zu erhalten. Damit könnten zelluläre Veränderungen in Reaktion auf immunmodulierenden Substanzen in niedrigeren Dosen entdeckt werden als es mit der herkömmlichen H&E-Färbung möglich ist.

Immunhistochemische Färbungen werden in der Regel nach Bedarf durchgeführt, um beispielsweise einen bestimmten Verdacht im Untersuchungsbefund abzuklären.

Die Färbungen erwiesen sich als schwierig, da die Studien unterschiedlich lange gelagert wurden und die Fixationszeiten stark variierten, weshalb die Bindung des Antikörpers an seinen Epitop erschwert wurde. Bei jeder Studie musste das erarbeitete Protokoll an optimal fixierten lymphatische Organen von unbehandelten Tieren neu ausgetestet werden (z.B. durch Veränderung der *Antigen-Retrival*-Methode oder Veränderungen der Antikörper-Konzentration), um möglichst gute Färbungen zu erhalten. Es kam vor, dass die immunhistochemischen Färbungen der Positivkontrollen mit optimal fixierten Gewebe eine andere - schwächere oder höhere - Farbintensität aufwiesen als die zu untersuchende Studie.

Während unter idealen Bedingungen die Positivkontrolle eine dem Untersuchungsgut vergleichbare Färbeintensität aufwies, war dies im Archivmaterial nicht immer möglich.

Die in den Studienberichten dargestellten Befunde waren aufgrund des Fehlens einer standardisierten Nomenklatur für die histopathologische Untersuchung von lymphatischen Organen uneinheitlich. Basierend auf den Studienberichten und histologischer Untersuchung der entsprechenden H&E-Schnitte wurden die Befunde an Milz und Thymus überprüft und auf Basis der aktuellen *Enhanced Histopathology* (Elmore, 2006a/b) vereinheitlicht (siehe Tab.14). Die immunhistochemischen Färbungen wurden ebenso einer einheitlichen histopathologischen Diagnostik unterzogen. Die Bezeichnungen der Befunde richteten sich ebenfalls nach dem Prinzip der „*Enhanced Histopathology*“, da sich das Prinzip der deskriptiven Befundung auch hier anwenden lässt. Die Bezeichnungen geben eine Zu- oder Abnahme von Zellen in Kompartimenten der lymphatischen Organe oder morphologische Besonderheiten an. Befunde, deren Inzidenz eine klare Abweichung gegenüber der Kontrolle zeigte, wurden als möglicherweise behandlungsabhängig gewertet.

Tab.14 Gegenüberstellung der neuen (*Enhanced Histopathology*) und alten Terminologie angewandt an den H&E-Befunden.

| Neue Terminologie gem. <i>Enhanced Histopathology</i> | Ältere Terminologie |
|--|---|
| Thymus | |
| Kompartimentgröße ↓ ↑ (Gebiet/Größe) | Atrophie/Hyperplasie |
| - Rinde | |
| - Mark | |
| - epithelfreie Region | |
| Rinde/Mark Verhältnis ↓ | |
| Makrophagen ↓↑ | Sternhimmelmakrophagen (Tingible body-Makrophagen) |
| Zelldichte (Zellularität) ↓ ↑ | Atrophie/Hyperplasie |
| - Rinde | |
| - Mark | |
| - epithelfreie Region | |
| - | Normal / ohne Befund |
| Milz | |
| Hämatopoese aktueller Grad | Erhöhte Hämatopoese |
| Hämosiderin ↑ | Pigmentierung |
| - | Normal / ohne Befund |
| Zelldichte weiße Pulpa ↓ ↑ | Atrophie bzw. Hyperplasie der weißen Pulpa |
| - PALS | |
| - Follikel | |
| - Marginalzonen | |
| - diffus | |
| Kompartimentgröße ↓ ↑ (Gebiet/Größe) | Atrophie bzw. Hyperplasie der weißen Pulpa |
| - PALS | |
| - Follikel | |
| - Marginalzonen | |
| - diffus | |
| Vermehrte/Verminderte Keimzentren | Follikelhyperplasie/Follikelatrophie |
| Erweiterte Sinus | Stauung/Kongestion |

Im Folgenden werden die Ergebnisse der H&E- und immunhistochemischen Färbungen der jeweils acht Substanzen präsentiert. Die Rohtabellen mit der genauen Auflistung von Schweregraden sind auf Anfrage bei der Autorin erhältlich.

3.2.1 Azathioprin (AZA)

In dieser Studie wurden sechs männliche Ratten pro Dosisgruppe (0 - 5 - 10 - 20 mg/kg) mit der Prüfsubstanz AZA für vier Wochen oral behandelt.

Die wichtigsten histologischen Befunde der H&E-Färbung des Thymus und der Milz präsentiert die Tabelle 15. Im Thymus waren Anzeichen der Atrophie - gemessen am Rinde/Mark Verhältnis, der Abgrenzung von Rinde/Mark, der Fläche der Rinde und der Anzahl an Makrophagen - bereits ab 5 mg/kg zu sehen. Während bereits alle Tiere der Hauptgruppe eine Zunahme von Makrophagen bei 5 mg/kg zeigten, nahm dieser Befund in den höheren Dosen aufgrund des Bestehens anderer, schwerer Veränderungen an Häufigkeit ab.

Die immunhistochemische Färbung (Tab. 16) konnte nur an Schnitten der Kontrollgruppen und der oberen Dosis durchgeführt werden, da diese Organe in Paraffin eingebettet worden waren. Die Organe der Zwischengruppen befanden sich bis zum Zeitpunkt der Untersuchung in dem Fixativ Formalin. Aufgrund der langen Lagerung in Formalin ließ sich ein Nachweis der entsprechenden Epitope nicht mehr durchführen.

Der Thymus zeigte allerdings deutliche immunhistochemische Befunde mit dem Biomarker Zytokeratin. Bei den Tieren der oberen Dosis von 20 mg/kg ließen sich die epithelfreien Regionen nicht nachweisen und aufgrund der geringeren Zahl an Lymphozyten im Kortex war eine gegenüber Kontrollen feinere Struktur des Epithelnetzwerkes erkennbar.

Tab. 15 Azathioprin: Ergebnisse der H&E-Färbung

| AZA | | | | |
|---|----------------------------|----|----|----|
| Dosisgruppe | 01 | 02 | 03 | 04 |
| mg/kg | 0 | 5 | 10 | 20 |
| Geschlecht | M | M | M | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Histologischer Befund H&E | Absolute Inzidenzen gesamt | | | |
| Thymus Rinde/Mark Verhältnis ↓ | 0 | 1 | 5 | 6 |
| Thymus Unklare Abgrenzung Rinde/Mark | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Thymus Fläche Rinde ↓ | 0 | 1 | 4 | 6 |
| Thymus Makrophagen ↑ | 1 | 6 | 5 | 3 |

M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt, ↑ Fläche oder Zellen erhöht

Tab. 16 Azathioprin: Ergebnisse der IHC-Färbung.

| AZA | | | | |
|---|----------------------------|----|----|----|
| Dosisgruppe | 01 | 02 | 03 | 04 |
| mg/kg | 0 | 5 | 10 | 20 |
| Geschlecht | M | M | M | M |
| Anzahl Tiere | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 6 | 0 | 0 | 5 |
| Immunhistochemischer Befund | Absolute Inzidenzen gesamt | | | |
| Thymus Zytokeratin Epithelfreie Regionen ↓ | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Thymus Zytokeratin Dichte Epithelnetzwerk ↑ | 0 | 0 | 0 | 5 |

M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt, ↑ Fläche oder Zellen erhöht

3.2.2 Cyclosporin A (CSA)

Jeweils sechs männliche und weibliche Ratten erhielten die Prüfsubstanz CSA in den Dosierungen 0, 1, 5 und 25 mg/kg über vier Wochen oral verabreicht.

Im Thymus konnte mithilfe der H&E-Färbung (Tab.17) ab 5 mg/kg eine Verschmälerung bis zum kompletten Verlust der Markzone und damit eine Verschiebung des Verhältnisses von Rinde und Mark zugunsten der Rindenzone gesehen werden. Bei 5 mg/kg war eine leichte Reduktion des Marks bei fünf von fünf männlichen und bei vier von fünf weiblichen Ratten vorhanden. Nach 25 mg/kg war dieser Befund bei allen Tieren hochgradig ausgeprägt. In der Thymusrinde traten vermehrt Makrophagen auf.

In der Milz fiel bei männlichen und weiblichen Tieren nach 25 mg/kg eine reduzierte Zellularität des T-Zellgebiets (PALS) und eine veränderte Zellularität der Follikel auf.

Aus lagerungsbedingten Gründen war in dieser Studie immunhistochemisch nur der Nachweis von CD68 erfolgreich (Tab.18). Bei drei von zehn weiblichen Kontrollen sowie bei acht von zehn Weibchen nach 1 mg/kg waren vermehrt Makrophagen in Rinde und Mark des Thymus vorhanden.

Wie schon bei AZA gezeigt, führten sehr hohe Dosierungen mit starken Veränderungen der Thymusmorphologie dazu, dass Veränderungen wie die Zunahme von Makrophagen nicht wiedergefunden werden können.

Tab.17 Cyclosporin A: Ergebnisse der H&E-Färbung.

| CSA | | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----|---------|----|---------|----|----------|----|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 1 | | 03 5 | | 04 25 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Histologischer Befund H&E | Absolute Inzidenzen gesamt | | | | | | | |
| Thymus Rinde/Mark Verhältnis ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 10 | 10 | 10 |
| Thymus Makrophagen Rinde ↑ | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 6 | 6 | 8 |
| Milz Zellularität PALS ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 | 9 |
| Milz Veränderte Zellularität der Follikel | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 8 |

F: weiblich, M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt, ↑ Fläche oder Zellen erhöht

Tab.18 Cyclosporin A: Ergebnisse der IHC-Färbung

| CSA | | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----|---------|----|---------|----|----------|----|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 1 | | 03 5 | | 04 25 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Immunhisto- chemischer Befund | Absolute Inzidenzen gesamt | | | | | | | |
| Thymus CD68 Makrophagen Rinde ↑ | 3 | 0 | 8 | 0 | 6 | 7 | 0 | 8 |
| Thymus CD68 Makrophagen Mark ↑ | 3 | 0 | 8 | 0 | 2 | 0 | 0 | 8 |

F: weiblich, M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt, ↑ Fläche oder Zellen erhöht

3.2.3 Oxazolidinone (OXA I - IV)

Insgesamt vier Studien mit Entwicklungssubstanzen aus der Klasse der Oxazolidinone (im Folgenden als OXA I bis IV bezeichnet) wurden ausgewertet. Die Oxazolidinone wirkten insbesondere toxisch auf das Knochenmark, allerdings gab es zwischen den einzelnen Substanzen große Unterschiede bezüglich ihrer Myelotoxizität.

Die Substanz OXA I wurde an jeweils fünf weiblichen und männlichen Ratten in den Dosen 0, 25, 75 und 225 mg/kg über zwei Wochen oral gegeben.

Die H&E-Färbung (Tab. 19) zeigte eine deutlich verringerte Inzidenz der Blutbildung in der Milz bei Tieren der oberen Dosis.

Mithilfe der Zytokeratin-Färbung konnte im Thymus das Verschwinden von epithelfreien Regionen in der oberen Dosis nachgewiesen werden. Weniger apoptotische Zellen im gesamten Thymus waren in allen mit OXA I-behandelten Tieren zu sehen außer in den Weibchen der oberen Dosis. Da Kontrolltiere bereits erhöhte Makrophagen im Thymus aufwiesen, war eine deutliche Steigung an Makrophagen nur an weiblichen Tieren der oberen Dosis zu finden.

Immunhistochemisch waren in der niedrigen und mittleren Dosisgruppe bei männlichen Tieren weniger CD3⁺ T-Zellen in der roten Pulpa der Milz nachweisbar. Während eine Zunahme CD3⁺ T-Zellen in der roten Pulpa bei weiblichen Tieren der mittleren und oberen Dosis festgestellt wurde. Die CD8⁺ T-Zellen waren in der oberen Dosisgruppe in der PALS der Milz vermehrt. Der Biomarker CD79 konnte erhöhte B-Zell-Zahlen in der peripheren PALS von Weibchen der unteren und mittleren Dosis aufzeigen. Bei allen männlichen Tieren der unteren Dosis traten Gruppen von B-Zell-Anhäufungen (Foci) in der roten Pulpa auf. Der Nachweis von Makrophagen in der Milz zeigte jeweils zwei Tiere in allen Dosisgruppen, die mehr Makrophagen in der PALS aufwiesen. (Tab.20).

Tab.19 Oxazolidinon I: Ergebnisse der H&E-Färbung.

| OXA I | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|---|----------|---|----------|---|-----------|---|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 25 | | 03 75 | | 04 225 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Histologischer Befund H&E | Absolute Inzidenzen gesamt | | | | | | | |
| Milz Hämatopoese rote Pulpa | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 1 |

F: weiblich, M: männlich

Tab.20 Oxazolidinon I: Ergebnisse der IHC-Färbung.

| OXA I | | | | | | | | |
|---|----------------------------|---|----------|---|----------|---|-----------|---|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 25 | | 03 75 | | 04 225 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Immunhistochemischer Befund | Absolute Inzidenzen gesamt | | | | | | | |
| Thymus Zytokeratin Epithelfreie Regionen ↓ | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 5 | 5 |
| Thymus Caspase-3 Apoptotische Zellen ↓ | 1 | 0 | 3 | 4 | 3 | 4 | 0 | 4 |
| Thymus CD68 Makrophagen Rinde + Mark ↑ | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 5 | 3 |
| Milz CD3 T-Zellen roten Pulpa ↓ | 1 | 0 | 3 | 5 | 2 | 5 | 0 | 0 |
| Milz CD3 T-Zellen roten Pulpa ↑ | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 5 | 0 |
| Milz CD8 T-Zellen PALS ↑ | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 4 | 3 |
| Milz CD79 B-Zellen periphere PALS ↑ | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 2 | 0 | 1 |
| Milz CD79 B-Zell-Foci rote Pulpa | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Milz CD68 Makrophagen PALS ↑ | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |

F: weiblich, M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt, ↑ Fläche oder Zellen erhöht

OXA II wurde über zwei Wochen in Dosierungen von 0, 25, 75 und 225 mg/kg (Hauptgruppen) oral verabreicht. Zusätzlich bekamen drei Satellitengruppen (*Recovery*) ebenfalls 25, 75 und 225 mg/kg OXA II oral verabreicht, um eine zweiwöchige Nachbeobachtungszeit vor der Sektion anzuschließen. Dies diente dazu, eine mögliche Persistenz, Reversibilität oder ein verspätetes Auftreten von toxischen Effekten festzustellen.

Die H&E-Färbung (Tab.21) zeigte im Thymus der oberen Dosisgruppe teilweise Atrophien, die entweder einen direkten toxischen oder einen sekundären Stresseffekt darstellten.

In der Milz der oberen Dosisgruppe war eine reduzierte Megakaryozytenzahl vorhanden, die ebenfalls in der *Recovery* bestehen blieb. Die Hämatopoese in der Milz war in der oberen Dosis reduziert und war in keinem Tier der *Recovery* zu sehen.

Verminderte Zellularitäten in der weißen und roten Pulpa waren bei weiblichen Tieren der oberen Dosisgruppe vorhanden. Während dieser Effekt in der roten Pulpa vollständig reversibel war (siehe *Recovery*), war die weiße Pulpa der oberen Dosisweibchen auch noch in der *Recovery* betroffen.

Tab.21 Oxazolidinon II: Ergebnisse der H&E-Färbung.

| OXA II | | | | | | | | |
|--|---------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|---|
| Dosisgruppe | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | |
| mg/kg | HG | HG | HG | HG | Rec | Rec | Rec | |
| | 0 | 25 | 75 | 225 | 25 | 75 | 225 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 |
| Histologischer Befund H&E | Absolute Inzidenzen | | | | | | | |
| Thymus Lymphozyten Rinde ↓ | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4 |
| Milz Megakaryozyten rote Pulpa ↓ | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 5 | 3 |
| Milz Hämatopoese rote Pulpa | 5 | 5 | 4 | 5 | 3 | 4 | 0 | 2 |
| Milz Zellularität weiße Pulpa ↓ | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 5 | 0 |
| Milz Zellularität rote Pulpa ↓ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |

HG: Hauptgruppe, Rec: *Recovery*, Nachbehandlungsphase, F: weiblich, M: männlich,
↓ Fläche oder Zellen erniedrigt, ↑ Fläche oder Zellen erhöht; *nur 4 untersuchte Organe

Die immunhistochemische Färbung konnte keine eindeutigen Effekte der behandelten gegenüber den Kontrolltieren nachweisen.

OXA III wurde über zwei Wochen an jeweils fünf weiblichen und fünf männlichen Ratten in den Dosen 0, 75, 225 und 500 mg/kg oral verabreicht. Die Tabelle 22 fasst die Ergebnisse der H&E-Färbung an Milz und Thymus zusammen.

In den hohen Dosierungen trat eine Thymusatrophie auf (verminderte Lymphozyten; Rinde und Mark nicht klar abgrenzbar). Bei weiblichen Tieren wurde in fast keiner Gruppe eine vermehrte Blutbildung in der Milz gesehen. Im Gegensatz dazu war bei den männlichen Tieren eine deutlichere Blutbildung als bei den korrespondierenden Weibchen (Kontrolle) vorhanden, da Männchen stärker wachsen und entsprechend ihre Blutmenge noch vergrößern. Ab 75 mg OXA III nahm allerdings die Hämatopoese in der roten Pulpa der Männchen ab. Die Zellularität der roten Milzpulpa war nach 225 und 500 mg/kg reduziert.

Das Sinken der Zellzahl trat auch in der weißen Pulpa auf und äußerte sich bei den Weibchen ab der mittleren Dosis und bei den Männchen in der oberen Dosis.

Die immunhistochemischen Befunde an lymphatischen Organen in der Studie OXA III sind in der Tabelle 23 dargestellt. Megakaryozyten und Makrophagen waren in der roten Pulpa der Milz dosisabhängig vermindert. In den Marginalzonen war dagegen teilweise eine Zunahme von Makrophagen zu erkennen.

Tab.22 Oxazolidinon III: Ergebnisse der H&E-Färbung.

| OXA III | | | | | | | | |
|--|---------------------|---|----------|---|-----------|---|-----------|---|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 75 | | 03 225 | | 04 500 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl unter- suchter Organe | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Histologischer Befund H&E | Absolute Inzidenzen | | | | | | | |
| Thymus Lymphozyten Rinde ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 3 | 5 |
| Thymus Unklare Ab- grenzung Rinde/Mark | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| Milz Hämatopoese rote Pulpa | 1 | 4 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Milz Zellularität rote Pulpa ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 5 | 5 |
| Milz Zellularität weiße Pulpa ↓ | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 5 | 5 |

F: weiblich, M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt

Tab.23 Oxazolidinon III: Ergebnisse der IHC-Färbung.

| OXA III | | | | | | | | |
|---|----------------------------|---|----------|---|-----------|---|-----------|---|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 75 | | 03 225 | | 04 500 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Immunhisto- chemischer Befund | Absolute Inzidenzen gesamt | | | | | | | |
| Thymus Caspase-3 Apoptotische Zellen ↑ | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| Thymus Caspase-3 Apoptotische Zellen ↓ | 2 | 0 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Thymus CD68 Makrophagen Mark ↑ | 2 | 0 | 3 | 2 | 4 | 1 | 1 | 1 |
| Thymus CD68 Makrophagen Rinde ↑ | 2 | 0 | 2 | 2 | 5 | 1 | 3 | 1 |
| Thymus Zytokeratin Epithelfreie Regionen ↓ | 1** | 0 | 5 | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 |
| Milz CD79 Megakaryozyten rote Pulpa ↓ | 0 | 0 | 3 | 0 | 5 | 3 | 4* | 5 |
| Milz CD68 Makrophagen rote Pulpa ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 5 | 3 |
| Milz CD68 Makrophagen Marginalzone ↑ | 2 | 0 | 2 | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 |

F: weiblich, M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt, ↑ Fläche oder Zellen erhöht, * 4 von 5 untersuchte Organe, ** 3 von 5 untersuchte Organe

Es wurden Dosisgruppen von fünf weiblichen und fünf männlichen Ratten mit Dosen von 0, 25, 75 und 225 mg/kg OXA IV oral über zwei Wochen verabreicht.

Die histopathologische Untersuchung von H&E-gefärbten lymphatischen Organen zeigte folgende Befunde in den Tieren der oberen Dosis (Tab. 24): Im Thymus waren in zwei von fünf Männchen und fünf von fünf Weibchen Lymphozyten entleert (Atrophie). Des Weiteren war in beiden Geschlechtern ein reduziertes Rinde/Mark Verhältnis zu sehen, dass sich bei den Männchen schon in der mittleren Dosisgruppe andeutete. In der roten Pulpa der männlichen Milzen fehlten erythrotoetische Foci (Hämatopoese) und die Zahl der Megakaryozyten war reduziert. In den weiblichen Tieren war die Hämatopoese ebenfalls vollständig fehlend und die weiße Pulpa ließ eine Lymphozyten-Depletion erkennen.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung in der Studie OXA IV sind in der Tab. 25 zu sehen und umfasst im Wesentlichen Abnahmen von T-Lymphozyten und Veränderungen der Makrophagenmenge in Milz (Abnahme in der PALS) und Thymus (Zunahme Makrophagen in der Rinde).

Tab.24 Oxazolidinon IV: Ergebnisse der H&E-Färbung.

| OXA IV | | | | | | | | |
|---|---------------------|---|----------|---|----------|---|-----------|---|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 25 | | 03 75 | | 04 225 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl unter- suchter Organe | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Histologischer Befund H&E | Absolute Inzidenzen | | | | | | | |
| Thymus Lymphozyten Depletion | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 2 |
| Thymus Rinde/Mark Verhältnis ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 | 4 |
| Milz Hämatopoese rote Pulpa | 1 | 5 | 2 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Milz Zellularität rote Pulpa ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 5 | 3 |
| Milz Zellularität weiße Pulpa ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |

F: weiblich, M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt

Tab.25 Oxazolidinon IV: Ergebnisse der IHC-Färbung.

| OXA IV | | | | | | | | |
|--|---------------------|---|----------|---|----------|---|-----------|---|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 25 | | 03 75 | | 04 225 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl unter- suchter Organe | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Immunhisto- chemischer Befund | Absolute Inzidenzen | | | | | | | |
| Thymus Zytokeratin Epithelfreie Regionen ↓ | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 4 |
| Thymus CD68 Makrophagen Rinde ↑ | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 |
| Thymus CD68 Makrophagen Mark ↑ | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Milz CD3 T-Zellen rote Pulpa ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 |
| Milz CD3 T-Zellen PALS ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Milz CD68 Makrophagen PALS ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 5 | 2 |

F: weiblich, M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt, ↑ Fläche oder Zellen erhöht

3.2.4 Benzo(a)pyren (BAP)

In dieser Studie wurden jeweils fünf männliche Wistar-Ratten für vier Wochen folgende Dosen mit BAP oral verabreicht: 0 - 37,5 - 75 - 150 mg/kg.

Die histopathologische Auswertung an H&E-Schnitten (Tab.26) ergab in der Milz einen vermehrten Blutgehalt (Kongestion) in der roten Pulpa und eine leicht erhöhte Blutbildung ab 37,5 mg/kg. Die Abgrenzung von prominenten Sinusendothelien in der Milz trat ab 75 mg/kg auf. Eine thymische Atrophie in der Rinde und „Sternhimmel-Makrophagen“ wurden ab 75 mg/kg gesehen.

Die Auswertung zur immunhistochemischen Untersuchung der BAP-Studie ist in der Tabelle 27 dargestellt. In der Milz ist ab der untersten Dosis (37,5 mg/kg) eine verringerte Breite der Marginalzone festzustellen. Ab 37,5 mg/kg waren geringere Mengen CD3⁺ T-Zellen in der roten Pulpa vorhanden, wobei nach 150 mg/kg insbesondere die CD8⁺ T-Zellen verringert waren. Im Thymusmark fanden sich nach 37,5 mg/kg fokale Anhäufungen von CD8⁺ T-Zellen. Fast alle Tiere der Dosisgruppen zeigten eine erhöhte Anzahl von Makrophagen an der Grenze zwischen Rinde und Mark. Die Färbung der Epithelzellen im Thymus zeigte eine deutliche Abnahme der epithelfreien Regionen in allen behandelten Tieren und – als Hinweis auf eine Thymusatrophie mit reduzierter Thymozytenzahl - eine erhöhte Dichte des Epithelnetzwerkes in den oberen Dosisgruppen.

Tab.26 Benzo(a)pyren: Ergebnisse der H&E-Färbung.

| BAP | | | | |
|--|-------------------------------|------|----|-----|
| Dosisgruppe | 01 | 02 | 03 | 04 |
| mg/kg | 0 | 37,5 | 75 | 150 |
| Geschlecht | M | M | M | M |
| Anzahl Tiere/ Anzahl untersuchter Organe | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Histologischer Befund H&E | Absolute Inzidenzen gesamt | | | |
| Thymus Zellularität Rinde ↓ | 0 | 0 | 2 | 5 |
| Thymus Makrophagen ↑ | 0 | 0 | 3 | 5 |
| Milz Blutfülle rote Pulpa | 0 | 2 | 4 | 5 |
| Milz Hämatopoese rote Pulpa | 0 | 3 | 4 | 4 |
| Milz Prominente Sinusendothelien | 0 | 0 | 3 | 2 |

M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt,
↑ Fläche oder Zellen erhöht

Tab.27 Benzo(a)pyren: Ergebnisse der IHC-Färbung.

| BAP | | | | |
|---|-------------------------------|------|----|-----|
| Dosisgruppe | 01 | 02 | 03 | 04 |
| mg/kg | 0 | 37,5 | 75 | 150 |
| Geschlecht | M | M | M | M |
| Anzahl Tiere | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Immunhistochemischer Befund | Absolute Inzidenzen gesamt | | | |
| Thymus Zytokeratin Epithelfreie Regionen ↓ | 0 | 4* | 5 | 4* |
| Thymus Zytokeratin Dichte Epithelnetzwerk ↑ | 0 | 0* | 0 | 3* |
| Thymus CD68 Makrophagen Grenze Rinde/Mark ↑ | 0 | 5 | 4 | 5 |
| Thymus CD79 B-Zellen Mark ↑ | 2 | 3 | 2 | 0 |
| Thymus CD8 T-Zellen Mark fokal ↑ | 1 | 3 | 1 | 0 |
| Milz CD79 Breite Marginalzone ↓ | 0 | 2 | 3 | 2 |
| Milz CD3 T-Zellen roten Pulpa ↓ | 0 | 3 | 4 | 5 |
| Milz CD8 T-Zellen roten Pulpa ↓ | 0 | 0 | 1 | 5 |

M: männlich, ↓ Fläche oder Zellen erniedrigt,
↑ Fläche oder Zellen erhöht,* 4 von 5 untersuchte
Organen

3.2.5 Hexachlorbenzol (HCB)

In dieser Studie wurden jeweils zehn weibliche und zehn männliche Wistar-Ratten mit 0, 3, 30 und 100 mg/kg HCB über vier Wochen oral behandelt.

Die Substanz wirkte bei den Ratten immunstimulierend und führte zu einer systemischen Entzündung mit vergrößerten Lymphknoten.

Die histopathologische Untersuchung an H&E-Schnitten ergab in der Milz spezifische Veränderungen nach HCB (Tab. 28): Die Zellularität der Lymphozyten in der Marginalzone war ab 30 mg/kg HCB erhöht. Die Zellularität der Lymphozyten in den Follikeln schwankte dagegen deutlich in den verschiedenen Dosisgruppen und hatte die höchste Inzidenz in Weibchen der oberen Dosis. Zusätzlich war eine erhöhte extramedulläre Hämatopoese in einigen Ratten (insbesondere in den Männchen) ab 30 mg/kg HCB zu sehen.

Wie bei CSA konnten auch hier aufgrund der langen Lagerung des Materials nicht alle immunhistochemischen Nachweise durchgeführt werden, sondern nur die Färbungen der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen. Die mikroskopische Auswertung ergab ausschließlich in der Milz Veränderungen der T-Zellen. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen in der PALS waren ab der mittleren Dosis erniedrigt. Die CD3⁺ T-Zellen waren bei männlichen Tieren der oberen Dosis in den B-Zell-Follikeln der Milz vermehrt (Tab.29):

Tab.28 Hexachlorbenzol: Ergebnisse der H&E-Färbung.

| HCB | | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----|---------|----|----------|----|-----------|----|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 3 | | 03 30 | | 04 100 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Immunhisto- chemischer Befund | Absolute Inzidenzen gesamt | | | | | | | |
| Milz Zellularität Follikel ↑ | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 4 | 5 | 2 |
| Milz Keimzentren ↑ | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 3 | 3 | 4 |
| Milz Zellularität Marginalzone ↑ | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 9 | 10 |
| Milz Hämatopoese rote Pulpa | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 5 | 1 |

F: weiblich, M: männlich, ↑ Fläche oder Zellen erhöht

Tab.29 Hexachlorbenzol: Ergebnisse der IHC-Färbung.

| HCB | | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----|---------|----|----------|----|-----------|----|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 0 | | 02 3 | | 03 30 | | 04 100 | |
| Geschlecht | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Anzahl Tiere | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Immunhisto- chemischer Befund | Absolute Inzidenzen gesamt | | | | | | | |
| Milz CD8 T-Zellen PALS↓ | 3 | 2 | 1 | 2 | 8 | 7 | 8 | 2 |
| Milz CD3 T-Zellen B-Zell- Follikel ↑ | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 7 |

F: weiblich, M: männlich,
↓ Fläche oder Zellen erniedrigt,
↑ Fläche oder Zellen erhöht

3.2.6 Vergleich von LOELs zwischen H&E- und IHC-Färbungen

Um die beiden Färbemethoden (H&E und IHC) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit zu vergleichen, wurde aus den oben aufgeführten Tabellen ermittelt, ab welcher Dosis ein Effekt im Thymus oder in der Milz nach Gabe einer immunmodulierenden Substanz zu sehen war. Für jede Färbung wird der sogenannte Schwellenwert *lowest effect level* (LOEL) bestimmt, bei dem sich ein bestimmter Befund um mindestens 3 absolute Inzidenzen im Vergleich zur Kontrolle unterschied.

Der LOEL bezieht sich auf die Milz und/oder den Thymus (Angabe in Klammern), um zusätzlich die Empfindlichkeit des Immunorgans anzugeben.

In der Studie, in der AZA verabreicht wurde, konnten in den H&E-Färbungen erste Effekte ab der untersten Dosis (5 mg/kg) gesehen werden. Ein direkter Vergleich zu den IHC-Färbungen ist nicht möglich, da die Färbung nur in der obersten Dosis (20 mg/kg) vorhanden war.

In der Studie mit OXA II liegt die größere Sensitivität bei der H&E-Färbung, in der Effekte in der oberen Dosis gesehen wurden, aber mithilfe der IHC kein Befund festgestellt werden konnte. Die gleichen LOELs in beiden Färbungen waren in den Studien mit BAP und OXA IV zu finden.

Insgesamt konnten in vier (CSA, HCB, OXA I und III) von acht Studien die ersten histologischen Effekte in IHC-Färbungen als in H&E-Färbungen gesehen werden (Tab.30).

Tab.30 Vergleich der LOELs in den H&E- und IHC-Färbungen der archivierten Studien.

| Substanz | LOEL H&E | LOEL IHC |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Azathioprin | 5 mg/kg (Thy) | 20 mg/kg* (Thy) |
| Cyclosporin A | 5 mg/kg (Thy) | 1 mg/kg (Thy) |
| Benzo(a)pyren | 37,5 mg/kg (Mlz) | 37,5 mg/kg (Mlz/Thy) |
| Hexachlorbenzol | - | 30 mg/kg (Mlz) |
| Oxazolidinon I | 225 mg/kg (Mlz) | 25 mg/kg (Mlz, Thy) |
| Oxazolidinon II | 225 mg/kg (Mlz/Thy) | - |
| Oxazolidinon III | 225 mg/kg (Mlz/Thy) | 75 mg/kg (Mlz/Thy) |
| Oxazolidinon IV | 75 mg/kg (Thy) | 75 mg/kg (Mlz) |

LOEL = *lowest observed effect level*, Mlz = Milz; Thy = Thymus

* IHC-Untersuchung ab 20mg/kg vorhanden, deshalb nicht vergleichbar zu H&E

3.2.7 Beispiele histopathologischer Effekte in Milz und Thymus im H&E-Schnitt

Einige Beispiele von ausgeprägten Effekten in Milz und Thymus werden in den folgenden Abbildungen dargestellt (Abb.15 A-E). Die H&E-gefärbten Schnitte wurden mithilfe eines Scanners digitalisiert. Für die Auswahl und Vergrößerung (in Klammern angegeben) von einzelnen Bildabschnitten wurde das Programm *Panoramic Viewer* verwendet.

Das Bild A zeigt eine vermehrte Hämatopoese bzw. erythropoetische Foci (Pfeil) in der roten Milzpulpa (RP) eines Kontrolltieres in der Studie OXA I. Die blutbildenden Zellen bilden kleine Ansammlungen. Da in der Milz überwiegend Erythrozyten gebildet werden, deren Kerne während der Reifung kondensieren, erscheinen die Zellhaufen stark basophil.

Ebenfalls im Zusammenhang mit einer extramedullärer Hämatopoese können vermehrt Megakaryozyten in der roten Milzpulpa gesehen werden (Bild B Kontrolltier OXA II).

Immunsuppressive, zytotoxische Substanzen können die schnell teilenden hämatopoetischen Zellen beeinträchtigen. Die Bildreihe C1 und C2 zeigt Unterschiede in der Blutfülle (Kongestion) der roten Milzpulpa. Der Blutgehalt der roten Pulpa korrespondiert mit dem Ausblutungsgrad des Tieres, sodass mitlaufende Kontrolltiere zur Beurteilung von Abweichungen unerlässlich sind. Während C1 den normalen Zustand eines Kontrolltieres zeigt, ist bei C2 eine deutlich vermehrte Blutfülle eines hochdosierten Tieres mit BAP zu sehen. Eine induziert erhöhte Blutmenge in der Milz kann auf eine Schädigung zirkulierender Erythrozyten hinweisen, die dann in den Marksträngen der roten Pulpa festgehalten werden. Die Bildreihe D stellt Unterschiede in der Thymozytendichte der Thymusrinde dar. D1 zeigt die gewöhnliche Thymusmorphologie eines Kontrolltieres mit einer dichten Lagerung lymphatischer Zellen, während die ebenfalls vorhandenen Epithelzellen und Makrophagen überwiegend nicht deutlich erkennbar sind. Bei D2 sind zahlreiche Aufhellungen innerhalb der Thymusrinde bei einem Tier der oberen Dosis mit BAP zu sehen. Hier ist es zur verstärkten Resorption von Thymozyten durch *Tingible body*-Makrophagen (sog. Sternhimmelzellen) gekommen. Im Zuge des verstärkten Untergangs von Thymozyten durch Apoptose oder Nekrose kann auch die Zelldichte (Zellularität) der Rinde abnehmen.

Die Bildreihe E1-E3 zeigt abgestufte Unterschiede im Verhältnis von Rinde (R) und Mark (MK) des Thymus. Typischerweise verschmälert sich bei Thymusatrophie vor allem die Rinde, sodass das Verhältnis Rinde/Mark (corticomedullary ratio) abnimmt. E1 zeigt in einem Thymusläppchen die Relation bei einem Kontrolltier, demgegenüber hat bei E2 mit einem Tier aus der Studie OXA IV mittlere Dosis, das Verhältnis Rinde/Mark deutlich abgenommen. E3 zeigt eine hochgradige Depletion von corticalen Thymozyten und eine relative Zunahme der Zelldichte im Mark.

Bei schweren Thymusatrophien kann sich, wie im vorliegenden Fall bei OXA IV obere Dosis, die Zelldichte von Mark und Rinde umkehren und ein inverses Bild ergeben.

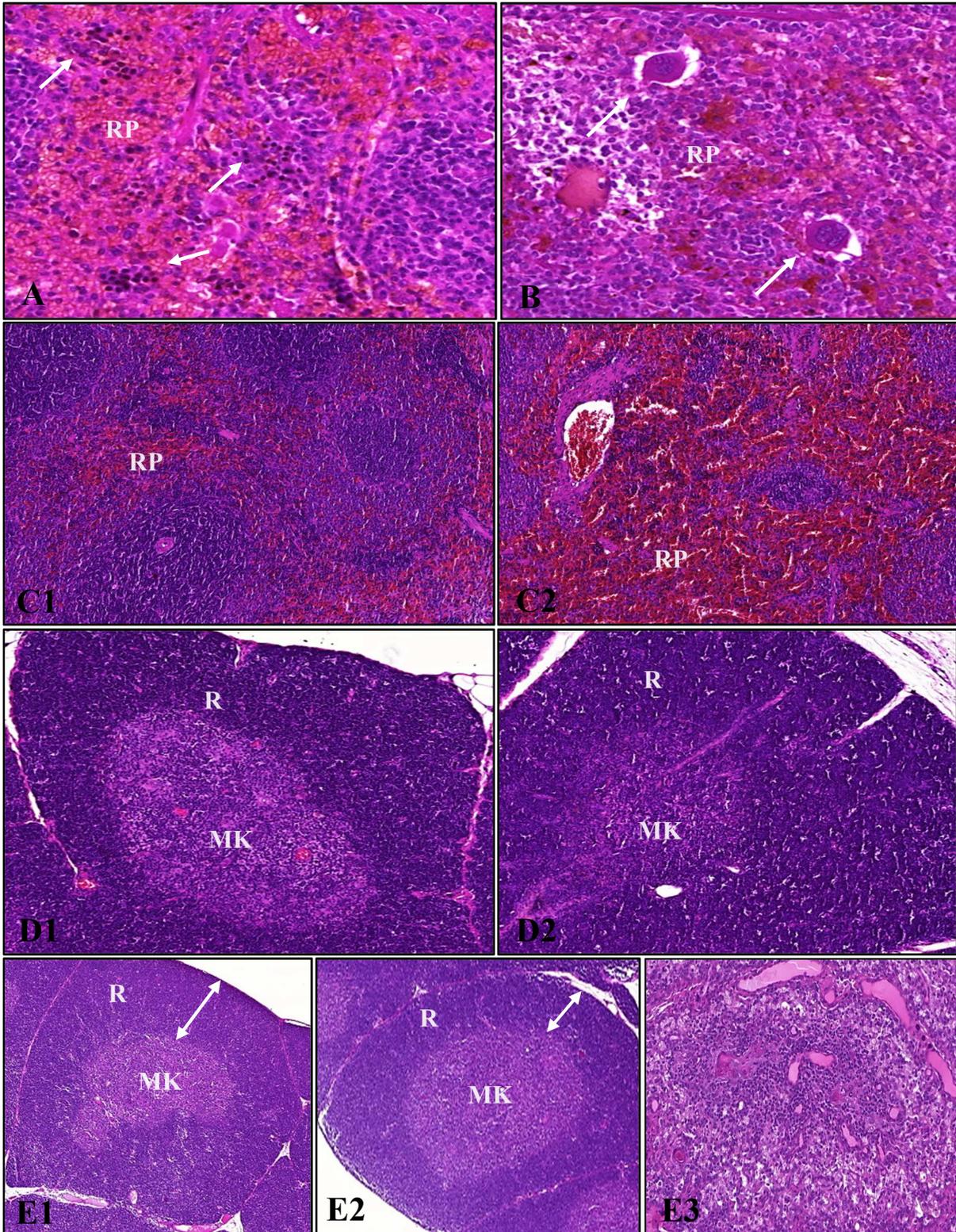


Abb.15 A-E Ausgeprägte histopathologische Effekte in Milz und Thymus erhoben an H&E-Färbungen.
A) Erythropoetische Foci in der roten Milzpulpa (RP) an OXA I Kontrolltier (Pfeil) (x20)
B) Vermehrte Megakaryozyten (Pfeil) in der roten Milzpulpa an OXA II Kontrolltier (x15)
C) Unterschiede in der Blutfülle der roten Milzpulpa. **C1** Blutgehalt bei einem Kontrolltier, **C2** vermehrte Blutfülle nach BAP in der oberen Dosisgruppe (x7)
D) Unterschiede in der Thymozytendichte der Thymusrinde. **D1** Kontrolltier **D2** obere Dosisgruppe BAP, *Tingible body*-Makrophagen (x5)
E) Unterschiede im Verhältnis von Rinde (R) und Mark (MK) des Thymus. **E1** Relation bei einem Kontrolltier (Pfeil), **E2** OXA IV mittlere Dosis, Abnahme Verhältnis Rinde/Mark (Pfeil) (x2). **E3** OXA IV obere Dosis, hochgradige Depletion von corticalen Thymozyten (x10)

3.2.8 Beispiele histomorphologischer Veränderungen in Milz und Thymus in IHC-Färbungen

Ausgeprägte zelluläre Veränderungen in Milz und Thymus in immunhistochemischen Färbungen werden in den folgenden Abbildungen beispielhaft gezeigt (Abb.16 F - M).

Die Bilder F1 und F2 zeigen Unterschiede in der Ausprägung epithelfreier Areale der äußeren Thymusrinde, die sich im immunhistochemischen Nachweis von Zytokeratin darstellen. Diese Gebiete sind auch im H&E-Schnitt teilweise erkennbar, lassen sich jedoch nur mit Zytokeratin objektivieren. Unabhängig von Behandlungseinflüssen können die bei Wistar-Ratten vorkommenden epithel-freien Regionen tierindividuell unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Nur durch den sorgfältigen Vergleich zu Kontrollen können Gruppenunterschiede erkannt werden. Während bei der Kontrolle (F1) deutliche epithelfreie Regionen erkennbar sind, waren diese nach der Behandlung mit AZA in der oberen Dosis (F2) im Zuge der Thymusatrophie fast vollständig verschwunden.

Die Bildreihe G zeigt den immunhistochemischen Nachweis von Caspase-3, der Unterschiede in der Ausprägung von Apoptosen in Thymus erkennen lässt. Der Nachweis zeigt damit eine Veränderung, die im H&E-Schnitt nicht erkennbar ist. Weiterhin lässt sich durch Caspase 3 eine Differenzierung zwischen Apoptosen und Nekrosen vornehmen. G1 zeigt nur geringe Mengen positiver Zellen bei einer Kontrolle. Dahingegen zeigt G2 den Thymus nach einer AZA-Gabe in der oberen Dosisgruppe, bei dem die Anzahl an Caspase-3-positiven Zellen in Rinde und Mark erhöht waren.

Die Bildreihe H stellt Unterschiede in der Menge von CD79⁺ B-Lymphozyten im Thymusmark dar. B-Lymphozyten lassen sich im Thymusmark im H&E-Schnitt nicht differenzieren. Hier können lediglich Unterschiede in der Menge der lymphatischen Zellen festgestellt werden. H1 zeigt ein Kontrolltier, während H2 ein mit AZA behandeltes Tier der oberen Dosisgruppe zeigt, das eine stärkere Färbung und höhere Anzahl an positiven Zellen aufwies.

Die unterschiedliche Ausprägung (Häufigkeit oder Größe) von Makrophagen lässt sich mit dem Biomarker CD68 im Thymus beurteilen. Ein Beispiel ist auf den Bildern I1/2 zu sehen. I1 zeigt eine Kontrolle und I2 eine Zunahme der Makrophagen an der Mark-Rindengrenze nach BAP obere Dosis.

Nach der Gabe von HCB in der oberen Dosis konnte eine verstärkte Präsenz von größeren CD3⁺ T-Lymphozyten in den B-Zellfollikeln (BF) (J2) und eine Abnahme der CD8⁺ T-Lymphozyten in der PALS (K2) der Milz im Gegensatz zur Kontrolle (J1/K2) gesehen werden.

Mit dem Biomarker CD8 lassen sich im Thymus nach Gabe von BAP (mittlere Dosis von 75 mg/kg) vermehrt T-Lymphozyten fokal im Mark darstellen (L).

Mit dem Biomarker CD79 lassen sich außer B-Zellen auch die Megakaryozyten darstellen. Die Abbildung M zeigt Megakaryozyten in der Milz eines mit OXA III behandelten Tieres. Auch bei diesem Befund sind mitlaufende Kontrollen notwendig, da die Blutbildung und die Zahl der Megakaryozyten natürlichen, wachstumsbedingten Schwankungen sowie Versuchseinflüssen (Blutentnahme) unterworfen ist.

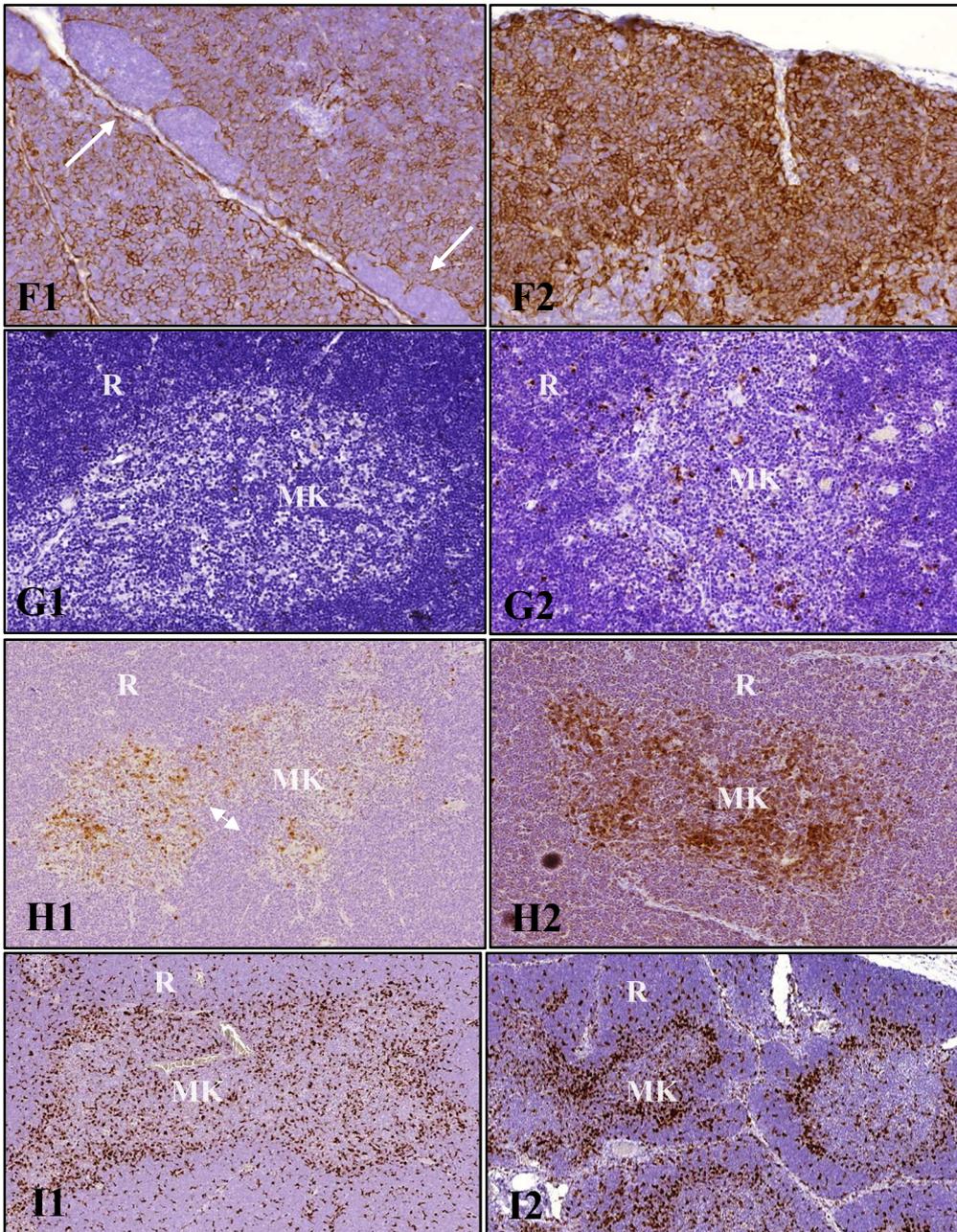


Abb.16 F-I Ausgeprägte histologische Effekten in Milz und Thymus erhoben an IHC-Färbungen. **F)** Epithelfreie Areale der äußeren Thymusrinde mit IHC-Nachweis Zytokeratin. **F1** Kontrolltier mit epithelfreien Regionen (Pfeil), die nach AZA obere Dosis (**F2**) vollständig verschwunden sind (x12) **G)** Unterschiede in der Ausprägung von Apoptosen in Thymus im IHC-Nachweis von Caspase-3. **G1** Kontrolle mit geringen Mengen positiver Zellen, **G2** AZA obere Dosis mit erhöhter Anzahl apoptotischer Zellen in Rinde (R) und Mark (MK) (x12) **H)** Unterschiede in der Menge CD79⁺ B-Lymphozyten im Thymusmark.. **H1** Kontrolltier, **H2** AZA obere Dosis (x7) **I)** Unterschiedliche Häufung von Makrophagen im Thymus mit CD68. **I1** Kontrolltier, **I2** Verdichtung der Makrophagen an der Mark-Rindengrenze nach BAP obere Dosis (x4)

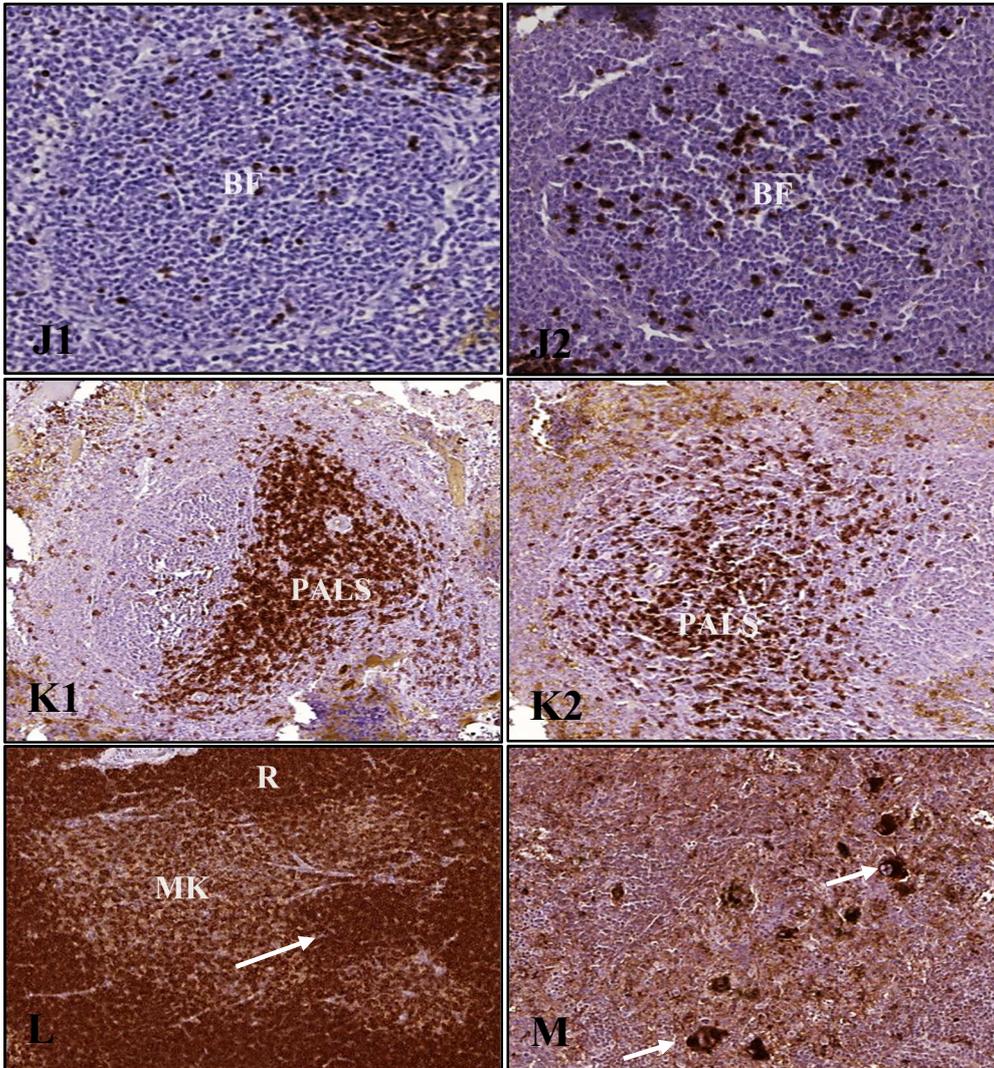


Abb.16 J-M Ausgeprägte histologische Effekten in Milz und Thymus erhoben an IHC-Färbungen.

J) Unterschiede in der Menge von CD3⁺ T-Lymphozyten in der Milz. **J1** Kontrolltier, **J2** verstärkte Präsenz von T-Lymphozyten in den B-Zellfollikeln (BF) nach HCB obere Dosis (x12)

K) Darstellung der Mengen von zytotoxischen T-Lymphozyten mit CD8 in der Milz. **K1** Kontrolltier, **K2** Abnahme der T-Lymphozyten in der PALS nach HCB obere Dosis (x7)

L) Fokal vermehrte T-Lymphozyten im Thymusmark mit CD8 nach BAP mittlere Dosis (x7)

M) CD79⁺ Megakaryozyten in der Milz eines mit OXA III behandelten Tieres (x10)

3.3 Untersuchungen von Zellen in den lymphatischen Organen mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie

Neben der konventionellen Lichtmikroskopie gibt es eine Reihe von lichtmikroskopischen Spezialverfahren, die relativ unbekannt in der histopathologischen Untersuchung von lymphatischen Organen und während einer toxikologischen Standarduntersuchung sind. Eine der leistungsstarken Mikroskopie-Technologien in den Lebenswissenschaften ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

Ein wichtiger Unterschied im Gegensatz zu der vorher betrachteten immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode, ist die Verwendung von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern. Der Sichtbarmachung der Antigene in der Immunhistochemie nach der ABC-Methode durch Chromogene wie DAB und Gegenfärbung des Gewebes mit Hämatoxylin stehen in der Fluoreszenzmikroskopie Fluorochrome (Fluoreszenzfarbstoffe) gegenüber, die kontrastreiche, scharf lokalisierte Reaktionen auf dunklem Hintergrund ergeben. Mehrfachfärbungen sind mit beiden Methoden möglich, jedoch mit der Fluoreszenzfärbung noch genauer lokalisierbar.

Das Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, ob die konfokale Fluoreszenzmikroskopie mithilfe des konfokalen Laser-Rastermikroskop (engl. Laser Scanning Microscope, LSM) LSM 700 (Zeiss) im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie neue Einblicke in die zellulären Verhältnisse von Milz und Thymus nach Gabe einer immunsuppressiven Substanz liefert.

Im Folgenden werden einige Beispielbilder der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von ausgewählten immunhistochemischen Biomarkern im Milz und Thymus präsentiert (Abb.17 N - Q).

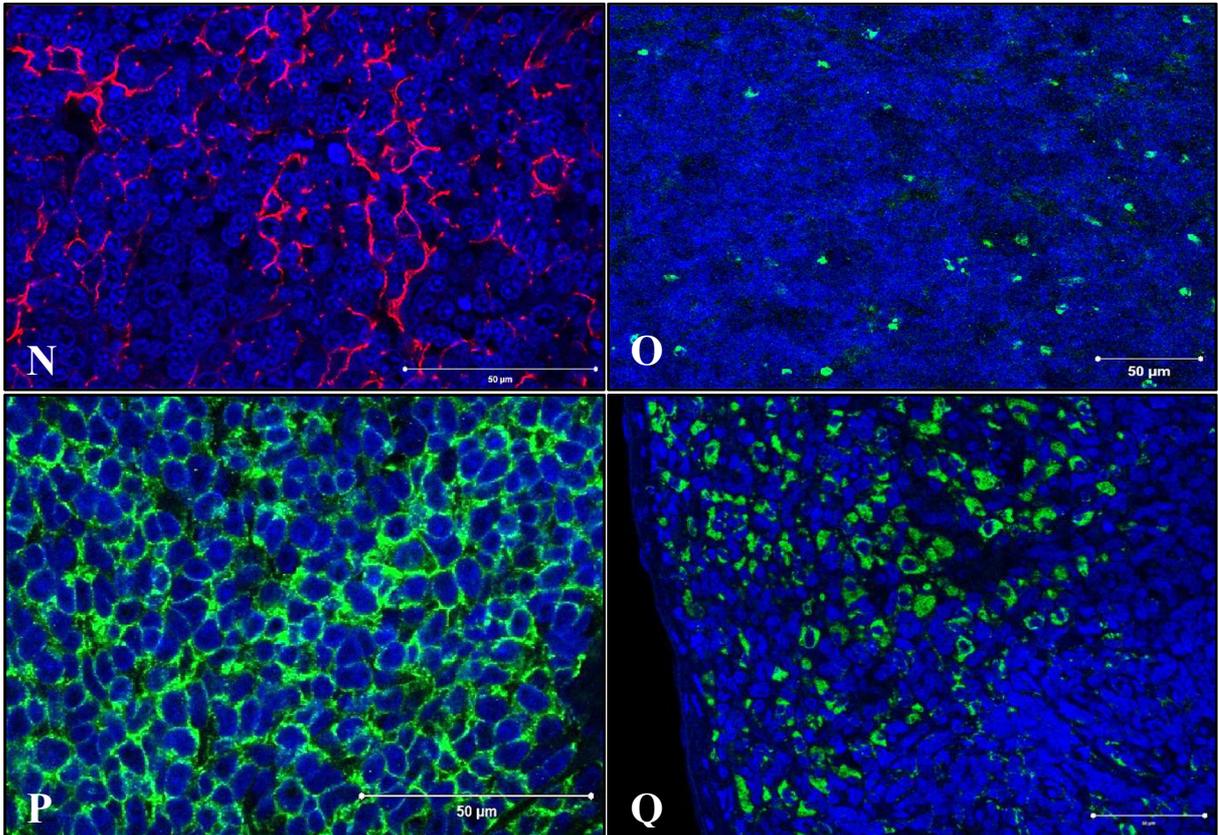


Abb.17 N-Q Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von ausgewählten Biomarkern in Milz und Thymus.

- N:** Zytokeratin (rot, AF594) im Thymus, DAPI (blau) (40x)
- O:** Caspase-3 (grün, AF488) im Thymus, DAPI (blau), (20x)
- P:** CD79 (grün, AF488) in der Milz DAPI (blau) (40x)
- Q:** CD68 (grün, AF488) in der Milz, DAPI (blau) (40x)

Da mithilfe der Objektive (20 – bzw. 40 - fache Vergrößerung der Präparate) nur ein Teil des Organs auf dem Objektträger betrachtet werden konnte, wurde der „*Tile Scan*“-Modus (Mosaik-Scan) verwendet (Abb.18). Mithilfe des „*Tile Scans*“ kann durch zuvor manuell bestimmten Punkten auf dem Objekt mehrere Bilder generiert werden, die der LSM 700 zu einem Bild zusammenfügt. Somit konnte ein Bild eines gesamten Organschnittes von Milz und Thymus entstehen, wie es in der Durchlichtmikroskopie in kleiner Vergrößerung auch möglich ist. Dies stellte allerdings einen hohen zeitlichen Aufwand dar.

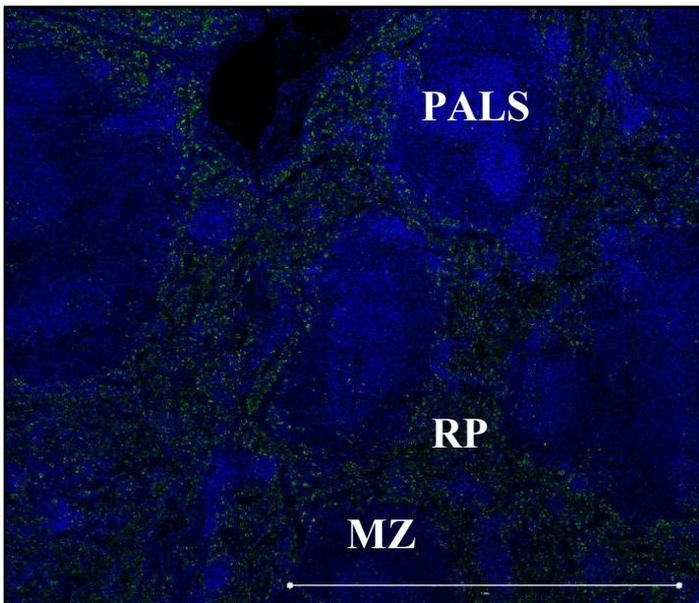


Abb.18 *Tile Scan*-Ausschnitt am LSM 700 in der Milz.
 CD68 (grün, AF488), DAPI (blau) (40x).
 RP: rote Milzpulpa, MZ: Marginalzone,
 PALS: periarterioläre lymphatische Scheiden

Die Fluoreszenz-Färbungen wurden aufgrund der aufwändigen Bedienung des LSM 700 und somit aus Zeitgründen nur an Kontrolltieren durchgeführt, um eine erste Abschätzung dieser Methode zu erhalten.

In der Tabelle 31 sind die wichtigsten Vor- und Nachteile der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zur Lichtmikroskopie dargestellt. Die Durchführung der IHC-Färbung nach der ABC dauert länger als die Fluoreszenz-Färbung, da ein paar zusätzliche Schritte im Protokoll (wie Entwässerung) durchgeführt werden. Allerdings können die gefärbten Schnitte mit Fluoreszenz-Farbstoffen erst am nächsten Tag am Mikroskop betrachtet werden, da die Härtung mit einem speziellen Eindeckmittel mindestens 24 Stunden dauert. Zudem sollte ab der Verwendung der Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper der Raum verdunkelt werden, um vorzeitiges Ausbleichen zu verhindern. Die Bedienung des konfokalen LSM 700 erfordert aufgrund seines komplexen Aufbaus viel Erfahrung von seinen Nutzer. Außerdem ist die Orientierung im Organ schwieriger als im Lichtmikroskop.

Eine störende Hintergrundfärbung, die eine Befundung erschweren kann, ist mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern schwieriger in den Griff zu bekommen. Hier kann es u.a. zum Phänomen der Autofluoreszenz kommen, die eine unspezifische Bindung im Gewebe auslöst.

Eine histomorphologische Untersuchung des Immunorgans ist mit der konventionellen lichtmikroskopischen Betrachtung einfacher und schneller, aber zytologische Details wie Zellkerne können genauer mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie gesehen werden. Ein weiterer Nachteil der Fluoreszenz-Färbung ist deren Stabilität.

Während die Fluoreszenz in den Paraffinschnitten etwa ein halbes Jahr stabil ist, ist die Färbung nach der ABC-Methode nach fachgemäßer Lagerung lebenslänglich haltbar.

Letztendlich fällt auf, dass mengenmäßig mehr Vorteile in der Lichtmikroskopie liegen, weshalb eine weitere umfassendere Untersuchung dieser Methode nicht weiter geführt wurde.

Tab.31 Vergleich von (Durch-)Lichtmikroskopie und konfokale Fluoreszenzmikroskopie für die Untersuchung von Paraffinschnitten der lymphatischen Organe.

| Eigenschaft | Lichtmikroskopische Betrachtung von Paraffinschnitten | Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an Paraffinschnitten |
|--|--|--|
| Praktischer/Zeitlicher Aufwand der Färbung | + | - |
| Bedienung des Mikroskops | + | - |
| Orientierung für Bildanalyse | + | - |
| Hintergrundfärbung | + | - |
| Histomorphologie des Immunorgans | + | - |
| Zytologische Details | - | + |
| Stabilität der Färbung | + | - |

Zusätzlich wurden erste Versuche an Gefrierschnitte durchgeführt, dessen Herstellung und Weiterbehandlung aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit nicht geradewegs ging (siehe 2.2.1.5, 2.2.2.3). Hier war insbesondere eine erhöhte Hintergrundfärbung zu sehen, die schwierig zu reduzieren war. Ein Erfolg hatte die Immunfluoreszenz-Färbung an Gefrierschnitten gebracht: Die Detektion von T-Helferzellen mit dem Antikörper CD4, der speziell für Gefrierschnitte entwickelt wurde (siehe Abb. 19).

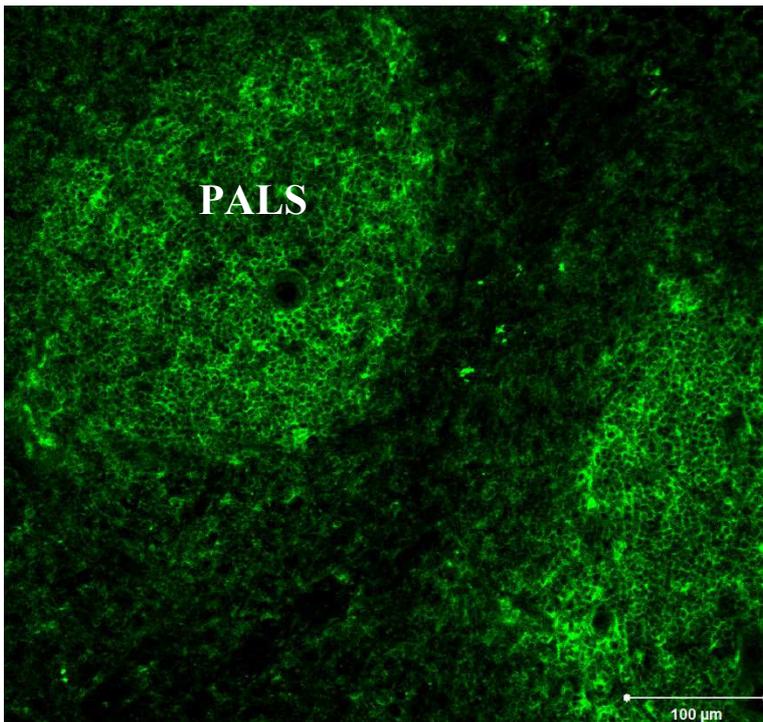


Abb. 19 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an einem Gefrierschnitt der Milz: CD4-Färbung der T-Helferzellen

Teil 2: Subakute orale Toxizitätsstudie in Ratten

3.4 Studienplanungen auf Basis der Ergebnisse im Archivmaterial

Die Verwendung von immunhistologischen Biomarkern an archivierten Studien, in denen Ratten über 14 - 28 Tage oral mit immunmodulierenden Substanzen behandelt wurden, ergaben eine Optimierung bei der Auswertung immuntoxischer Untersuchungen. Obwohl das Organmaterial teilweise über 20 Jahre asserviert wurde, war es möglich, mit der Immunhistologie zusätzliche Informationen über die immuntoxischen Effekte in den lymphatischen Organen zu erhalten.

Um die Ergebnisse des technisch limitierten Archivmaterials mit neuen Ergebnissen vergleichen zu können, wurde eine 28-Tage orale Toxizitätsstudie an Ratten geplant, die die immuntoxischen Effekte der bereits zuvor verwendeten Immunsuppressiva CSA in drei Dosierungen (1, 5, 25 mg/kg) sowie AZA in einer Dosierung (20 mg/kg) an zehn Tieren pro Gruppe untersuchen sollte. Die Organe, Zellsuspensionen und Seren der Tiere werden nach Versuchsende mithilfe von (erweiterten) Standardmethoden der (Immun-)Toxikologie und Methoden zur Bestimmung von hämatopoetischen Effekten untersucht. Die Ergebnisse der Immunhistologie werden anschließend mit den vorher erzielten Auswertungen an archivierten Studien verglichen (*proof-of-concept*).

3.4.1 Standarduntersuchungen in toxikologischen Studien

Die Daten zu Körper-, Organgewichten, Blutuntersuchungen, Mortalitäten, klinischen Befunden, makroskopischer Organuntersuchung und Histopathologie gehören zu den Standardprüfungen in toxikologischen Studien, um erste Informationen zu einer möglichen organspezifischen oder systemischen Toxizität einer Substanz zu erhalten.

Eine Übersicht der wichtigsten toxikologischen Standarduntersuchungen liefert die Tabelle 32. Hierbei sind die Endpunkte aufgeführt, die zu einem möglichen Substanz-bedingten Effekt geführt haben, unter Angabe der niedrigsten Dosis, in der dieser Effekt aufgetreten ist (LOEL).

Tab.32 Übersicht der toxikologischen Standarduntersuchungen mit potenziell Substanz-bedingten Effekten unter Angabe der LOELs.

| Endpunkt | Ergebnis | Dosis [mg/kg] |
|-------------------------------|--|--------------------------|
| Mortalität | Keine | - |
| Klinischer Befund | Keine | - |
| Körpergewichte | CSA ↓ | 25 |
| | AZA ↑ | 20 |
| Hämatologie | CSA: PTT, PT ↓ | 1 |
| | HB, HCT, MCV, THRO, PTT ↓; MONO ↑ | 25 |
| | AZA: HB, HCT, PT ↓ | 20 |
| Klinische Pathologie | CSA: ASAT, LDH, Protein, Albumin, AGQ, P ↓; CHOL, TRIG, UREA, Bili-t ↑ | 25 |
| | AZA: APh, LDH, CK,, Bili-t, AGQ ↓; CHOL, Protein, K, Ca ↑ | 20 |
| | | |
| Organgewichte | CSA: Leber, Nieren ↑ | 25 |
| | AZA: Herz, Leber ↑; Thymus ↓ | 20 |
| Makroskopie | CSA: keine dosisabhängigen makroskopischen Befunde | - |
| | AZA: Thymus: verkleinerter, Leber: farblich verändert; Milz: raue Oberfläche | 20 |
| Histopathologie (H&E, IHC) | CSA: Thymus: <i>Tingible body</i> -Makrophagen | 1 |
| | Thymus: Rinde/Mark Verhältnis ↑, Fläche Mark ↓ | 5 |
| | Milz: weiße/rote Pulpa Verhältnis ↓, Markante Grenze weiße Pulpa/Marginalzone, CD3 ⁺ /CD8 ⁺ Zellen in der PALS ↓ | |
| | Mesent. Lymphknoten: Zellularität Paracortex ↓ <i>Peyer-Plaques</i> : interfollikuläre Zellularität ↓ | 25 |
| | Herz: degenerative vaskuläre Veränderungen | |
| | Leber: hepatozelluläre Veränderungen (Glykogen ↑) | |
| | Pankreas: Atrophie, vakuolisierte β-Zellen | |
| | Nieren: tubuläre Basophilie und Vakuolisierung | |
| | AZA: Knochenmark (Sternum): Erythroid/Myeloid Verhältnis ↑ | 20 |
| | Thymus: Atrophie (hauptsächlich Rinde) Leber: minimale bis leichte hepatozelluläre zytoplasmatische Veränderung | |

3.4.2 Histopathologische Ergebnisse

Im H&E-Schnitt konnte im Thymus das erhöhte Rinde/Mark-Verhältnis aus den Archivstudien (Abschnitt 3.2.2) bei CSA bestätigt werden. Eine verkleinerte Fläche des Thymusmarks war in der mittleren/oberen Dosis CSA zu sehen. Der empfindlichste Befund im Thymus war eine erhöhte Anzahl an Makrophagen, die bereits ab 1 mg/kg CSA in der Hälfte der Tiere festgestellt wurde. In der Milz waren Veränderungen hauptsächlich in den mit CSA behandelten Tieren zu finden. Das Verhältnis von weißer und roter Pulpa hatte sich ab 5 mg/kg CSA erniedrigt. Die verminderte Fläche der PALS-Region als auch die der Follikel deutete sich ab 5 mg/kg CSA an, war jedoch deutlich in der oberen Dosis CSA zu erkennen. Die Grenze zwischen weißer Pulpa und Marginalzone war bei Ratten aufgrund einer besonderen Zellpopulation („marginale Metallophile“) insbesondere im Bereich der Follikel deutlich abgegrenzt. Nach CSA war diese Grenzschicht besonders prominent, wahrscheinlich durch ein Zusammenfallen der weißen Pulpa hervorgerufen. In der oberen Dosis CSA war dieser Befund in neun von zehn Tieren zu sehen.

AZA führte zu einer deutlichen Thymusatrophie, die gekennzeichnet war durch verminderte Fläche und Zellularität in der Rinde, unklare Abgrenzung zwischen Rinde und Mark, sowie eine erhöhte Anzahl von Makrophagen. Eine verkleinerte Fläche des Thymusmarkes war ebenfalls bei AZA gegeben (Tab.33).

In dieser Studie konnte mit allen eingesetzten immunhistochemischen Markern aussagekräftige Färbungen in Milz und Thymus erzielt werden. Der Biomarker CD68 konnte eine erhöhte Anzahl von Makrophagen sowohl in der Milz als auch im Thymus feststellen. Die Makrophagen in der Thymusrinde waren in fast doppelt so vielen Tieren als in den Kontrolltieren ab 5 mg/kg CSA vermehrt. Die CD79-Färbung konnte im Thymus folgenden substanz-bedingten Effekt aufdecken: In allen CSA-Dosen sind weniger CD79⁺-B-Zellen im Thymusmark im Gegensatz zur Kontrolle vorhanden. Als letztes wurde mit der Färbung von Caspase-3 deutlich, dass nach 1 mg/kg CSA weniger apoptotische Zellen im Thymus waren. Die Färbung der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen ergab in der Milz von CSA-behandelten Tieren eine verringerte Zellularität und Fläche der PALS ab 5 mg/kg CSA. Ebenfalls reduzierte T-Zellen in bestimmten Kompartimenten der Milz konnte mit der Färbung CD3 gezeigt werden. Die CD3⁺-T-Zellen waren in der Marginalzone und der roten Pulpa in der oberen Dosis CSA vermindert. Alle Tiere der oberen Dosis CSA wiesen außerdem geringere CD3⁺-T-Zellen in der PALS auf. Auffällig war zudem, dass eine veränderte Morphologie der Epithelzellen im Thymus (Zytokeratin) nach CSA vorhanden war. Die Zellen hatten kürzere, dickere oder deformierte Epithel-Fortsätze. Dies war bereits in den Kontrollen zu sehen, allerdings war dieser Effekt mit steigender Dosis mit einem höheren Grad betroffen (Tab.34).

Die Makrophagen waren sowohl in der Thymusrinde als auch im Mark der AZA-behandelten Tiere deutlich erhöht im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Im Gegensatz sind weniger CD79⁺-B-Zellen im Thymusmark gegenüber der Kontrolle vorhanden. Mithilfe des Biomarkers Zytokeratin konnten verschiedene Veränderungen nach der Gabe von AZA an den Epithelzellen von (fast) allen Tieren beobachtet werden: weniger epithelfreie Regionen und eine erhöhte Dichte des Epithelnetzwerkes. Die Färbung von Caspase-3 machte deutlich, dass nach der Behandlung mit AZA weniger und vergrößerte apoptotische Zellen im Thymus waren. In der Milz war eine reduzierte Zahl an CD8⁺-T-Zellen in der roten Pulpa und eine verringerte Zellularität und Fläche der PALS nach 20 mg/kg AZA zu sehen. Alle Tiere der AZA-Gruppe wiesen außerdem geringere CD3⁺-T-Zellen in der PALS auf. In der Marginalzone der Milz waren deutlich mehr Makrophagen in den AZA-behandelten Tieren im Gegensatz zu den Kontrolltieren zu finden.

Tab.33 Ergebnisse der H&E-Färbung von Cyclosporin A und Azathioprin.

| CSA und AZA | | | | | |
|--|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 K | 02 CSA | 03 CSA | 04 CSA | 05 AZA |
| | 0 | 1 | 5 | 25 | 20 |
| Geschlecht | F | F | F | F | F |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Histologischer Befund H&E | Absolute Inzidenzen | | | | |
| Thymus Rinde/Mark Verhältnis ↑ | 0 | 0 | 7 | 10 | 0 |
| Thymus Rinde/Mark Verhältnis ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| Thymus Fläche Rinde ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Thymus Zellularität Rinde ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Thymus Fläche Mark ↓ | 0 | 0 | 8 | 10 | 9 |
| Thymus Makrophagen ↑ | 1 | 5 | 9 | 10 | 1 |
| Thymus Unklare Abgrenzung Rinde/Mark | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Milz weiße/rote Pulpa Verhältnis ↓ | 1 | 0 | 5 | 7 | 2 |
| Milz Fläche PALS ↓ | 0 | 0 | 2 | 9 | 2 |
| Milz Fläche Follikel ↓ | 0 | 0 | 1 | 7 | 2 |
| Milz Markante Grenze weiße Pulpa/Marginalzone | 0 | 0 | 1 | 9 | 0 |

Tab.34 Ergebnisse der IHC-Färbung von Cyclosporin A und Azathioprin.

| CSA und AZA | | | | | |
|--|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Dosisgruppe mg/kg | 01 K | 02 CSA | 03 CSA | 04 CSA | 05 AZA |
| | 0 | 1 | 5 | 25 | 20 |
| Geschlecht | F | F | F | F | F |
| Anzahl Tiere / Anzahl untersuchter Organe | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Immunhistochemischer Befund | Absolute Inzidenzen gesamt | | | | |
| Thymus CD68 Makrophagen Rinde ↑ | 3 | 5 | 7 | 6 | 9 |
| Thymus CD68 Makrophagen Mark ↑ | 2 | 3 | 3 | 0 | 8 |
| Thymus CD79 B-Zellen Mark ↓ | 4 | 7 | 10 | 10 | 9 |
| Thymus Zytokeratin Epithelfreie Regionen ↓ | 7 | 6 | 5 | 5 | 10 |
| Thymus Zytokeratin Dichte Epithelnetzwerk ↑ | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| Thymus Zytokeratin Veränderte Morphologie Epithelzellen | 10* | 10* | 10* | 10* | 0 |
| Thymus Caspase-3 Apoptotische Zellen ↑ | 5 | 1 | 6 | 6 | 0 |
| Thymus Caspase-3 Vergrößerte apoptotische Zellen | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Milz CD8 T-Zellen rote Pulpa ↓ | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Milz CD8 Zellularität PALS ↓ | 0 | 0 | 6 | 9 | 8 |
| Milz CD8 Fläche PALS ↓ | 0 | 0 | 7 | 10 | 7 |
| Milz CD3 T-Zellen Marginalzone ↓ | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 |
| Milz CD3 T-Zellen rote Pulpa ↓ | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 |
| Milz CD3 T-Zellen PALS ↓ | 0 | 1 | 2 | 10 | 10 |
| Milz CD68 Makrophagen Marginalzone ↑ | 2 | 2 | 3 | 1 | 7 |

* Je höher die Dosis, umso höher der Schweregrad der veränderten Epithelzellen (dosisabhängiger Effekt)

Die Ableitung eines Schwellenwertes für die mit CSA behandelten Tiere ergab ein LOEL von 1 mg/kg (unterste Dosis) im Thymus für jeweils beide Färbungen (H&E und IHC) aufgestellt werden. Dieser LOEL bezieht sich auf die erhöhten Makrophagen im Thymus.

3.4.3. Hauptkomponentenanalyse und *Heatmap*-Darstellung als Methode zur Auswertung und Visualisierung komplexer großer toxikologischer Datenmengen

Die Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal component analysis*, PCA) wird eingesetzt, um große komplexe Datenmengen einzuordnen, zu vereinfachen und bildlich darzustellen. Ein bekanntes Einsatzgebiet ist die mechanistische Toxikologie, die mit dieser Methode versucht, Genexpressionsdaten zu *clustern* (d.h. Gengruppen zusammen zu fassen, die gleiche physiologische Aufgaben im Körper besitzen). Diese Methode ist in toxikologischen Standardprüfungen bisher wenig bekannt und sollte in dieser Arbeit ausgewählte Daten aus klinischer Chemie, Hämatologie, Organ- /Körpergewichte und Histopathologie zusammenfassen und vereinfachen. Außerdem sollte für die vorliegende subakute Toxizitätsstudie die Methode eingesetzt werden, um ihre Anwendbarkeit zu prüfen und neue Aufschlüsse zu erhalten, die bei reiner Betrachtung der Inzidenzen und Schweregrade der einzelnen Befunde nicht erkennbar gewesen wären. Sie wurde zudem genutzt, um histologische Effekte in verschiedenen Organen, deren Umfang über das Maß von Effekten in Routinestudien aufgrund des Einsatzes der *Enhanced Histopathology* und der Immunhistochemie deutlich hinaus ging, kombiniert mit weiteren Studienergebnissen zu analysieren.

Die Hauptkomponentenanalyse diente zur Gruppierung der umfangreichen Datensätze der Befunde. Das System bezog in die multidimensionale Befundstruktur Ebenen ein, die möglichst viele Effekte enthielten. Die Darstellung erlaubt Aussagen, in wieweit Dosisgruppen in ihren Befunden übereinstimmen. Schließlich können ebenfalls Individuen erkannt werden, die innerhalb ihrer Gruppe hinsichtlich der Konstellation oder Schwere der Befunde eine Sonderstellung einnehmen und die in konventionellen Datenanalysen als „Ausreißer“ klassifiziert worden wären.

In der Abb.20 sind ausgewählte toxikologische Parameter aus Histologie, Klinische Chemie, Hämatologie und Körper-/Organgewichtsmessungen in einer jeweiligen Dosisgruppe zusammengefasst dargestellt. Jedes Symbol, das sich in Form und Farbe unterscheidet, stellt die Dosisgruppen Kontrolle, CSA 1/5/25 mg/kg und AZA 20 mg/kg dar.

Diese Hauptkomponentenanalyse verdeutlicht, dass sich die Tiere aus der oberen Dosisgruppe mit CSA und die mit AZA behandelten Tiere von den übrigen Gruppen klar unterscheiden. Während die Dosisgruppen 1 und 5 mg/kg CSA in der Nähe der Kontrollgruppe liegen, befinden sich die AZA und die CSA 20 mg/kg-Gruppen deutlich entfernt von diesem Bereich. Da diese beiden Dosisgruppen in einem dreidimensionalen (Komponenten 1, 2 und 3) Koordinatensystem in unterschiedliche Richtungen bewegen, stellen sich hier unterschiedliche Behandlungseffekte dar. Hinsichtlich von Individuen, die eine andere Lage als die übrigen Tiere ihrer Behandlungsgruppe einnehmen, ist hier zum einen ein Tier der mittleren Dosis CSA in unmittelbarer Nachbarschaft der hohen Dosis gelegen. Ein Tier der hohen Dosis CSA liegt in dicht benachbart zu den mit AZA behandelten Tieren. Die AZA-Gruppe zeigt eine relativ einheitliche Position im Koordinatensystem. Ebenso sind die Kontrollen und die Tiere der unteren Dosis CSA in einer einheitlichen Position zu finden.

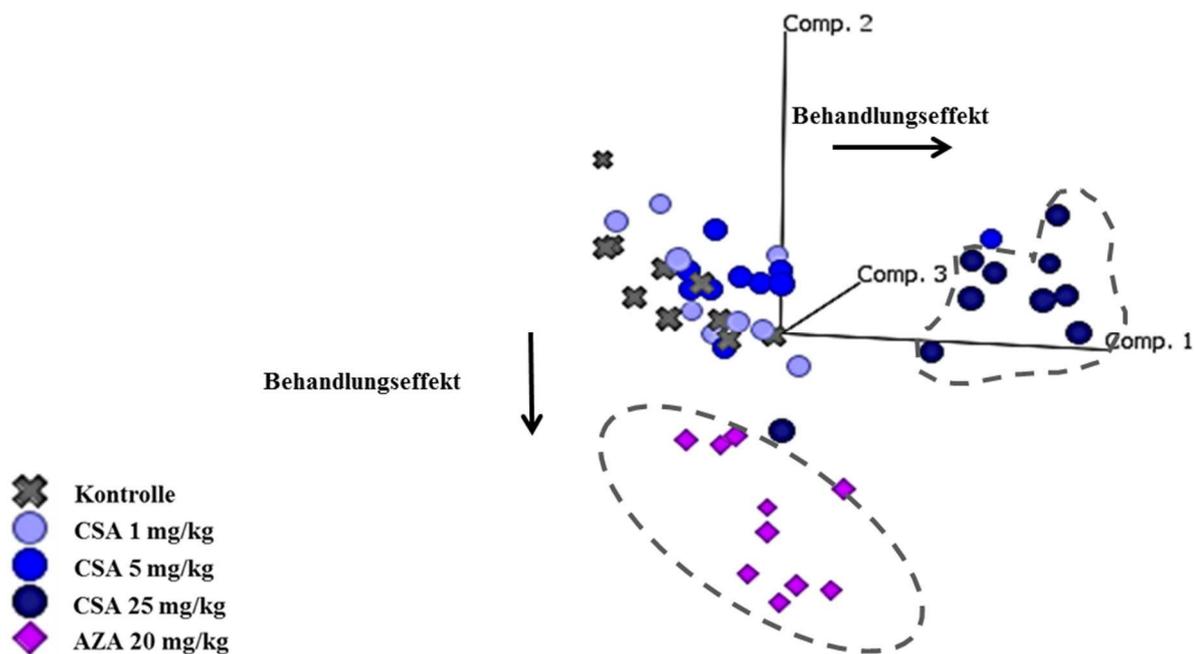


Abb.20 Hauptkomponentenanalyse verschiedener toxikologischer Parameter gruppiert nach Dosisgruppen. Generierung mit der Genedata Expressionist Software.

Die nächsten drei Darstellungen 20A – C zeigen die Häufigkeit des Auftretens ausgewählter Befunde aus den jeweiligen Untersuchungspunkten Histopathologie, Hämatologie/Klinische Chemie und Körper-/Organgewichte für jedes Tier einer Dosisgruppe. Diese Darstellung ist eine ebenfalls mit dem Programm *GeneData* erstellte sogenannte *Heatmap*, die eine Visualisierung von standardisierten Werten ermöglicht. Diese Heatmap ist ebenfalls aus der Genexpressionsanalyse bekannt.

Der Score auf der linken Seite zeigt einen Farbverlauf, der die Ausprägung eines bestimmten Endpunktes darstellt. Farben, die in der unteren Score liegen, weisen eine geringe Ausprägung eines Befundes auf. Eine größere Ausprägung eines Befundes ist an Farben zu erkennen, die an der oberen Score liegen. Die berechneten Werte sind immer auf die Werte der Kontrolltiere bezogen.

Die Darstellung der histopathologischen Befunde in Abb. 21A stellt einen Sonderfall dar, da es sich um die Visualisierung von kategorischen Daten (angegeben in Schweregrad 1 – 5 eines histopathologischen Befundes) handelt. Die schwarzen Flächen bedeuten, dass kein Befund im jeweiligen Tier vorlag. Mit dieser Abbildung können folgende Aussagen zu den histopathologischen Befunden getroffen werden:

Es gab vier Befunde (erhöhtes erythroid-myeloides Verhältnis im Knochenmark, Zytoplasma-Veränderungen in der Leber, verringertes Rinde/Mark Verhältnis im Thymus, und erniedrigte Zellularität in der Thymus-Rinde), die fast ausschließlich in den Tieren auftraten, die mit 20 mg/kg AZA behandelt wurden.

Die Tiere der oberen Dosis CSA (25 mg/kg) waren hauptsächlich durch sieben Befunde charakterisiert: Hypertrophy der Hepatozyten in der Leber, kortikale basophile Tubuli und tubuläre Vakuolisierung in der Niere, vakuolisierte Inselzellen im Pankreas, vaskuläre Veränderungen im Herzen und verkleinertes PALS- und Follikel-Gebiet in der Milz.

Die Variabilität dieser Effekte innerhalb einer Dosisgruppe ist hoch. Dies ist an den verschiedenen Farbausprägungen zu erkennen, die unterschiedliche Schweregrade eines Befundes aufzeigen.

Im Thymus sind anhand dieser Abbildung dosisabhängige Effekte zu erkennen: Ein erhöhtes Rinde/Mark-Verhältnis war ab 5 mg/kg CSA zu verzeichnen, welches in allen Tieren der Dosisgruppe 25 mg/kg CSA in einem höheren Schweregrad ausgeprägt war. Die *Tingible body*-Makrophagen im Thymus waren ab 1 mg/kg CSA festzustellen. Der Schweregrad dieses Befundes erhöhte sich bis zur oberen Dosis CSA.

Auf den ersten Blick auf die Abbildung 21B ist eine hohe Variabilität zwischen den Effekten und den Dosisgruppen zu erkennen.

Zunächst besteht ein erkennbarer Unterschied in den Effekten der verschiedenen Blutparameter zwischen den beiden Substanzen CSA und AZA. Der einzige erkennbare Effekt in den Tieren, die mit AZA behandelt wurden, liegt im erhöhten Cholesterinwert. Die Tiere, die mit CSA behandelt wurden, zeigten sehr uneinheitliche Ausprägungen von Effekten. In den meisten Fällen waren Einzeltiere betroffen. Ein einheitlicher Effekt innerhalb einer Dosisgruppe lag bei den Werten zu Cholesterin, Triglycerin und Gesamtbilirubin vor.

Hier war in fast allen Tieren der oberen Dosis CSA erhöhte Werte vorhanden. Des Weiteren besteht ein merklicher Zusammenhang zwischen den Werten der Leukozyten und Lymphozyten, der sich insbesondere in der unteren Dosis CSA bemerkbar machte. In sieben Blutparametern (ASAT, LDH, Keratinkinase, AGQ, Albumin, HB, HCT) waren in fast allen Tieren der oberen CSA-Dosis sehr niedrige Werte zu finden.

Die Abbildung 21C zeigt die *Heatmap*-Darstellung der Körper- und Organgewichte. Hier erscheinen die hohen Score-Werte der Leber- und terminalen Körpergewichte in der oberen CSA-Dosis auffällig. Ebenfalls erhöhte Werte waren in den meisten Tieren der AZA-Gruppe zu sehen. Während die AZA-Tiere sehr niedrige Werte im Thymusgewicht zeigten, hatte die untere Dosis an CSA erhöhte Werte für die Organgewichte Thymus und Milz bewirkt.

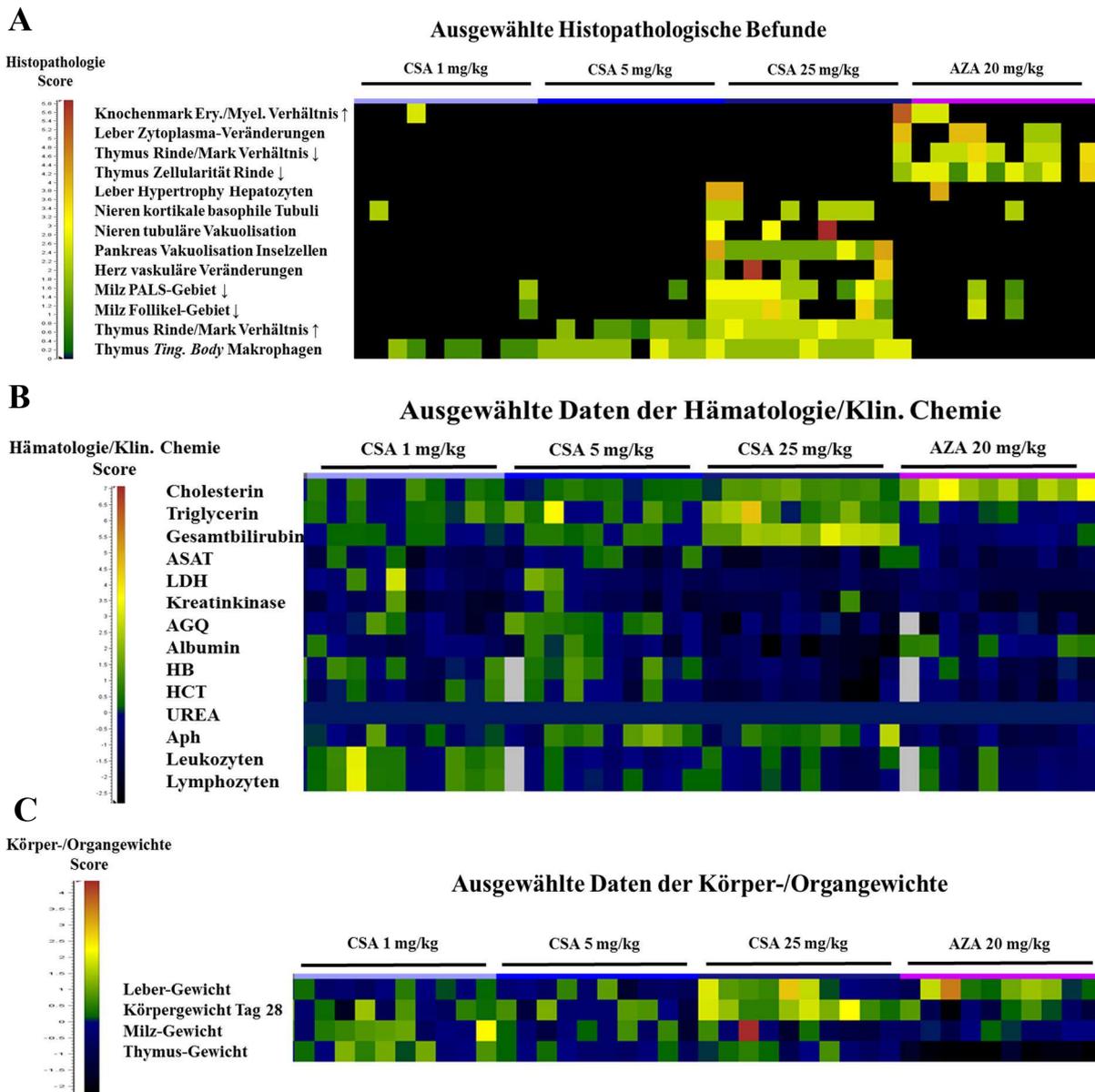


Abb.21 Heatmap-Darstellung ausgewählter toxikologischer Standard-Untersuchungen. Generierung mit der Genedata Expressionist Software.

- A) Histopathologische Befunde
- B) Hämatologie und Klinische Chemie
- C) Körper- und Organgewichte

3.4.4 Untersuchungen der Immuntoxikologie

Untersuchungen zur Immuntoxizität gehören zu den zusätzlichen Untersuchungen in der Risikobewertung von Medikamenten oder Chemikalien und sind an Toxizitätsstudien mit wiederholter Gabe gekoppelt.

Zwei gängige immunologische Methoden zur Untersuchung einer immuntoxischen Substanz wurden in dieser *in vivo* Studie verwendet: Zum einen die Immunglobulin-Bestimmung im Serum, die die humorale Immunität untersucht und zum anderen die Subpopulationsanalyse von Immunzellen in lymphatischen Organen, die die Zell-vermittelte Immunität untersucht.

3.4.4.1 Immunglobulin-Bestimmungen im Serum

Die Immunglobuline sind Antikörper, die eine wichtige Komponente der humoralen Immunität ausmachen und sie geben Hinweise, wie gut das Immunsystem funktioniert.

Für die Bestimmung der Konzentrationen der Immunglobulin-Isotypen im Serum wurde ein Plattenlesegerätes verwendet. Die Abb. 22 zeigt drei Balkendiagramme, die jeweils die gemittelten Konzentrationen pro Dosisgruppe (n= 10 Tiere, Dreifachbestimmung pro Tier) der Immunglobuline IgA, IgG und IgM darstellt.

Während die Konzentration von IgA in den Dosisgruppen CSA 1- 25 mg/kg nahezu gleich blieb, war sie in den AZA-behandelten Tieren signifikant zur Kontrollgruppe erniedrigt. Signifikante Veränderungen in den IgG und IgM-Konzentrationen waren nur in den CSA-behandelten Tieren aufzufinden: In der Dosisgruppe 5 mg/kg CSA lag eine signifikante Erniedrigung der IgG-Konzentration im Gegensatz zu 1 mg/kg CSA vor. Die IgM-Konzentration war im Gegensatz dazu in den Dosierungen 1 und 5 mg/kg CSA erhöht.

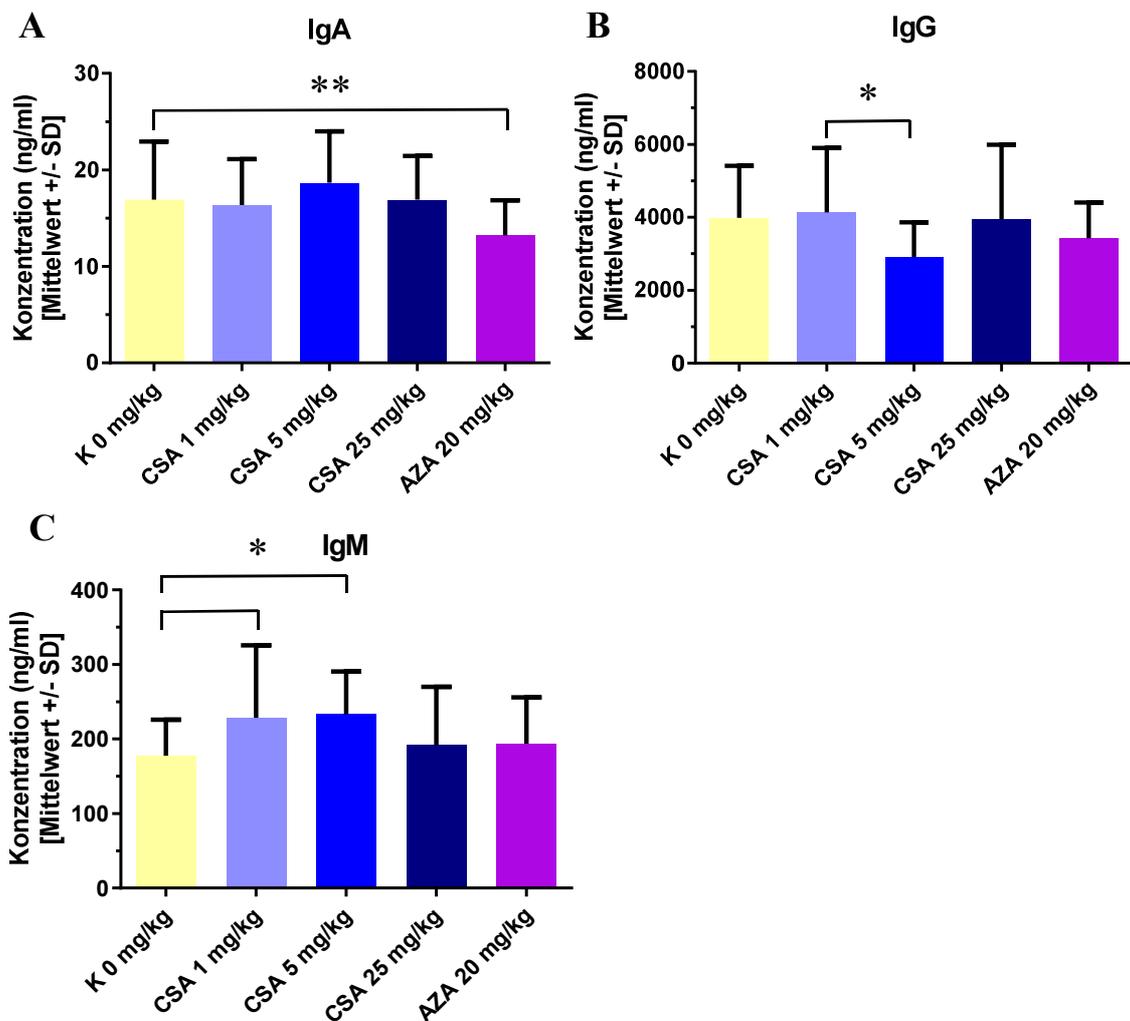


Abb.22 Konzentrationen der Immunglobuline im Serum.

A) IgA, B) IgG, C) IgM

n= 10 Tiere pro Dosisgruppe (Dreifachbestimmung); Signifikanzen: * $P \leq 0.05$ ** $P \leq 0.01$

3.4.4.2 Subpopulationsanalysen in lymphatischen Organen

In der Milz und den mesenterialen Lymphknoten wurden Subpopulationsanalysen mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Die Untersuchung von Subpopulationen immunkompetenter Zellen aus Zellsuspensionen dient zur Feststellung des Immunstatus der untersuchten Tiere. Die Phänotypisierung von Zellen erfolgt durch das direkte Markieren der Oberflächenantigene (*Cluster of Differentiation*, CD) mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Die Zellen wurden mit den Oberflächenmarkern für Leukozyten (CD45RC), T-Zellen [CD3 (total), CD5 (peripher)], zytotoxische T-Zellen und NK Zellen (CD8a), T-Helferzellen (CD4), B-Zellen (CD45RA) und Antigen-präsentierenden Zellen (MHC Class II) markiert. Für die Markierung relevanter Subpopulationen wurden vier Doppelfärbungen durchgeführt: CD4/CD45RC (CD4 total, CD45RC total und die Isoformen CD45RC low, CD45RC high), CD45RA/MHCII, CD5/CD8 (NK-Zellen sind CD5 negativ und CD8 positiv) und CD3/CD8. Diese Auswahl an lymphatischen Organen und Oberflächenmarkern zur Quantifizierung von Subpopulationszellen ist gegenüber den gültigen Richtlinien zur Bewertung der Immuntoxizität erweitert. Gemäß der EPA-Richtlinie „OPPTS 870.7800“ soll beispielsweise eine durchflusszytometrische Bestimmung von totalen B-/ T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen in der Milz oder peripherem Blut durchgeführt werden.

Die folgenden Abbildungen 23 (Milz) und 24 (mesenteriale Lymphknoten) stellen die prozentuale Menge bezogen auf die Kontrolltiere des Oberflächenantigens für jede Dosisgruppe dar. Die Sektionstage 1 und 2 wurden getrennt betrachtet, da sich die Ergebnisse teilweise unterschieden und die Standardabweichung zu groß gewesen wäre, wenn sie zusammengefasst würden.

Milz

Insgesamt unterschieden sich merklich in allen gezeigten Abbildungen (Abb.23 A-F) die Quantität der Zellen zwischen Sektionstag 1 und 2 in der Dosisgruppe CSA 1 mg/kg. Alle Tiere vom Sektionstag 1 der Dosisgruppe CSA 1 mg/kg hatten um etwa 50% höhere Werte als die vom Sektionstag 2. Dadurch konnten in allen Markern außer NK-Zellen signifikante Unterschiede der Tiere vom Sektionstag CSA 1 mg/kg zu anderen CSA-Dosisgruppen festgestellt werden.

Der einzige leichte (nicht-signifikanter) dosisabhängige Effekt von CSA-behandelten Tieren ist bei der Messung der NK-Zellen (Abb.23 F) zu sehen.

Mit steigender Dosis CSA wiesen die Tiere erhöhte Zahlen von NK-Zellen in der Milz auf (außer CSA 1 mg/kg, Sektionstag 1).

Es bestand kein merklich großer Unterschied zwischen den CSA- und AZA-behandelten Tieren in der Ausprägung aller gemessenen Oberflächenmarkern in der Milz. Des Weiteren liegen die meisten Werte der Oberflächenmarker im Bereich der Kontrolle (100%).

Bei den folgenden Markern war kein signifikanter Unterschied durch die Behandlung mit CSA zu sehen: CD45RC total (Leukozyten), CD45RA (B-Zellen) und MHC II (Antigen-präsentierende Zellen).

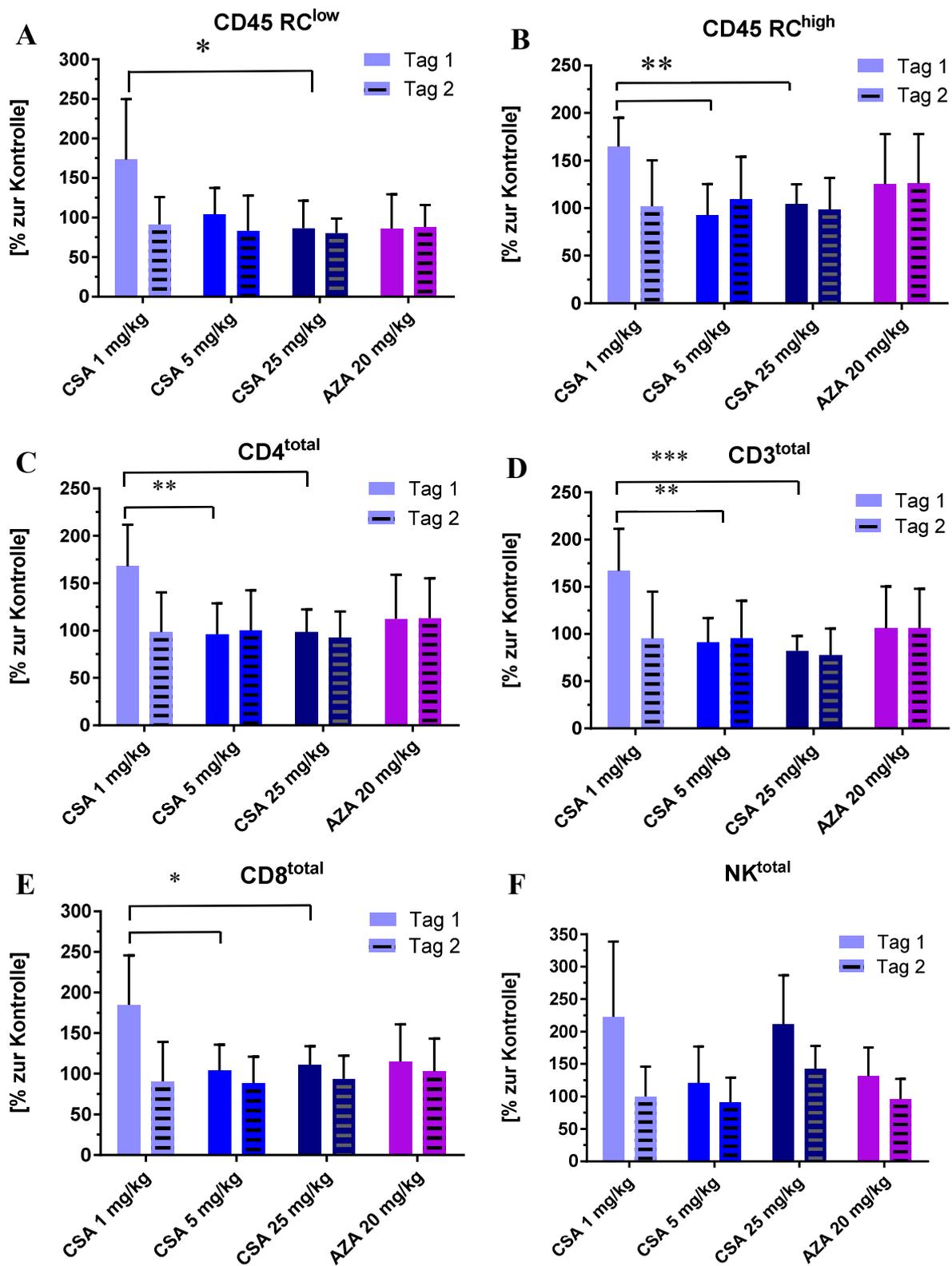


Abb.23 A-F Durchflusszytometrische Analysen in der Milz an Sektionstag 1 und 2.

- A) CD45RC low,
- B) CD45RC high (Leukozyten),
- C) CD4 total (T-Helferzellen),
- D) CD3 total (T-Zellen),
- E) CD8 total (zytotoxische T-Zellen),
- F) NK total (Natürliche Killerzellen)

Signifikanz: * $P \leq 0.05$ ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$

Mesenteriale Lymphknoten

Die Untersuchung der Subpopulationen in mesenterialen Lymphknoten zeigte deutlichere Unterschiede in den Dosisgruppen von CSA-behandelten Tieren und zwischen CSA und AZA im Gegensatz zur Untersuchung in der Milz (Abb. 24 A-F).

Die Abb.24A und B veranschaulicht die auffallend unterschiedlichen Ausprägungen der Leukozyten-Isoform $CD45RC^{low}$ und der gesamten Leukozytenzahl $CD45RC^{total}$ in den Dosisgruppen und zwischen den Sektionstagen. Das Antigen $CD45RC^{low}$ war in der Dosisgruppe CSA 25 mg/kg um ca. 80 % an beiden Sektionstagen verglichen zur Kontrolle reduziert. Zu dieser Dosisgruppe bestand für Sektionstag 1 eine signifikante Reduktion von $CD45RC^{low}$ um etwa 60% zu den zwei Dosisgruppen CSA 1 und 5 mg/kg. Auffallend war zudem, dass in der unteren Dosisgruppe CSA im Gegensatz zu allen anderen durchflusszytometrischen Messungen (Milz und Lymphknoten) der Sektionstag 2 höhere Werte als Sektionstag 1 aufzeigte. Allerdings war in dieser Dosisgruppe die Standardabweichung am Sektionstag 2 höher als am Sektionstag 1. Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 24B zum Antigen $CD45RC^{total}$ (low und high) einen anderen Balkenverlauf. Insgesamt wiesen alle Dosisgruppen der beiden Substanzen AZA und CSA vergleichbare Werte (ohne Signifikanz) in der Messung von $CD45RC^{total}$ auf. Die Tiere in den Sektionstagen 1 und 2 unterschieden sich stark voneinander: Die Tiere vom Sektionstag 1 zeigten in allen Dosisgruppen etwa doppelt so hohe Mengen an Leukozyten im Vergleich zur Kontrolle. Die Tiere vom Sektionstag 2 zeigten eine ähnliche Menge (CSA 1, 5 mg/kg, AZA 20 mg/kg) oder etwas weniger Leukozyten (CSA 25 mg/kg) im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die Messung der T-Zellen CD3, CD4 und CD8 (gesamt, T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen) und NK-Zellen ergab vergleichbare Werte wie die Messung von $CD45RC^{total}$ (Abb.24 C-F). Ein erkennbarer Unterschied ist allerdings bei den NK-Zellen zu sehen: Diese hatten im Vergleich zu den anderen Zellmessungen erhöhte Werte in der Dosisgruppe CSA 25 mg/kg am Sektionstag 1 vorliegen, sodass ein dosisabhängiger Effekt zu vermuten ist.

Bei den folgenden Marker war kein merklicher Unterschied durch die Behandlung mit CSA und AZA zu den Kontrolltieren zu sehen: CD45RC^{high} (Leukozyten), CD45RA (B-Zellen) und MHC II (Antigen-präsentierende Zellen).

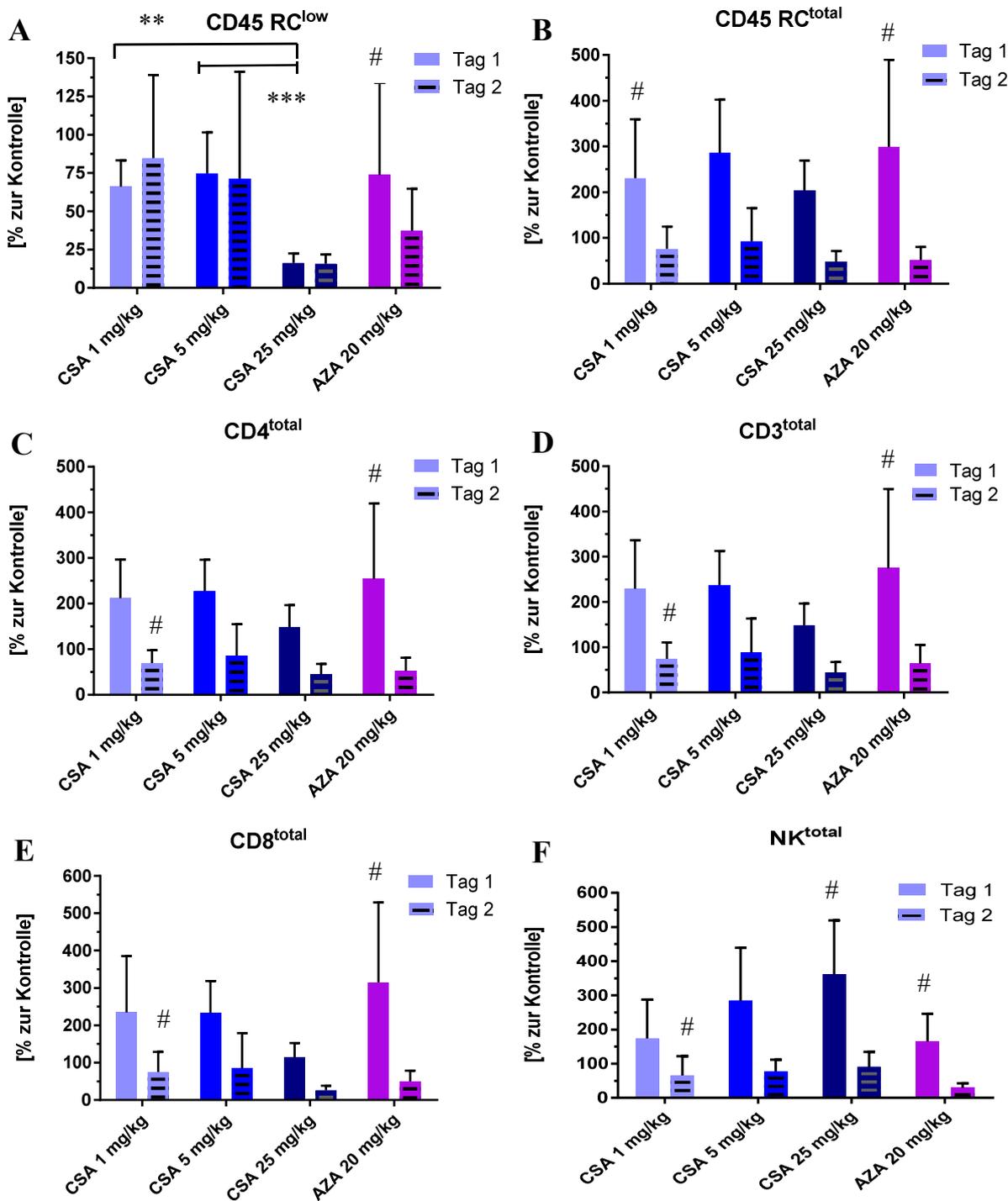


Abb.24 A-F Durchflusszytoemtrische Analysen im mesenterialen Lymphknoten.

- A) CD45RC^{low},
- B) CD45RC^{total} (Leukozyten),
- C) CD4^{total} (T-Helferzellen),
- D) CD3^{total} (T-Zellen),
- E) CD8^{total} (Zytotoxische T-Zellen),
- F) NK^{total} (Natürliche Killerzellen)

4/5 Tiere wurden in der Dosisgruppe für die Berechnung mit einbezogen.

Signifikanzen: ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$

3.5 Untersuchungen des hämatopoetischen Systems hinsichtlich hämatotoxischer

Eigenschaften

In der präklinischen Entwicklungsphase von Medikamenten wird in manchen Fällen die Hämatopoese im Knochenmark analysiert (*case-by-case* Vorgehen), wenn ein Effekt auf das blutbildende System vermutet wird. Hierbei werden neben der hämatologischen Untersuchung im peripheren Blut (Standarduntersuchung in Toxizitätsstudien), H&E-Schnitte von Femur und Sternum sowie gefärbte Knochenmarksaustrieche des Femurs mikroskopisch ausgewertet. Die histopathologische Untersuchung erfordert allerdings viel Zeit, Genauigkeit und ein ausgeprägtes Expertenwissen, um die verschiedenen hämatopoetischen Vorstufen zu unterscheiden und Veränderungen festzustellen, die auf eine Toxizität des Knochenmarks hinweisen. Da das primäre Zielorgan von AZA die Lymphopoese ist, im toxischen Bereich aber auch andere Zelllinien des weißen Blutbildes supprimiert werden können, war die Entwicklung von neuen (Screening-)Methoden zur Untersuchung des hämatopoetischen Systems ein weiterer Fokus in dieser Arbeit. Hierbei wurden Standard-Methoden (Histopathologie von Knochen und Knochenmarksaustriechen, Subpopulationsanalyse von Knochenmarkszellen) etablierte Methoden, die nicht in den gängigen Richtlinien gefordert werden (CFU-Assay) mit neuen Methoden (automatische hämatologische Analyse mit Advia, *Cytospin*-Auswertung von Knochenmarkszellen) verglichen.

3.5.1 Histopathologische Untersuchung des Knochenmarks

Die histopathologische Untersuchung des Knochenmarks in der Ratte wird standardmäßig am Femur (Oberschenkel) und Sternum (Brustbein) durchgeführt.

Die Ratten, die mit CSA behandelt wurden, ließen keine Veränderungen im Knochenmark erkennen. Jedoch zeigte die Gabe von AZA in drei von zehn Tieren ein leicht erhöhtes Erythroid:Myeloid-Verhältnis im Sternum, aber nicht im Femur.

3.5.2 Subpopulationsanalyse von Knochenmarkszellen

Wie die Subpopulationsanalyse mittels Durchflusszytometrie in den lymphatischen Organen unter 3.4.4.2 beschrieben, wurde diese Technik auch an den präparierten Knochenmarkszellen der behandelten Ratten angewandt. Allerdings wurden andere Oberflächenmarker (CD 71 für erythroide Vorläuferzellen, CD45 für Leukozyten) verwendet, um Vorläuferzellen aus dem Knochenmark hinsichtlich ihrer hämatotoxischen Eigenschaften auf die Substanzen AZA und CSA zu untersuchen.

Die Abb. 25 veranschaulicht beispielhaft die *Dot-plot*-Darstellung (jeder Punkt entspricht einer Zelle) eines Tieres und die *Gating*-Strategie, um letztlich die folgenden Zellpopulationen zu identifizieren und quantifizieren: lymphoide und myeloide Zellen, erythroide Vorläuferzellen, Retikulozyten und Erythrozyten. Hierbei wurden sogenannte *Gates* gesetzt [als erstes Seitwärtsstreulicht (*side scatter* zur Trennung nach Komplexität der Zelle) und Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* zur Trennung nach Zellgröße) und schließlich Expression der Oberflächenmarker] und Regionen ausgewählt, um die interessierenden Zellpopulationen zu untersuchen.

Die Auswertung in der Abb. 26 A-C verdeutlicht folgende Ergebnisse: Eine deutliche Hemmung (nicht-signifikant) um etwa 50% zur Kontrolle war bei den lymphoiden Zellen und Erythrozyten in den mit 20 mg/kg AZA behandelten Tieren zu finden.

Die Tiere der CSA Dosisgruppen wiesen im Mittel (Werte um 100 %) vergleichbare Mengen an lymphoiden Zellen und Retikulozyten im Knochenmark auf. Ein leichter dosisabhängiger Effekt war allerdings bei den CSA-behandelten Tieren in Hinblick auf die Erythrozytenmenge zu sehen. Mit steigender Dosis CSA stieg an beiden Sektionstagen graduell die Erythrozytenzahl. Hier bestand eine signifikante Erhöhung von Erythrozyten in der Dosisgruppe CSA 1mg/kg im Vergleich zu CSA 25 mg/kg (Sektionstag 1).

Die Auswertung der lymphoiden Zellen und Retikulozyten zeigte, wie in anderen Untersuchungsmethoden, einen deutlichen Unterschied zwischen den Tieren vom Sektionstag 1 und 2.

Die Untersuchungen der myeloiden Zellen und erythroide Vorläuferzellen zeigten keinen beachtlichen oder signifikanten Unterschied durch die Behandlung mit CSA und AZA im Vergleich zu den Kontrolltieren.

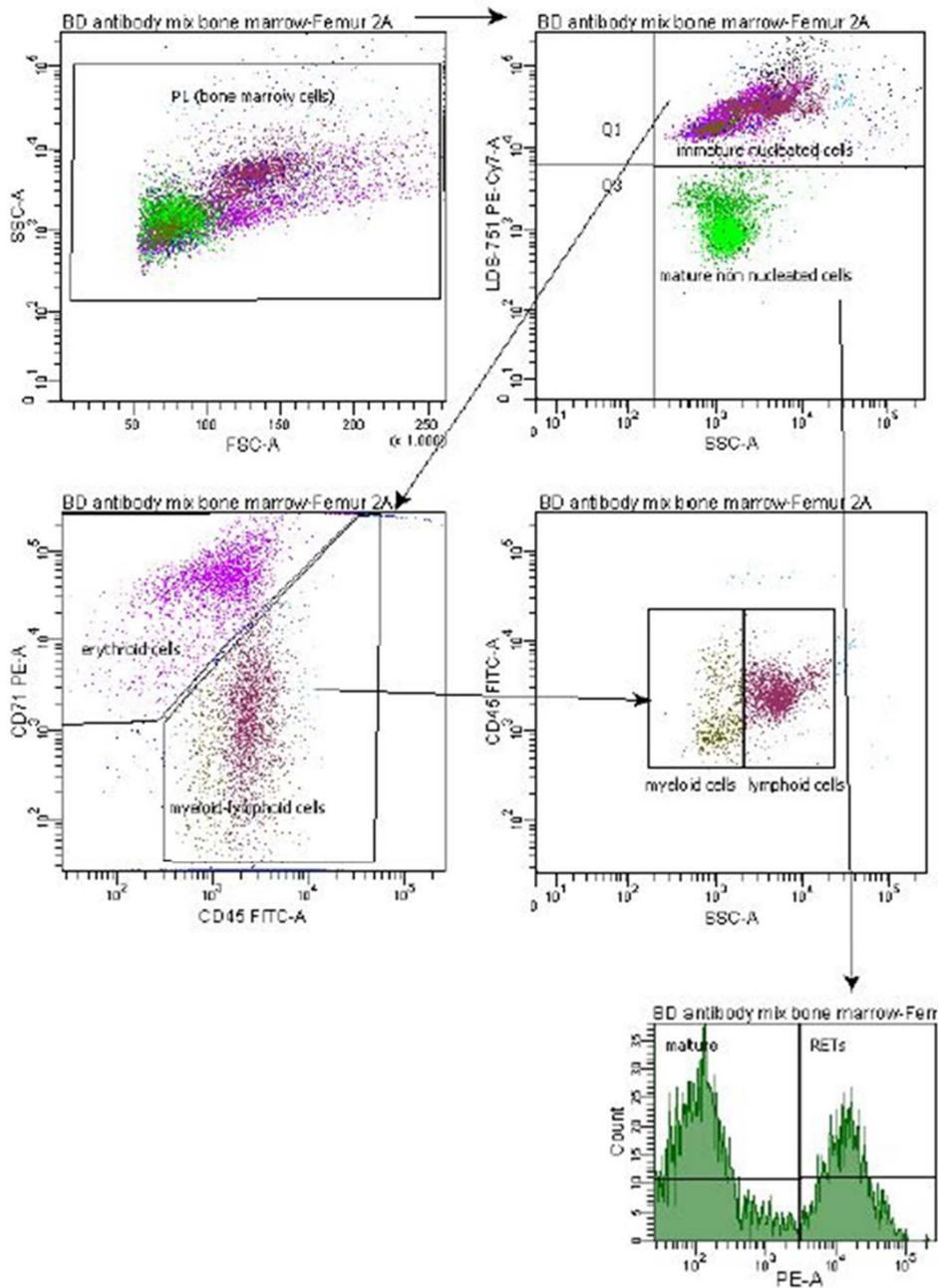


Abb.25 Dot-plot-Darstellung und Gating-Strategie der Subpopulationsanalyse von Knochenmarkszellen (Femur) der Ratte.

Färbung mit CD45:FITC, CD71:PE und LDS-751. SSC = *side scatter* (Seitwärtsstreulicht), FSC = *forward scatter* (Vorwärtsstreulicht).

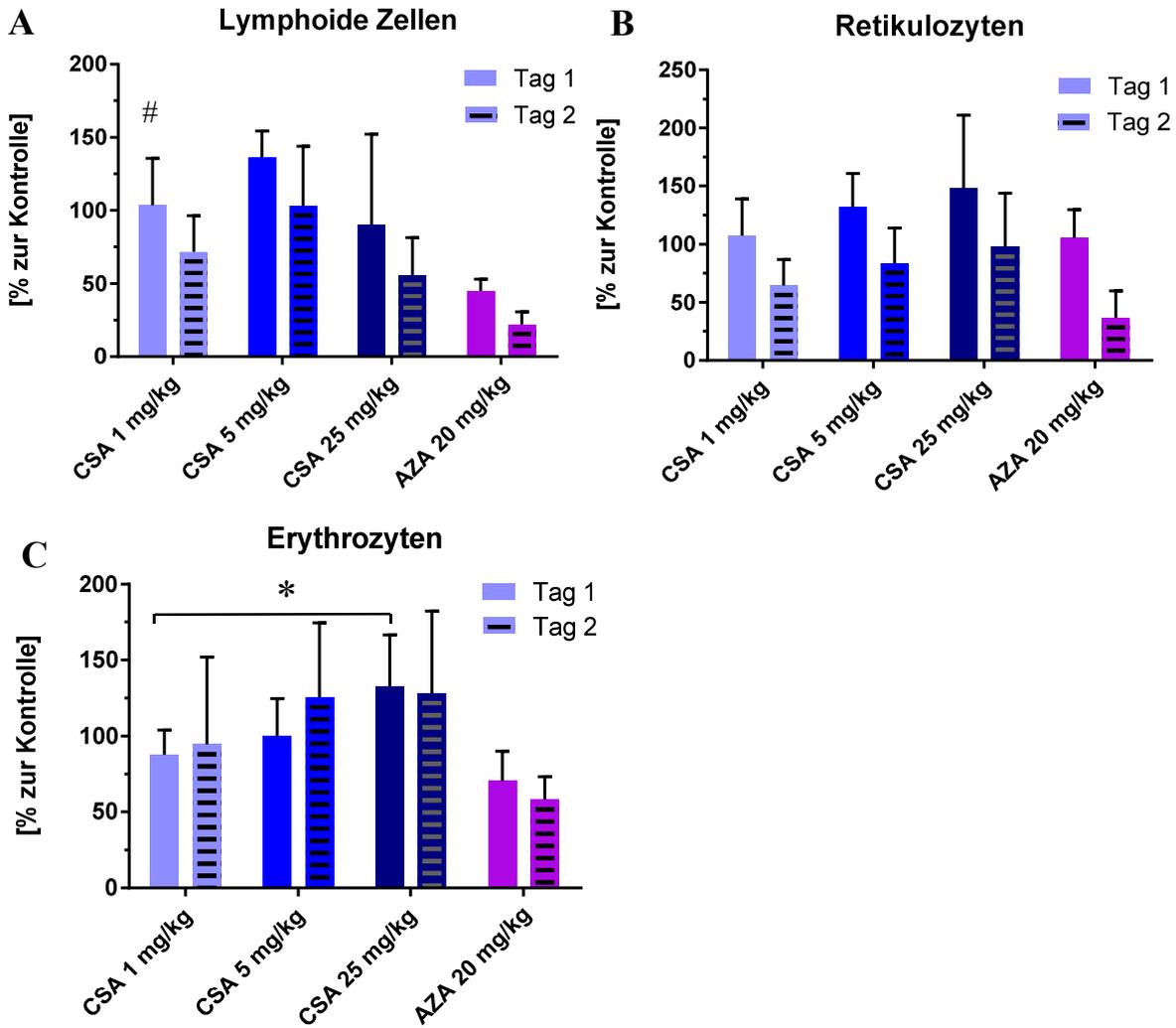


Abb.26 A-C Subpopulationsanalyse von Vorläuferzellen im Knochenmark der Ratte hinsichtlich hämatotoxischer Eigenschaften nach Gabe von CSA und AZA.

A) Lymphoide Zellen,

B) Retikulozyten,

C) Erythrozyten.

Signifikanz: * $P \leq 0.05$; # 4 Tiere wurden in der Dosisgruppe für die Berechnung mit einbezogen.

Zur Veranschaulichung der markierten Zellen mit den Oberflächenmarkern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren, wurde eine Probe im LSM 700 mikroskopiert. Die Abb.27 demonstriert die zelluläre Lokalisation der gelabelten Knochenmarkszellen mit LDS 751 (Zellkern-Färbung), CD71:PE (erythoide Zellen) und CD45:FITC (myeloide und lymphoide Zellen).

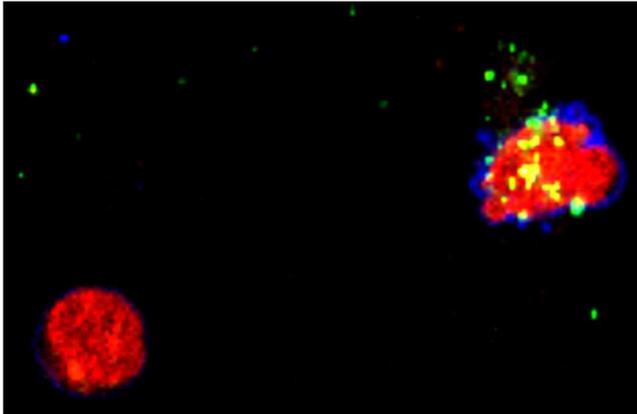


Abb.27 Immunfluoreszenz-gelabelte Knochenmarkszellen aus der Subpopulationsanalyse.

Rot: LDS 751 (Zellkern-Färbung),

Blau: CD71:PE (erythoide Zellen),

Grün: CD45:FITC (myeloide und lymphoide Zellen).

3.5.3 Automatische hämatologische Analysen von Knochenmarkszellen (Advia)

Das Advia 2120i Hämatologie-System (Siemens) ist ein gängiges Gerät zur hämatologischen Untersuchung von Rattenserum während einer toxikologischen Standardprüfung. In dieser Arbeit wurde eine neue Anwendung dieses Gerätes als automatische Screening-Untersuchung von Knochenmarkszellen der Ratte getestet.

Die Knochenmarkszellen aus der Toxizitätsstudie in Ratten wurden neben der Subpopulationsanalyse für die Analyse im Advia verwendet, um eine schnelle Untersuchung der Zellpopulationen im Knochenmark zu erreichen.

Die untenstehenden Abbildungen 28 A-E machen erneut deutlich, dass ein drastischer Mengenunterschied in allen untersuchten Zellpopulationen im Knochenmark zwischen den Tieren vom Sektionstag 1 und 2 bestand. Die Tiere vom Sektionstag 2 hatten gegenüber Sektionstag 1 eine doppelte bis vierfache Menge an Knochenmarkszellen vorliegen.

Während die Mengen an untersuchten Zellpopulationen im Knochenmark in allen Dosisgruppen CSA am Sektionstag 1 nahezu unverändert blieben und Werte im Bereich der Kontrolle aufwiesen, zeigten die Tiere vom Sektionstag 2 dosisabhängige Effekte: Bereits ab 1 mg/kg CSA waren die Werte der weißen Blutzellen, Lymphozyten, neutrophilen /eosinophilen Granulozyten und Monozyten um bis zu einen vierfachen zur Kontrolle erhöht. Die mittlere Dosisgruppe CSA hatte ähnlich ausgeprägte Werte wie die untere Dosis CSA. Die obere Dosis CSA zeigte wiederum eine erneute Steigung mit einer bis zu siebenfachen Menge der Knochenmarkszellen im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings ist anzumerken, dass die Standardabweichungen der Tiere vom Sektionstag 2 teilweise hoch waren.

Die AZA behandelten Tieren hatten gegenüber den CSA Dosisgruppen deutlich verringerte Zellzahlen im Knochenmark. Im Knochenmark der Tiere vom Sektionstag 1 waren beinahe keine der interessierten Zellen vorhanden. Die Tiere vom Sektionstag 2 zeigten ähnliche oder um bis zu 50 % reduzierte Zellzahlen als die Kontrolltiere.

Die y-Achsenkalierung wurde in den Abbildungen nicht vereinheitlicht, um alle Werte ablesen zu können, da die Werte zwischen den untersuchten Zellen stark variierten.

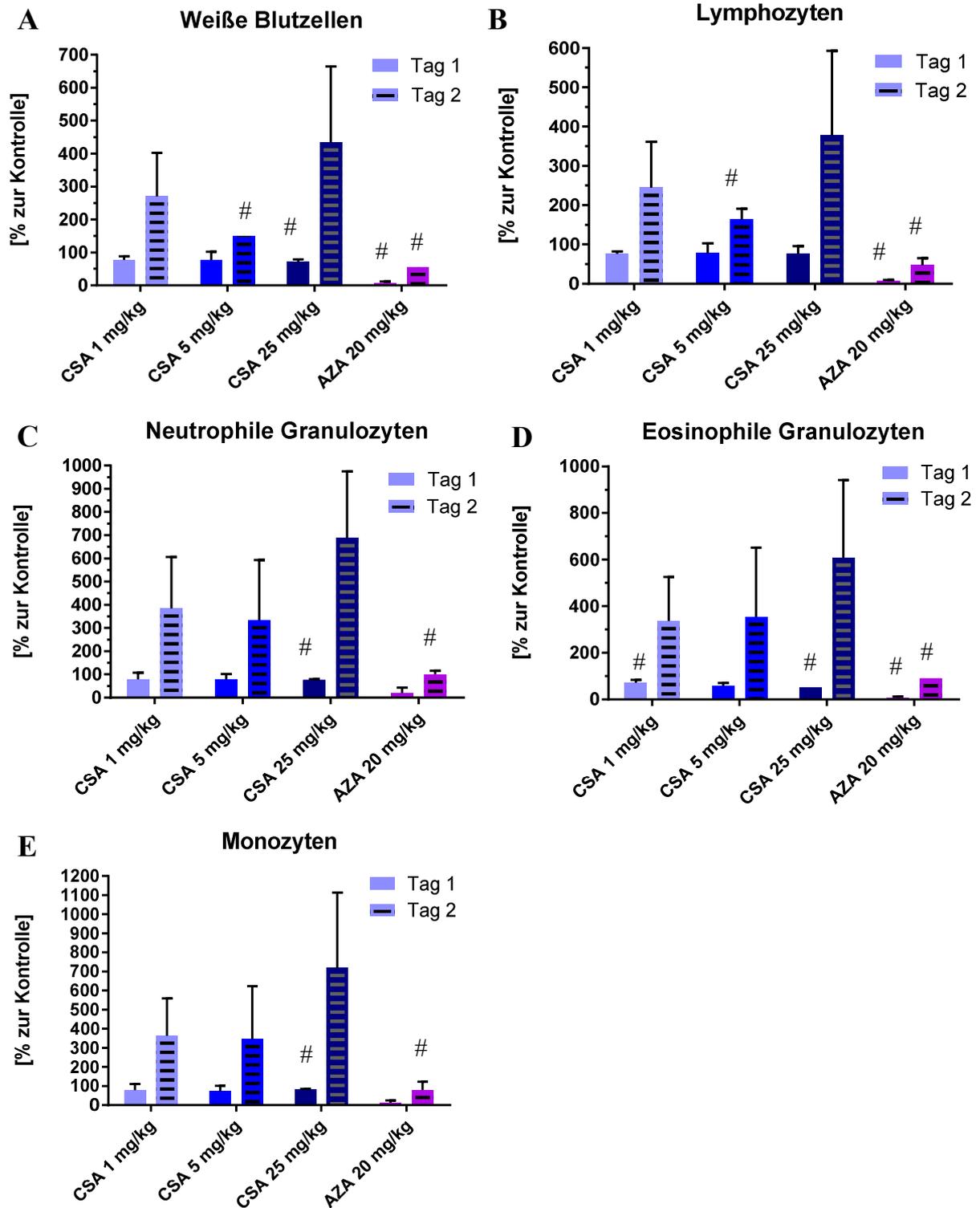


Abb.28 A-E Ergebnisse zur automatischen hämatologischen Analyse von Knochenmarkszellen mithilfe des Advia Hämatologie-System.

A) Weiße Blutzellen,

B) Lymphozyten,

C) Neutrophile Granulozyten,

D) Eosinophile Granulozyten,

E) Monozyten. # 4/5 Tiere wurden in der Dosisgruppe für die Berechnung mit einbezogen.

3.5.4 Zytologische Untersuchung und Differenzierung der Knochenmarkszellen in Knochenmarksausstrichen und Zytospots

Die Knochenmarkszellen, die ebenfalls im Advia analysiert wurden, wurden als Zytopräparate (Cytospins) auf Objektträger übertragen, um durch eine anschließende Färbung eine mikroskopische Auswertung zu ermöglichen. Der Grund dieser mikroskopischen Analyse war eine vergleichende Betrachtung zwischen Zytopräparaten und Knochenmarksausstrichen.

Wurde die Auswertung des Knochenmarks anhand von Zytospots mit der gewöhnlichen Auswertung von Ausstrichen verglichen, ergaben sich für beide Methoden Vor- und Nachteile. In den Ausstrichen lagen die Zellen oft dichter beieinander und konnten dadurch schlechter identifiziert werden (Abb. 29 A-B), andererseits fanden sich in den Zytospots möglicherweise geschädigte, vakuolisierte Zellen (Abb. 30). In Knochenmarksausstrichen waren vereinzelt, bedingt durch die Ausstrichmethode des Technikers, ebenfalls geschädigte Zellen vorhanden sowie weitere Artefakte, die durch Gerinnung oder Variabilität der Färbung entstanden waren. Schließlich ließen sich mit beiden Methoden bestimmte Zellarten nicht sicher differenzieren (in Zytospots beispielsweise Monozyten versus Granulozyten, Lymphoblasten versus Normoblasten), was zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Zellzählung geführt haben könnte.

Die Auswertungen der mikroskopischen manuellen Zählung werden hier nicht gezeigt, da zum einen die Knochenmarksausstriche zum größten Teil nicht auswertbar waren und zum anderen die Zytospots sehr variable Ergebnisse lieferten.

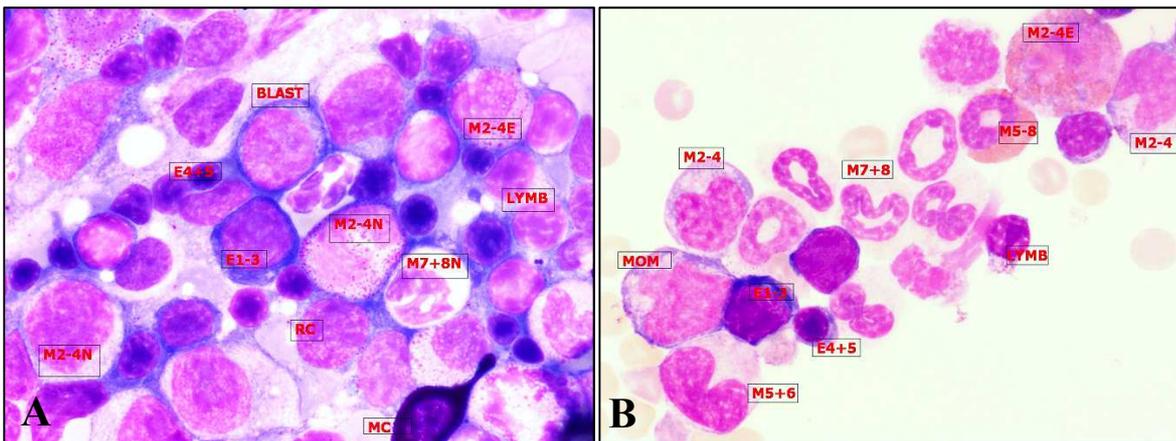


Abb. 29 A-B Verschiedene Reifestadien der Knochenmarkszellen eines Kontrolltieres.

A): Ausstrich, B): Zytospot

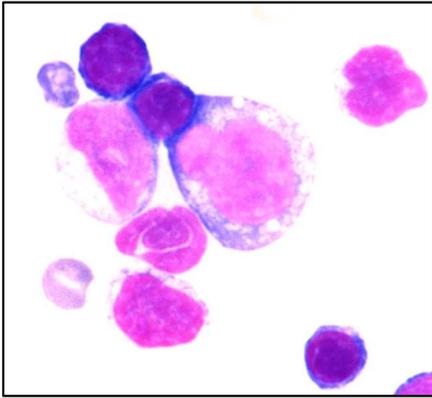


Abb.30 Vakuolen-Bildung in einer Knochenmarkszelle (vermutlich Monoblast) bei mikroskopischer Betrachtung eines Zytospots.

3.5.5 Colony-Forming Unit Assay (CFU-Assay) mit Knochenmarkszellen

Der *in vitro* Colony-Forming Unit (CFU) Assay gibt Auskunft über hämatotoxische Eigenschaften von Testsubstanzen auf Stammzellen. Stammzellen bilden im Knochenmark natürlicherweise Kolonien aus, die unter geeigneten *in vitro*-Bedingungen ebenfalls entstehen. Die Hemmung dieser Koloniebildung durch Zugabe einer Substanz ist ein Maß für deren Zytotoxizität, die sich quantitativ auswerten lässt. Als Stammzellen wurden zum einen humane CD34⁺-Zellen und zum anderen präparierte Knochenmarkszellen aus dem *in vivo* Versuch in der Ratte verwendet (siehe Kapitel 2.2.7.4).

CFU-Assay mit humanen CD34⁺-Knochenmarkszellen

Die humanen CD34⁺-Knochenmarkszellen wurden mit den aus den archivierten Studien (Kapitel 2.2.1.2) bekannten Substanzen AZA, CSA, BAP und HCB behandelt, um deren hämatotoxische Eigenschaften zu untersuchen.

Die humanen Kolonien können unter dem Mikroskop in CFU- und BFU-Kolonien (*Burst Forming Unit*) differenziert und ausgezählt werden. Die pluripotenten CFUs sind unter anderem Vorläuferzellen von Makrophagen und Granulozyten, während die BFUs Vorläuferzellen der Erythrozyten sind.

Die Abbildung 31 A-F zeigt mikroskopische Aufnahmen verschiedener identifizierter Kolonien, die während des CFU-Assays mit humanen CD34⁺-Zellen ausgebildet wurden.

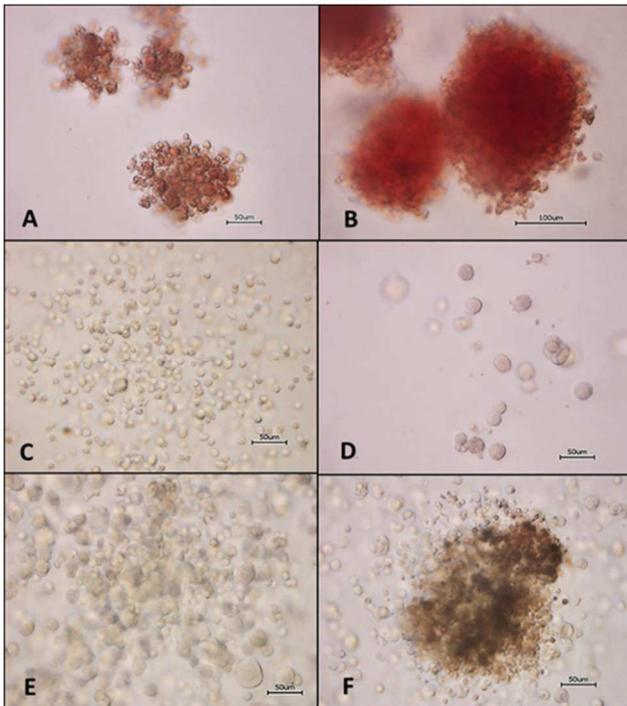


Abb.31 A-F Mikroskopische Aufnahmen zu verschiedenen Kolonien des CFU-Assays mit humanen CD34⁺-Zellen.

A, B: BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*);

C: CFU-G (*colony-forming unit -granulocyte*);

D: CFU-M (*colony-forming unit -macrophage*);

E: CFU-GM (*colony-forming unit -granulocyte-macrophage*),

F: CFU-GEMM (*colony-forming unit -granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte*)

Die Mediumkontrolle (IMDM) und die Lösemittelkontrolle (0,2 % DMSO) zeigten keine bis sehr niedrige Wachstumsinhibition der Kolonien:

IMDM: 2 % Inhibition, DMSO: 0 % Inhibition.

Ebenfalls konnte mit der Positivsubstanz Topotecan in den zwei eingesetzten Konzentrationen 5 und 10 ng/ml ein IC₅₀ und IC₉₀ ermittelt werden:

IC₅₀ (5 ng/ml): 55 % Inhibition

IC₉₀ (10 ng/ml): 95 % Inhibition.

Wie in der Abbildung 32 A-D zu sehen, war das Hemmungs- und Wachstumsverhalten der vier Substanzen auf die humanen Knochenmarkszellen unterschiedlich. Die Immunsuppressiva AZA und CSA hatten gemeinsam, dass keine Kolonien ab 30.000 ng/ml vorhanden waren (Schnittpunkt mit der X-Achse). Während die Anzahl der Kolonien bei AZA sukzessiv bei steigender Konzentration sinkt, ist bei den mit CSA behandelten Zellen eine steile Abnahme von 10.000 auf 30.000 ng/ml zu sehen.

Die Chemikalien BAP und HCB hatten die Gemeinsamkeit, dass in diesem Versuch keine Konzentration gefunden werden konnte, die eine 100 prozentige Wachstumshemmung zeigte. Das Wachstumsverhalten hinsichtlich der Anzahl der CFUs und BFUs mit steigender Konzentration von AZA, CSA und HCB war ähnlich außer das insgesamt BFUs in größerer Anzahl als CFUs vorkamen. Ein gegenteiliges Verhalten hinsichtlich CFUs und BFUs zeigte allerdings die Substanz BAP: Die Anzahl der BFUs sinkt bis 100 ng/ml, steigt ab 100 ng/ml, sinkt ab 300 ng/ml und steigt wieder allmählich ab 1000 bis 100.000 ng/ml. Dagegen steigt die Anzahl der CFUs schrittweise ab 30 ng/ml bis 1.000 ng/ml und sinkt ab 1.000 bis 100.000 ng/ml.

Der Einsatz von HCB in steigenden Konzentrationen zeigte keinen großen Einfluss auf die Anzahl der Kolonien.

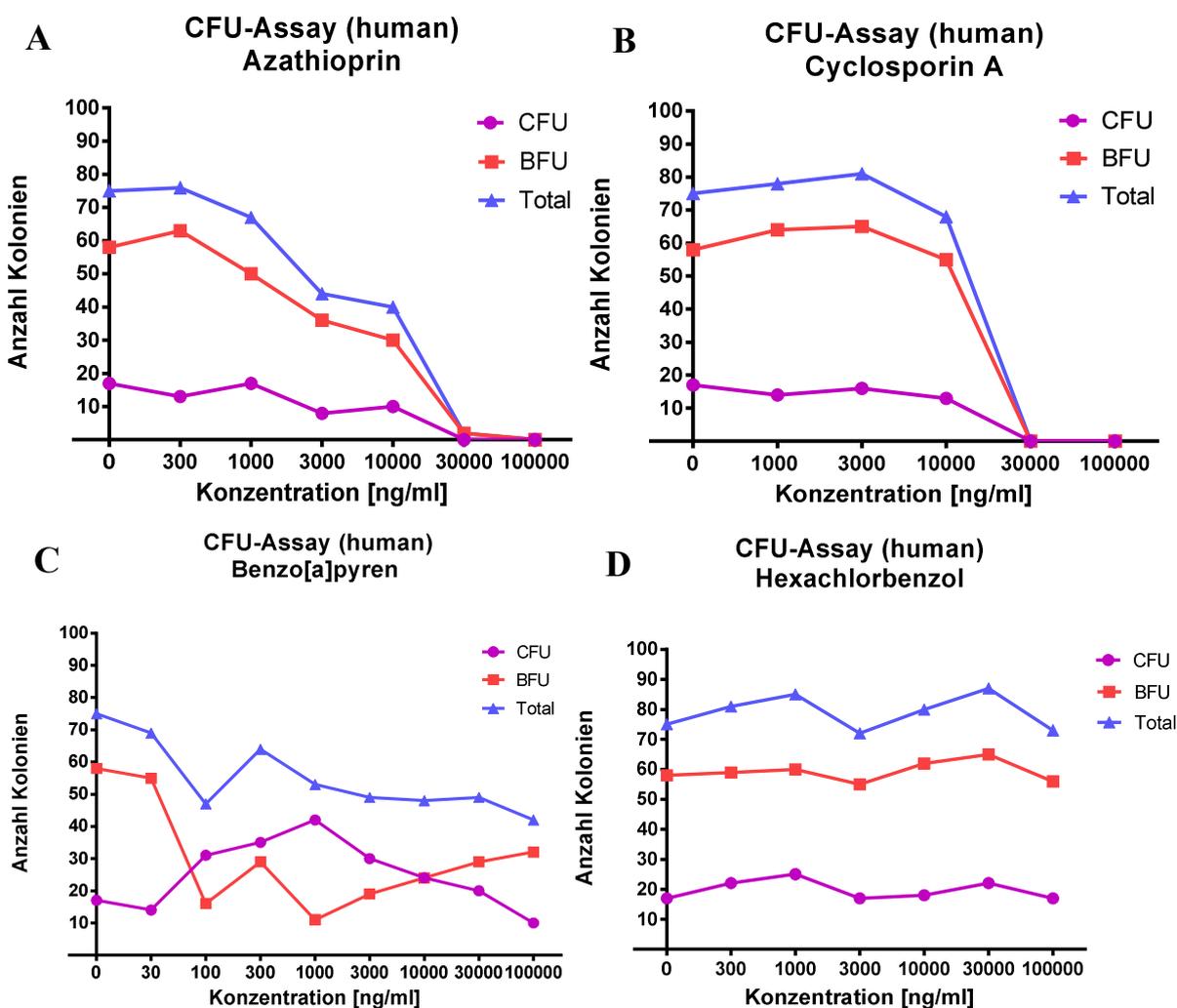


Abb.32 A-D Ergebnisse aus dem CFU-Assay mit humanen CD34⁺-Knochenmarkszellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentration von **A)** Azathioprin **B)** Cyclosporin A **C)** Benzo(a)pyren und **D)** Hexachlorbenzol behandelt (Auszählung von Triplikaten).

Zusätzlich zur Auszählung der Kolonien wurden die Zellen im Medium verflüssigt, zytozentrifugiert (*Cytospin*-Methode) und anschließend zur Untersuchung der Zellmorphologie mit May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Hier konnten morphologische Transformationen der Knochenmarkszellen (wie z.B.geschädigte Zellmembranen und vakuolisierte Zellen) festgestellt werden, die teilweise vor einer deutlichen Abnahme der Kolonien in der Auszählung gesehen wurden. Eindeutige Ergebnisse zu Konzentrations-abhängigen morphologischen Veränderungen in den humanen CD34-Zellen konnten nach der Gabe von AZA im Vorversuch (siehe Kapitel 2.2.7.4) gesehen werden. Die Abbildung 33 veranschaulicht die Gabe von 1, 100, 1.000 und 100.000 ng/ml AZA auf humane CD34⁺-Zellen: Nach 1 ng/ml AZA (A) sahen die Zellen, wie die Zellen der Mediumkontrolle, normal und unversehrt aus. Nach 100 ng/ml (B) zeigten die Knochenmarksstammzellen deformierte, beschädigte Zellmembranen und vereinzelte vakuolisierte große Zellen. Die gleichen Charakteristika waren nach 100.000 ng/ml AZA (C) zu sehen, wobei viel weniger Zellen vorhanden waren. Die stärksten Effekte zeigte die Konzentration 100.000ng/ml (D), die die Zellzahl fast verschwinden lies.

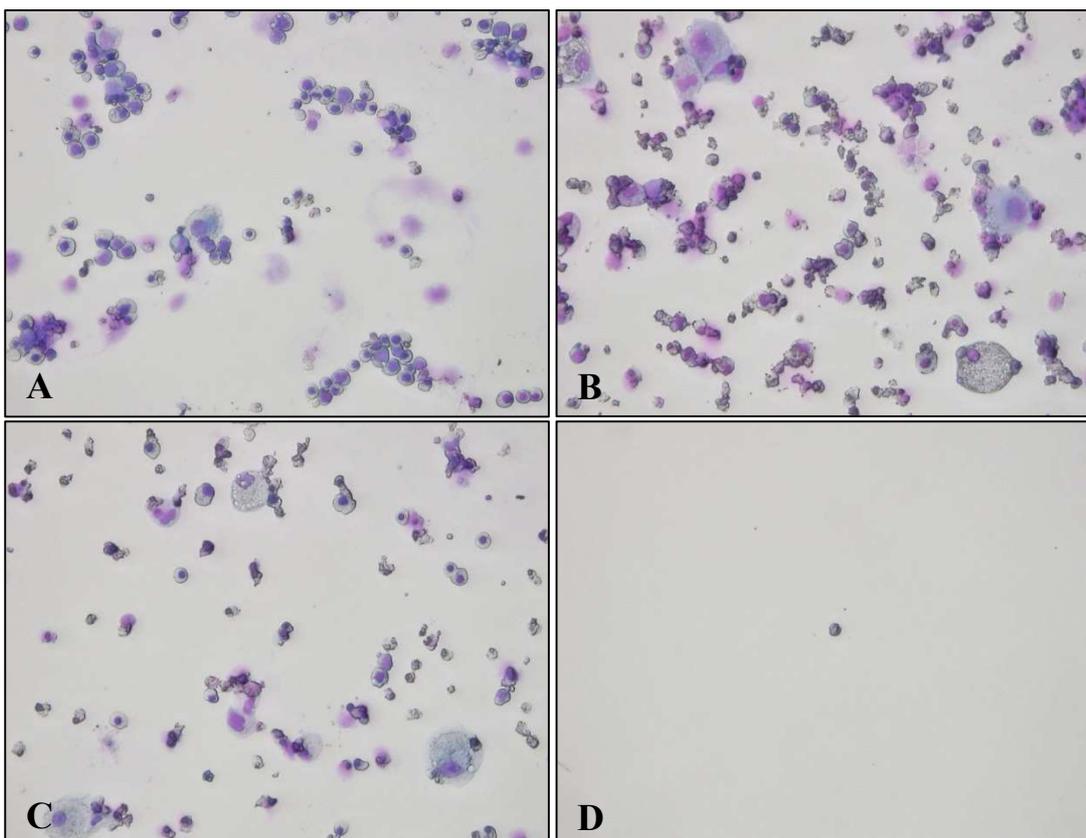


Abb.33 A-D Morphologische Charakteristika gefärbter Cytopots aus dem CFU-Assay mit humanen CD34⁺-Knochenmarkszellen nach Gabe von Azathioprin. Färbung mit May-Grünwald-Giemsa. A) 1, B) 100, C) 1.000, D) 100.000 ng/ml Azathioprin.

CFU-Assay mit Knochenmarkszellen der Ratte

Die Abb. 34 zeigt die Auswertung des *ex vivo* CFU-Assays, dessen Knochenmarkszellen aus dem *in vivo* Versuch an Ratten stammen, die mit CSA und AZA behandelt wurden. Der *ex vivo* CFU-Assay machte deutlich, dass die Anzahl an Kolonien in allen Dosisgruppen (Kontrolle, CSA, AZA) ähnlich zur Mediumkontrolle mit IMDM waren.

Die Behandlung *in vitro* mit der Positivsubstanz Topotecan in den zwei Konzentrationen 8 und 35 ng/ml verdeutlichte eine dosisabhängige Hemmung der gewachsenen Kolonien.

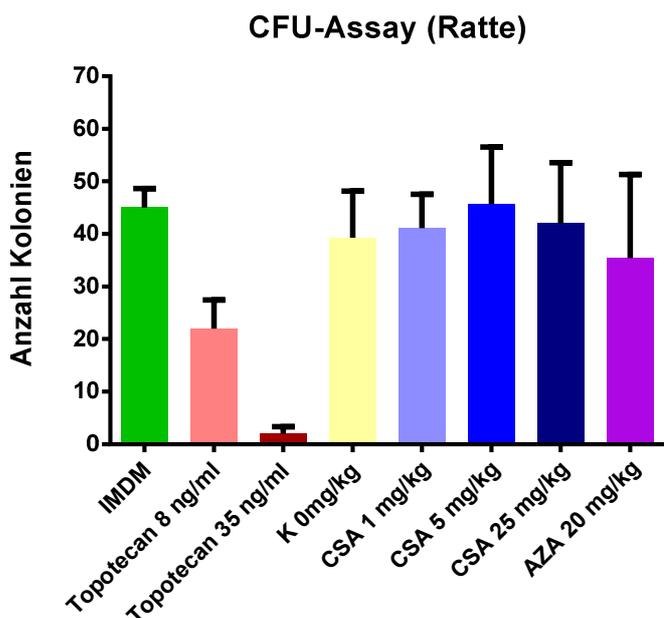


Abb.34 Ergebnisse aus dem CFU-Assay mit Knochenmarkszellen aus der Ratte (*ex vivo*). Die Zellen wurden mit Mediumkontrolle (IMDM), Positivkontrolle (Topotecan) und verschiedenen Konzentration von Azathioprin (AZA) und Cyclosporin (CSA) behandelt. (n = 50 Tiere)

4 Diskussion

Teil 1: Immunhistochemische Biomarker in lymphatischen Organen der Ratte

4.1 Etablierung immunhistochemischer Biomarker in lymphatischen Organen der Ratte an bis zu 20 Jahre alten archivierten Toxizitätsstudien

Die Etablierung von sechs immunhistochemischen Biomarkern (CD3, CD8, CD68, CD79, Caspase-3, Zytokeratin) in lymphatischen Organen der Ratte erwies sich als schwierig. Während zunächst die Etablierung der Biomarker an frischen Kontrollblöcken von unbehandelten Tieren und mit optimaler Fixierungszeit unproblematisch war, zeigte die entsprechende Aufarbeitung die archivierten Studien mit bis zu 20 Jahren Lagerzeiten einige Schwierigkeiten. Die Protokolle mussten pro Marker und Studie mehrfach angepasst (z.B. Erhöhung Konzentration Primärantikörper, Veränderung der *Antigen-Retrival*-Methode) werden, um positive Ergebnisse und eine ausreichende Färbung der Zielzellen zu erhalten. Interessanterweise ließen sich dabei manche Antikörper besser etablieren als andere, was möglicherweise daran lag, dass in einigen Geweben die Oberflächenantigene nach langer Lagerzeit nicht mehr original vorhanden oder schwer zugänglich waren.

Für die Auswertung der H&E-Färbung mussten die bereits vorhandenen gefärbten, archivierten Schnitte von lymphatischen Organen wiederholt werden, da sich Artefakte, wie Ablösung des Schnittes vom Objektträger, Ausbleichen oder Bruchstellen im Gewebeschnitt bei Eindecken mit Folie, gebildet hatten. Folglich konnten Artefakte sowohl in den Schnitten als auch in den Organblöcken festgestellt werden.

Die Fixierungszeit spielt eine große Rolle für den Färbeerfolg. Sie war in jeder Studie unterschiedlich (siehe Tab. 2). Die Fixierung mit Formalin führt zu einer Bildung von Hydroxymethylgruppen an reaktiven Aminosäureseitenketten und anschließender Vernetzung von Peptiden. Dadurch können Epitope maskiert werden, welches zu einer reduzierten Immunreaktivität führt. Zur Optimierung der Färbung wurden deswegen verschiedene *Antigen-Retrival*-Methoden angewendet. Webster et al. (2009) untersuchten Effekte von verlängerter Formalin-Fixierung auf diagnostischer IHC in Haustieren. Ihre Resultate ergaben, dass eine Formalin-Fixierung bis zu sieben Wochen minimale Effekte auf den Antigennachweis durch die meisten häufig verwendeten Antikörper hatte. In einer weiteren Studie von Shi et al. (2007) wurde die Standardisierung der IHC in FFPE-Gewebeschnitten mit verschiedenen *Antigen-Retrival*-Techniken und verschieden langen Fixierungsperioden untersucht.

Shi et al. gehen davon aus, dass der Einfluss von Formalin den hauptsächlich unkontrollierbaren intrinsischen Faktor in der Standardisierung der IHC in FFPE-Gewebe darstellt. In einem Test konnten Shi et al. zeigen, dass die Intensität der Immunfärbung nach 30-tägiger Fixierung leicht schwächer war als in Gewebe, die kürzer fixiert wurden.

Nach diesen Studien kann davon ausgegangen werden, dass die Art der Fixierung selbst nicht der Hauptgrund für die schwierige Etablierung der IHC-Färbung war, möglicherweise aber das Volumen des Fixans in Relation zur fixierten Gewebemenge. Ein weiterer Einfluss können die Bedingungen der Gewebeerarbeitung sein, die in den verschiedenen Studien auch von verschiedenen Personen durchgeführt wurde.

Es liegt außerdem nahe, dass die Artefakte durch die teilweise sehr lange Lagerungszeit entstanden sind. Xie und Kollegen (2011) haben berichtet, dass Antigenveränderungen oder –verlust über die Zeit in gelagerten Schnitten und Blöcken für Nukleinsäuren -basierte Tests festgestellt wurden. Es wurde gezeigt, dass lagerungsbedingte Unterschiede in der Immunreaktivität nicht durch die subzelluläre Lokalisation wie Nukleus oder Zytoplasma des Antigens limitiert sind. Es scheint allerdings, dass die Erkennung von Antigen-Degradation Marker-abhängig ist. Einige Marker konnten nach einem Jahr Lagerung nachgewiesen werden, während andere eine Reduktion in der Färbintensität und Zahl an positiven Zellen zeigten. Der Mechanismus, der die Antigen-Konservierung und den –verlust beeinflusst, wurde bis heute nicht genau charakterisiert. Die Antigen-Degradation in Paraffinblöcken soll im Gegensatz zu ungefärbten Schnitten langsamer geschehen, sofern optimal fixiert, behandelt und gelagert wurde (Xie et al., 2011). Des Weiteren kamen Wester und Kollegen (2000) zu dem Schluss, dass die Lagerung von Paraffinschnitten zu einer variablen, reduzierten Immunreaktivität für verschiedene Antikörper führt. Diese Variabilität hängt von der Lagerungszeit, Temperatur, aber nicht Fixierungszeit ab. Dieser Effekt könne wahrscheinlich durch die Optimierung des Protokolls für die *Antigen-Recovery*-Methode verbessert werden. Diese Erkenntnisse passen gut zu den Ergebnissen in dieser Arbeit.

Die Etablierung der Biomarker an den Kontrollblöcken hatte die Überprüfung der Lokalisation der Zielzellen (T-Zellen und Subpopulationen, B-Zellen, Makrophagen, apoptotische Zellen und Epithelzellen im Thymus) zum Ziel. Die Lokalisation dieser Zielzellen war, wie in der Literatur und den Produktinformationsblättern der Antikörperhersteller beschrieben, übereinstimmend (siehe Abschnitt 3.1):

Der Antikörper CD3 dient zum Nachweis von T-Zellen in Paraffin-Gewebe (Mason et al., 1989) von Thymus und peripheren lymphoiden Gewebe wie die Milz (Campana et al., 1987).

Das CD3-Antigen ist zunächst in frühen Thymozyten nachweisbar und sein Auftreten ist anscheinend eines der ersten Zeichen einer Festlegung auf die T-Zell-Reihe. Bei unreifen Thymozyten im Thymus ist die CD3-Expression ausschließlich zytoplasmatisch und tritt anschließend bei Zellreifung membranassoziiert auf (Campana et al., 1987).

Das CD8-Oberflächenantigen wird innerhalb der T-Zellen von der Subgruppe zytotoxische T-Zellen, den meisten Thymozyten und der Mehrzahl von NK-Zellen exprimiert (Whiteland et al., 1995).

Es ist bekannt, dass das Antigen CD4 sich nicht in Paraffin-eingebetteten lymphatischen Rattengewebe nachweisen lässt (Randall & Pearse, 2008). Deshalb wurde dieser Marker nicht weiter untersucht.

Das CD68-Antigen wird überwiegend von Gewebemakrophagen exprimiert und ist als Makrophagen-Marker in der Ratte gut etabliert (Damoiseaux et al., 1994).

Der Antikörper CD79 ist ein B-Zell-Marker für die Ratte und weitgehend spezifisch auf die Zellen der B-Zelllinie beschränkt. CD79 ist für eine effiziente Oberflächenexpression des B-Zellrezeptors unerlässlich und ist außerdem notwendig bei der Signalübertragung ins Zytoplasma nach Bindung des Antigens an Oberflächen-Immunglobulin (Mason et al., 1995).

Der Antikörper Caspase-3 (*cleaved*) erkennt spezifisch ein durch die Spaltung neu entstandenes Epitop des großen Fragmentes der aktivierten Caspase-3. Dieser Marker eignet sich hervorragend für die immunhistochemische Darstellung von Apoptose in Rattengewebe (Gown & Willingham, 2002).

Eine Mischung von Anti-Zytokeratin Antikörper eignete sich gut für die spezifische Markierung der Epithelzellen im Thymus (Colic et al., 1989).

Insgesamt hat sich gezeigt, dass diese Etablierung der immunchemischen Färbung von lange gelagertem Material für zukünftige Analysen zu zeitaufwendig ist, um sie in die Routinearbeit zu integrieren. Trotzdem gibt es sicherlich Umstände, unter denen eine solche nachträgliche Auswertung den Aufwand lohnen könnte (s.a. Kapitel 4.2).

4.2 Bis zu 20 Jahre alte Toxizitätsstudien bieten ausführliche Informationen über die zellulären Veränderungen nach immunmodulierenden Substanzen

An den bis zu 20 Jahre alten Toxizitätsstudien konnten trotz ihres Alters, der schwierigen Etablierung der IHC und schwächeren Farbintensität detaillierte Informationen über die wichtigsten Immunzellen und interagierenden Zellen in Milz und Thymus gewonnen werden (siehe Abb. 16).

Neben Milz und Thymus wurden immunhistochemische Färbungen auch im mesenterialen Lymphknoten durchgeführt. Allerdings hat sich schnell gezeigt, dass weitere Untersuchungen nicht erfolgsversprechend scheinen, da sich keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und behandelten Tieren ergaben. Deshalb wurde sich im Folgenden nur auf die Untersuchung von Milz und Thymus konzentriert, da die Lymphknoten anscheinend besser mit der H&E-Färbung evaluiert werden können. Ein Grund dafür war, dass die Schnittebene bei Lymphknoten schwer vereinheitlicht werden konnten und deshalb die Lymphozyten-reichen Gebiete unterschiedlich betrachtet wurden. Die Lymphknoten sind hoch variabel, klein und schwierig zu entnehmen (Elmore, 2006f). Lymphknoten bestehen aus mehreren lymphoiden Läppchen, umrandet von mit Lymphe gefülltem Sinus und umgeben von einer Kapsel. Die komplexen dreidimensionalen Läppchen und die Sinus können sich abhängig von der Schnittebene sehr unterschiedlich darstellen. Deshalb ist ein detailliertes Verständnis über die Histologie der Läppchen wichtig, um den Bereich an Variationen aufgrund von anatomischer Lokalisation, Alter, Ernährung, Antigenbelastung, Schnittebene und Interpretation der Veränderungen im normalen Lymphknoten zu erkennen (Willard-Mack, 2006).

Die IHC-Biomarker unter Anwendung der Nomenklatur *Enhanced Histopathologie* hatten vollständiger Informationen geliefert als die H&E-Routinefärbung. Wie aus der Tab. 30 ersichtlich, konnten immunmodulierende Veränderungen nach Substanzgabe in vier von sieben Studien (bei Ausklammerung der AZA-Studie) in niedrigeren Dosierungen entdeckt werden als mit der H&E-Färbung. Diese Aussage konnte mit der Aufstellung eines LOEL getroffen werden. Während die Aufstellung eines LOELs in der histopathologischen Untersuchung in Toxizitätsstudien gängig ist, ist diese Aufstellung für IHC-gefärbtes Gewebe keine Routine. Im Folgenden wird die Wirkung jeder Substanz auf Milz und Thymus betrachtet und mit Studien aus der Literatur verglichen.

4.2.1 Die Wirkung von AZA auf die lymphatischen Organe der Ratte

In der Forschung ist AZA eine gut untersuchte Modellsubstanz für immuntoxische Untersuchungen, da es immunsuppressiv wirkt (De Waal et al., 1995; *The ICISIS Group Investigators*, 1998; Kuper et al., 2000).

In der AZA-Studie konnten induzierte Veränderungen des Immunsystems mit der H&E-Färbung aufgedeckt werden. Der Thymus war das sensitivste Organ, das histologische Befunde bereits ab 5 mg/kg (erhöhte Makrophagenzahl im Thymus) zeigte. Das Knochenmark, das ein primäres Zielorgan von AZA ist, zeigte morphologische Veränderungen ab 10 mg/kg, die auf eine Atrophie hinweisen.

Die immunhistochemische Färbung im Thymus konnte zusätzliche Aspekte von induzierten Veränderungen (reduzierte epithelfreie Regionen und erhöhte Dichte des Epithelnetzwerks) aufdecken, die nicht mit der Routine-Färbung zugänglich sind.

In der ICISIS-Studie, der ersten internationalen Studie auf Basis der 28-Tage Toxizitätsstudie nach der OECD Guideline 407, wurde Azathioprin als potente immunsuppressive Substanz eingesetzt (*The ICISIS Group Investigators*, 1998). Bei den Rattenstämmen Fischer und Wistar haben die Labore insgesamt eine signifikant reduzierte Zellularität im Thymus und zusätzlich in der Milz (Marginalzone, PALS, Follikel) ab der mittleren Dosis gesehen. Die teilweise unterschiedlichen Befunde (Makrophagen im Thymus und keine Effekte in der Milz) in der AZA-Studie im Gegensatz zur ICISIS-Studie könnten an der verwendeten Rattenspezies oder Formulierung der Substanz liegen, da das *Prodrug* AZA in unterschiedlicher Weise metabolisiert werden kann. In der ICISIS-Studie wurden zwei Rattenstämme getestet, die teilweise eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den Substanzen gezeigt haben.

4.2.2 Die Wirkung von CSA auf die lymphatischen Organe der Ratte

In der CSA-Studie wurden die ersten immunsuppressiven Effekte im Thymus in der mittleren Dosis (5 mg/kg) gesehen. In der H&E-Färbung wurde ab 5 mg/kg eine Verschmälerung bis zum Verlust der Markzone und somit eine Verschiebung des Rinde/Mark-Verhältnisses gesehen. Außerdem traten vermehrt Makrophagen in der Thymusrinde auf, die bei Männchen ab 5 mg/kg und in der oberen Dosis bei beiden Geschlechtern auftrat. In der Milz waren eine reduzierte Zellularität der PALS und eine veränderte Zellularität der Follikel in der oberen Dosis zu sehen. In der IHC-Färbung gelang nur der Nachweis von CD68 für die Markierung von Makrophagen. Die Männchen zeigten eine dosisabhängige Reduzierung von Makrophagen in der mittleren und oberen Dosis.

Entsprechende Befunde zur Verschmälerung der Medulla im Thymus von Ratten sind bereits aus der Literatur bekannt (Beschoner et al., 1987). In der Rindenzone traten im Zusammenhang mit der Verschiebung des Verhältnisses von Rinde und Mark vermehrt Makrophagen auf. Da es nach Beschoner und Kollegen (1987) nach toxischen Dosen der Prüfsubstanz auch zum Untergang lymphatischer Zellen im Cortex kommt, wird auch dieser Befund als prüfsubstanzbedingt im Sinne einer Phagozytose untergegangener lymphatischer Zellen angesehen. Die zelluläre Reduktion in der Medulla, das erhöhte Vorkommen von Makrophagen in der Rinde und die reduzierte Zellularität in der PALS der Milz wurden ebenfalls in einer Validierungsstudie des ehem. BGVV gesehen (Richter-Reichhelm & Schulte, 1998).

Ähnliche Befunde nach CSA in der Milz sind bei der Maus beschrieben (Hattori et al., 1987), sodass es sich auch hier um spezifische Wirkungen der Prüfsubstanz auf das Immunsystem handelt.

In dieser Studie wird außerdem deutlich, dass Milzbefunde die Folge der Substanzwirkung auf den Thymus sind (weniger T-Zellen werden freigesetzt und erreichen die Milz).

4.2.3 Die Wirkung von OXA auf die lymphatischen Organe der Ratte

Die nächsten 4 untersuchten Substanzen stammten aus der Gruppe der Oxazolidinone und wurden im Gegensatz zu den anderen untersuchten Substanzen nur über zwei Wochen verabreicht (ehemalige Studiendauer nach OECD 407). Es ist bekannt, dass Vertreter dieser Substanzgruppe, die als Antibiotika verwendet werden, insbesondere Nebenwirkungen auf die Hämatopoese hervorrufen können (Kuter & Tillotson, 2001).

Die Gabe von OXAI zeigte eine verringerte Hämatopoese in der Milz der Tiere der oberen Dosis. Deutlich mehr Effekte, unabhängig von der Hämatopoese, konnte die IHC-Färbung aufdecken: Ab der untersten Dosis waren weniger apoptotische Zellen im Thymus und T-Zellen in der roten Milzpulpa vorhanden. In der oberen Dosis waren keine epithelfreien Regionen im Thymus vorhanden, erhöhte Mengen an Makrophagen im Thymus und T-Zellen in der roten Milzpulpa bei den Weibchen. Außerdem konnten vermehrt B-Zellen in der PALS von Weibchen der unteren und mittleren Dosis gefunden werden.

In der OXAII-Studie konnten behandlungsbedingte Effekte ausschließlich in der H&E-Färbung gesehen werden, die in einer Nachbeobachtungs-Gruppe zum Teil nicht reversibel waren. Der Effekt der reduzierten Hämatopoese und Anzahl Megakaryozyten in der roten Pulpa der Milz war in der oberen Dosis verringert und bestand weiterhin in allen Nachbeobachtungs-Gruppen. Somit kann auf eine weiter anhaltende Schädigung der Hämatopoese geschlossen werden. Nur die reduzierte Zellularität der Roten Pulpa in Weibchen der oberen Dosis, die ebenfalls im Zusammenhang der Hämatopoese stehen kann, war in der Nachbeobachtungs-Gruppe nicht mehr vorhanden. Neben der Hämatopoese waren ebenfalls die Immunzellen betroffen: Der Thymus der oberen Dosis bei Männchen zeigte reversible Atrophien und die Milz eine irreversible reduzierte Zellularität in der weißen Pulpa der Weibchen.

In der OXAIII-Studie befand sich ebenfalls der ausgeprägteste Effekt auf die Hämatopoese der Milz (ab 75 mg/kg), welcher mithilfe der H&E-Färbung und der CD79-Färbung (ab 75 mg/kg), die zusätzlich Megakaryozyten anfärbt, deutlich wurde. Bei weiblichen Tieren wurde in fast keiner Gruppe Hämatopoese in der Milz gesehen. Im Gegensatz dazu war bei den männlichen Tieren eine deutliche Blutbildung in der Kontrolle vorhanden, da Männchen stärker wachsen und ihre Blutmenge entsprechend vergrößern.

Die verminderte Zellularität der roten Pulpa war allerdings in beiden Geschlechtern ab der mittleren Dosis zu sehen. Auch in der weißen Pulpa trat eine Senkung der Zellzahl auf, die sich bei Weibchen ab der mittleren Dosis äußerte und bei Männchen in der oberen Dosis. Zusätzlich war auch in dieser OXA-Studie eine Thymusatrophie in der hohen Dosierung zu sehen.

Die IHC-Färbung zeigte insbesondere eine dosisabhängige Verminderung von Makrophagen in der roten Milzpulpa. Auch hier verschwanden die epithelfreien Regionen durch die Zugabe von OXAIII, das bereits ab der untersten Dosis sichtbar war.

Die Gabe von OXAIV zeigte erneut, dass die Weibchen in fast allen Fällen keine Hämatopoese in der Milz ausbildeten. Die Männchen dagegen hatten alle bis zur mittleren Dosis von 75 mg/kg hämatopoetische Foci in der Milz, die in der obersten Dosis komplett verschwanden. Zusätzlich war ab 75 mg/kg eine Thymusatrophie in beiden Geschlechtern zu sehen. Mit der IHC-Färbung konnte erneut ein Verschwinden der epithelfreien Regionen in der oberen Dosis nachgewiesen werden. Deutliche dosisabhängige Effekte waren in der verminderten Zahl an T-Zellen in der roten Pulpa in der oberen Dosis und den Makrophagen in der Marginalzone ab der mittleren Dosis zu erkennen.

Insgesamt konnten in jeder OXA-Studie eine Myelotoxizität insbesondere der Männchen festgestellt werden, die unterschiedlich ausgeprägt war. Bei jungen Ratten findet Blutbildung nicht nur im Knochenmark sondern auch in der Milz statt, wo sie insbesondere nach Blutentnahmen deutlich hervortritt. Eine Schädigung der Blutbildung kann daher oft nicht nur im Knochenmark, sondern auch in der roten Milzpulpa der Ratte erkannt werden. Neben Effekte auf die Hämatopoese waren, außer in der OXA I-Studie, Zeichen der Atrophie im Thymus zu sehen. Interessanterweise zeigte die IHC-Färbung von Zytokeratin außer bei OXAIII verminderte bzw. Fehlen von epithelfreien Regionen im Thymus, dessen Auftreten sich zwischen den Substanzen unterschied.

Ebenfalls auffällig waren geschlechtsspezifische Empfindlichkeiten gegenüber OXA in jeder Studie.

4.2.4 Die Wirkung von BAP auf die lymphatischen Organe der Ratte

Die Auswertung der H&E-Färbung ergab bereits ab der unteren Dosis (37, 5 mg/kg) mit BAP das Auftreten verstärkter Blutbildung in der roten Pulpa. Hinzu kam eine Abgrenzung von prominenten Sinusendothelien in der Milz ab der mittleren Dosis. Eine Atrophie im Thymus und eine Erhöhung von Sternhimmelmakrophagen waren ebenfalls ab der mittleren Dosis BAP vorhanden.

Mithilfe der IHC-Färbung konnten zusätzliche Informationen gewonnen werden: Ab der untersten Dosis war eine verringerte Breite der Marginalzone in der Milz und geringere Mengen an T-Zellen in der roten Pulpa vorhanden.

Die meisten Tiere aller Dosisgruppen zeigten gehäuft Makrophagen im Thymus an der Grenze zwischen Rinde und Mark. Außerdem konnte in allen behandelten Tieren eine deutliche Abnahme der epithelfreien Regionen und - als Hinweis auf eine Thymusatrophie mit reduzierter Thymozytenzahl - eine erhöhte Dichte des Epithelnetzwerkes in der oberen Dosis gezeigt werden. Insgesamt zeigt BAP bereits in der untersten Dosis von 37,5 mg/kg Hinweise auf eine immunsupprimierende Wirkung.

Ähnliche Ergebnisse, wie Anzeichen von einer kortikalen Atrophie im Thymus, wurden ebenfalls in der Studie von De Jong et al. (1999) gefunden, die BAP in einer erweiterten OECD 407 in Wistar-Ratten untersucht haben. Weitere immunsuppressive Effekte von BAP auf Ratten wurden von Blanton et al. (1986), Ladics et al. (1992) und Knuckles et al. (2001) gezeigt. Neben den lymphatischen Organen waren in der oberen Dosis auch nicht-lymphatische Organe betroffen (Ergebnisse in Kemmerling et al., 2015). Es haben sich histopathologische Befunde wie Atrophien in Fettzellgewebe, Leber und Pankreas gezeigt. Die mutagenen und karzinogenen Metabolite von BAP haben die Befunde Basalzellhyperplasie im Vormagen und Leberhyperplasien verursacht. Nach Wester et al. (2012) sind Leber und Vormagen als „proximale“ Zielorgane von BAP bekannt, da sie anfällig für die Entwicklung von Tumoren in chronischen Studien sind. In einer weiteren Studie mit CYP1A1-*Knockout* Mäusen führte die Gabe von BAP zur Immuntoxizität und Tod der Tiere. Daraus lässt sich schließen, dass CYP1A1-Enzyme für die Detoxifizierung von oralen BAP notwendig sind (Nebert et al., 2013). Der Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht vollständig verstanden und die Auslösung der Immuntoxizität komplex, da auch immunstimulierende Effekte berichtet wurden (Booker & White Jr., 2005).

4.2.5 Die Wirkung von HCB auf die lymphatischen Organe der Ratte

Die Gabe von HCB über vier Wochen an Ratten hatte im Gegensatz zu den anderen Substanzen immunstimulierende Wirkung gezeigt, die sich neben der Milz vor allem in den Lymphknoten äußerte. In der Milz waren die Zellularität der Lymphozyten in der Marginalzone und in den Follikeln und das Vorkommen extramedullärer Hämatopoese in der roten Pulpa ab der mittleren Dosis (30 mg/kg) erhöht. In der IHC-Färbung war nur die CD8- und CD3-Färbung erfolgreich: Zytotoxische T-Zellen (CD8) waren in der PALS ab der mittleren Dosis erniedrigt. Die Erhöhung der CD3-T-Zellen in B-Zell-Follikeln der Männchen in der oberen Dosis passte zu den Befunden der H&E-Färbung.

In einem Makrophagen-Aktivitätstest mit Milzzellen von Wistar-Ratten, die mit HCB behandelt wurden, konnte eine erhöhte Makrophagenaktivität festgestellt werden (Ergebnisse in Kemmerling et al., 2015).

Es wurde gefolgert, dass die Makrophagenaktivität durch sekundäre Aktivierung durch nicht-spezifische inflammatorische Ereignisse entstanden ist, da kein weiterer Immunparameter in Immuntests signifikant verändert war. Des Weiteren können die starken irritierenden und zytolytischen Eigenschaften von HCB zur Zerstörung von Zellen geführt haben, die eine erhöhte Makrophagen-Aktivität hervorgerufen haben. In weiteren Untersuchungen wurde die Toxizität von nicht-lymphatischen Organen gesehen. Die Leber war ein Zielorgan, das klinisch-chemische und histopathologische Veränderungen ab der mittleren Dosis gezeigt hat. Weitere inflammatorische Befunde wurden in der Lunge und Haut ab der mittleren Dosis gesehen.

Eine erhöhte Größe der Follikel und der Marginalzone in der Milz fand ebenfalls Vos et al. (1979) heraus, die Ratten dreiwöchig HCB verabreichten. Die immunstimulierenden (pro-inflammatorischen) Effekte können außerdem eine Autoimmunität auslösen. Die HCB-induzierten Effekte in der Ratte hatte Michielsen et al. (1999) mit Autoimmunität in Zusammenhang gebracht.

Insgesamt waren die Effekte von HCB gegensätzlich zu den anderen untersuchten Substanzen. HCB wurde als immunstimulierende Substanz von einigen Wissenschaftlern bezeichnet (Kuiper-Goodman et al., 1977; Vos et al., 1979a, 1979b). Die gefundenen Effekte sind allerdings nicht auf eine primäre Immuntoxizität, sondern auf eine sekundäre Aktivierung von immunkompetenten Zellen zurückzuführen.

4.2.6 Die *Enhanced Histopathology* als geeignetes Mittel zur Auswertung von IHC-Färbungen in Milz und Thymus

Die EH ist ein Hilfsmittel, das der Pathologe zur Identifizierung von immunmodulierenden Komponenten nutzen kann. Diese Untersuchung basiert auf der Voraussetzung, dass Chemikalien qualitative oder quantitative Veränderungen in der Histologie von lymphatischen Organen induzieren können. Die EH beinhaltet die histologische Untersuchung von verschiedenen lymphatischen Organen und ihrer Kompartimente, um spezifische zelluläre Veränderungen aufzufinden (Elmore, 2010). Während die Anwendung der EH an H&E-Standardfärbung zur Routine gehört, ist die Anwendung für IHC-Färbungen eher unbekannt.

Diese Untersuchung in subakuten vier Wochen-Studien hat gezeigt, dass die EH an IHC-gefärbten lymphatischen Organen erfolgreich war und somit eine vergleichbare, standardisierte Auswertung zur H&E-Färbung war. Obwohl nicht alle lymphatischen Organe betrachtet wurden, konnten allein in Milz und Thymus spezifische Substanz induzierte Immunsuppression oder –stimulation bestimmt werden. Des Weiteren ließ sich die aufgestellte Nomenklatur gut in den verschiedenen Studien anwenden.

Für Experten/Pathologen mit Kenntnissen über Struktur und Funktion von lymphatischen Organen lässt sich diese Nomenklatur gut erlernen und umsetzen. Auch für die IHC-Färbung ist es das Beste, wenn zuerst die Kontrollen eines Organsystems, dann die höchste Dosis und dann die untere und mittlere Dosisgruppe evaluiert werden. Eine zweite, geblindete („blinded“) Überprüfung kann für leichte Effekte durchgeführt werden (Elmore, 2012). Für die Abgrenzung eines primären gegenüber einem sekundären, unspezifischen Immuneffekt auf die lymphatischen Organe sollten weitere lymphatische Organe untersucht und Ergebnisse anderer nicht-lymphatischer Organe, klinische Chemie, klinische Beobachtungen, Körper- und Organgewichte herangezogen werden. Der wichtigste unspezifische Mechanismus zur Abgrenzung eines primären Effekts sind die Folgen von Stress. Da der Thymus sehr empfindlich gegenüber den Effekten von Stress ist (durch endogene Kortikosteroide), ist es wichtig zwischen substanzinduzierter Thymusatrophie und stressbedingter Apoptosis der Lymphozyten zu unterscheiden. Dies ist allerdings sehr schwierig und kann parallel auftreten. Die Ausschüttung endogener Kortikosteroide in Folge von Stress und eine Schwächung kann in einer Gruppe von Tieren passieren, welches in einer erhöhten Zahl von kortikalen Thymozyten resultieren kann. Stress kann beispielsweise durch die Applikationsroute, Lärm oder die Tierhaltung ausgelöst werden. Es wird oft mit einer Abnahme des Körpergewichts in Zusammenhang gebracht. (Elmore, 2006c, 2012).

4.2.7 Sechs immunhistochemische Biomarker als Zusatzuntersuchung in toxikologischen Standarduntersuchungen

Nach der Definition des *National Institutes of Health* wird ein Biomarker als „ein Kennzeichen, der objektiv gemessen und als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder pharmakologische Antworten einer therapeutischen Intervention evaluiert wird“ bezeichnet (Dunstan et al., 2011). In dieser Untersuchung trifft es zu, dass die immunhistochemischen Biomarker Indikatoren für normale biologische Prozesse und pathogene Prozesse sind. Die objektive semiquantitative Messung kann durch „Verblindung“ der Dosen, feste Kriterien sowie *Peer-Review* (Bestätigung der Befunde durch Untersuchung einer zweiten Person) erfolgen.

Eine quantitative Messung ist durch die mikroskopische Auswertung eines Pathologen aufgrund eines Interpretationsspielraumes bei der Graduierung von Befunden nicht gegeben. Die immunhistochemischen Biomarker gehören zur Klasse der qualitativen Biomarker nach Cummings et al. (2010).

Die Anwendung von immunhistochemischen Biomarkern in lymphatischen Organen in toxikologischen Standardstudien sollte übersichtlich und effizient sein sowie im Regelfall keinen großen Mehraufwand bedeuten.

Matos et al. (2010) sind der Meinung, dass die IHC ein wichtiges Werkzeug für den Biomarker-Nachweis ist, gerade für Untersuchungen, die nicht mit der konventionellen H&E-Färbung abgedeckt sind. Durch die Untersuchung von Veränderungen in Zellen und Geweben lässt sich eine Immuntoxizität näher charakterisieren (Ward et al., 2006).

Wenn die immunhistochemischen Protokolle etabliert sind, lässt sich die IHC-Färbung leicht umsetzen. Allerdings bedeutet sie einen größeren Zeitaufwand als eine H&E-Färbung. Die Auswahl der sechs Biomarker war ausreichend und übersichtlich, um die zellulären Zustände einer Immunstimulierung oder Immunsuppression näher zu untersuchen. Ward et al. (2006) haben ebenfalls die Biomarker CD3, CD8 und CD68 als geeignete Antikörper zur Detektion von Rattenantigenen verwendet.

Insgesamt scheint es ratsam, gute immunhistochemische Biomarker wie die verwendeten routinemäßig einzusetzen. Gerade bei Substanzen mit unbekanntem Wirkmechanismus ist es wichtig, dass immunsupprimierende oder –stimulierende Wirkungen nicht übersehen werden. Die Auswahl kann je nach vermuteten oder bekannten Wirkmechanismus auch weitere Zielzellen einschließen, wie z.B. die Untersuchung von NK-Zellen oder Immunglobulinen.

Des Weiteren ist es überlegenswert, weitere sekundäre lymphatische Organe wie MALT oder Lymphknoten zu untersuchen, um ein breiteres Wissen über das Immunsystem zu bekommen. Die Betroffenheit und Wirkstärke kann nach der Gabe einer immunmodulierenden Substanz in einer Toxizitätsstudie in jedem lymphatischen Organ unterschiedlich sein.

Im Zuge des fortschreitenden technologischen Fortschritts ist eine quantitative Analyse von digitalisierten immunhistochemisch-gefärbten Gewebeschnitten immer mehr im Fokus der Forschung und Routinearbeit (Dunstan et al., 2011). Dies würde auch eine objektive Messung ermöglichen, in dem die gefärbten Zielzellen automatisch mithilfe eines speziellen Programms gezählt werden. Hier käme z.B. das Definiens®-System zur objektiv-basierten Bildanalyse in Frage.

4.3 Die Übertragbarkeit von immunmodulatorischen/-toxischen Effekten auf den Menschen

Die Untersuchung von immunmodulatorischen Eigenschaften von Substanzen in toxikologischen Standarduntersuchungen in der Ratte dient letztendlich als Vorhersagemodell, um die Wirkung auf das Immunsystem im Menschen abschätzen zu können. In einer Publikation von Kemmerling et al. (2015) wurden beispielhaft Daten der vier archivierten Studien in dieser Arbeit (AZA, CSA, BAP, HCB) und zwei weiteren Studien mit AZA und HCB verwendet, um Aussagen zur Übertragbarkeit von subakuten vierwöchigen oralen Toxizitätsstudien in Ratten zur translationalen Forschung (Vergleich zu Daten mit anderen Spezies, insbesondere Menschen) zu treffen. Hier wurden zusätzlich eine ganzheitliche Betrachtung mit dem Vergleich weiterer Studiendaten wie Hämatologie, Organgewichte, Immunfunktionstests vorgenommen, um herauszufinden, ob die untersuchte Substanz primär immuntoxisch ist. Obwohl die Immunfunktion in Säugetieren eine hohe grundsätzliche Übereinstimmung hat, sollte bei Frage der Übertragbarkeit zwischen Säugerspezies bedacht werden, dass das Immunsystem in die Anpassung an spezifische Lebensumstände eingebunden ist. Hinzu kommen Unterschiede im Metabolismus, die spezies- und stammabhängig sein können oder sogar individuell variieren können. Daher gibt es bei der Übertragung von Daten, die in Ratten gewonnen wurden, auf den Menschen grundsätzliche Aspekte zu beachten. Die Sensitivität von Ratten scheint von Faktoren wie Stamm, Geschlecht, Stresslevel und Metabolismus abzuhängen. In dieser Studie zeigten die beiden Immunsuppressiva AZA und CSA eine große Ähnlichkeit in den Effekten zwischen Labortieren und Menschen, da das Immunsystem das primäre Zielorgan war. HCB hatte uneinheitliche Immuneffekte von verschiedenen Spezies gezeigt. In einigen Studien wurden Entzündungszeichen gefunden, während in Primaten eine Lebertoxizität vorherrschte. Insgesamt war das Immunsystem nach der Gabe von HCB nicht bei allen Spezies das sensitivste Zielorgan. Im Fall von BAP war allerdings das Immunsystem das empfindlichste Organ in Ratten. Hier ist zu beachten, dass die verabreichten Dosen von BAP im Rattenversuch keine realistische Beziehung zur humanen Exposition haben, da Menschen ausschließlich mit Mischungen von PAKs inklusive BAP in Berührung kommen und einer geringeren Exposition ausgesetzt sind. Des Weiteren orientieren sich die Dosen in den Tierversuchen demnach, dass in der obersten Dosis Toxizität zu sehen ist, um einen Schwellenwert (meistens NOAEL) ableiten zu können. Insgesamt wurde gefolgert, dass eine *case-by-case* Betrachtung für das Testen der Immuntoxizität wichtig ist.

Verbesserte Aussagen zur Übertragbarkeit von Tieren auf Menschen in Immunzellen kann von *in vitro* Tests wie Funktionstests erwartet werden, um einen direkten Vergleich von Reaktionen auf Immunzellen und ein besseres Verständnis von Ergebnissen und Variationen in Tierstudien zu haben. Des Weiteren sollten zukünftig Polymorphismen näher betrachtet werden.

4.4 Der Nutzen der Laser-Scanning-Mikroskopie im Vergleich zur lichtmikroskopischen Betrachtung von Paraffinschnitten

Die Anwendung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie mit dem LSM 700 von Zeiss an Paraffinschnitten der Milz und Thymus war nach aufwendiger Etablierung erfolgreich. Der Einsatz der gleichen immunhistochemischen Marker ermöglichte beeindruckende Fluoreszenzbilder, die neue zytologische Details zeigten (siehe Abb. 17/18). Die Laser-Scanning-Mikroskopie scheint sich gut für mechanistische Untersuchungen zu eignen. Nach derzeitigem Stand ist diese Methode für Routineuntersuchungen eher ungeeignet, da die Bedienung des LSM700 aufwendig und zeitintensiv war. Zudem weisen die Fluoreszenzgefärbten Schnitte eine deutlich kürzere Haltbarkeit (ca. sechs Monate) als die mit Chromogenen gefärbten Schnitte auf, weshalb eine Archivierung nur über die Speicherung digitaler Bilder erfolgen kann und nachträgliche Betrachtungen nach Haltbarkeit nicht mehr möglich sind. Bei der Laser-Scanning-Mikroskopie besteht ein hoher Aufwand die Hintergrundfärbung zu minimieren und die Orientierung am Mikroskop ist erschwerter als in der Lichtmikroskopie. Insgesamt lässt sich sagen, dass der gegenwärtige Erfahrungsstand in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie noch nicht fortgeschritten ist, um die lichtmikroskopische Routine-Betrachtung abzulösen (Tab. 31), könnte aber eine vielversprechende Methode in der Zukunft sein.

Des Weiteren lässt sich vermuten, dass eine quantitative, morphometrische Analyse mit Fluoreszenzfarbstoffen, d.h. die Zählung von Zellen und Messung von Bereichen, einfacher ist, da die Farbstoffe stärkere Signale geben.

Erste Versuche an Gefrierschnitten konnten eine erfolgreiche Detektion von T-Helferzellen in Milz und Thymus der Ratte mit dem Biomarker CD4 erreichen (Abb.19). Dies war an Paraffinschnitten nicht möglich, da kein paraffingängiger Antikörper erhältlich war. Ein entscheidender Vorteil der Gefrierschnitte gegenüber Paraffinschnitten ist eine breitere Auswahl an erhältlichen Biomarkern.

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie in lymphatischen Organen in Nagern wird häufig für die intravitale Mikroskopie verwendet, um zelluläre Interaktionen von Immunzellen zu untersuchen. Dabei werden die zellulären Bewegungen in Echtzeit visualisiert (Grayson et al., 2001; Bajenoff et al., 2006; Germain et al., 2008).

Teil 2: Etablierung von Immunbiomarkern in einer oralen 28-Tage Toxizitätsstudie in Ratten

4.5 Konsistenz/Inkonsistenz bei Immuneffekten in toxikologischen Studien

In der neu durchgeführten oralen 28-Tage-Toxizitätsstudie nach wiederholter Gabe an Ratten wurden die bereits zuvor untersuchten Immunsuppressiva und bekannten Modellsubstanzen Azathioprin und Cyclosporin A verabreicht. CSA wurde in den gleichen Dosierungen gegeben und AZA nur in der oberen Dosierung der Vorläuferstudie (20 mg/kg).

Die Anwendung der immunhistochemischen Biomarker an frisch eingebetteten, optimal fixierten lymphatischen Organen war deutlich unkomplizierter als in dem archivierten Gewebe. Es wurden die gleichen sechs immunhistochemischen Biomarker verwendet, um die Ergebnisse der Studien untereinander zu vergleichen. Da AZA nur in der Dosierung 20 mg/kg verabreicht wurde, kann nur die oberste Dosierung der archivierten Studie (Tab.14/15) verglichen werden. Während die Ergebnisse der H&E-Färbung mit der älteren Studie vergleichbar waren (Tab.33), gibt es deutlich mehr Befunde bei der IHC-Färbung in der neuen Toxizitätsstudie mit AZA (Tab.34). Die Befunde im Thymus bei der H&E-Färbung 'verringertes Rinde/Mark-Verhältnis' und 'reduzierte Fläche der Rinde' waren in der Größenordnung ähnlich, nur die 'unklare Abgrenzung Rinde/Mark' war in allen Tieren der neuen Studie vorhanden und in der archivierten nur in zwei von sechs Tieren. Zusätzlich waren die Befunde 'reduzierte Zellularität Rinde' und 'reduzierte Fläche Mark' in der neuen Studie bei fast allen Tieren aufgetreten. Mithilfe der IHC-Färbung konnten mit dem Biomarker Zytokeratin die gleichen Effekte an den Epithelzellen gesehen werden, nämlich ein Verschwinden von epithelfreien Regionen und eine erhöhte Dichte des Epithelnetzwerkes. Hinzu kommen viele weitere Befunde, die nicht in der archivierten Studie gesehen wurden. Es waren weniger Lymphozyten vorhanden und die Zahl der Makrophagen in Milz und Thymus sowie vergrößerte apoptotische Zellen im Thymus waren erhöht. Diese gegensätzlichen zellulären Effekte passen zusammen. AZA führte zu einem direkten Effekt auf die Lymphozyten mit einer Depletion und einer Thymusatrophie. Die erhöhte Zahl an Makrophagen und vergrößerten apoptotischen Zellen deutet darauf hin, dass vermehrt abgestorbene oder geschädigte Zellen (größtenteils Lymphozyten) entstanden waren, die von den Makrophagen entfernt wurden. Der Grund für den Verlust an Information im Archivmaterial wird hauptsächlich in lagerungsbedingten Artefakten gesehen. Es muss aber auch bedacht werden, dass die Wiederholung von Studien aufgrund anderer Variablen, wie Haltungsbedingungen, genetischem Hintergrund der Tiere, Änderungen in der Prüfsubstanzformulierung, nicht notwendiger Weise exakt gleiche Ergebnisse erbringt.

Die Gabe von CSA löste in der neuen Studie im Thymus vergleichbare Effekte wie in der archivierten Studie aus: Ein dosisabhängiges erhöhtes Rinde/Mark-Verhältnis und eine kleinere Fläche des Marks, sodass der Effekt im Thymusmark ausgeprägt war (Tab. 33).

In der Milz waren mit der H&E-Färbung auch ähnliche Effekte zu finden, die sich in einer geringeren Fläche der PALS und Follikel äußerten. Daraus kann geschlossen werden, dass die lymphozytenreichen Gebiete in der Milz depletiert waren. Der primäre Effekt erfolgte auf die T-Zellen. Da B- und T-Zellen miteinander agieren, ist als sekundärer Effekt auch eine Beeinflussung der B-Zellgebiete (wie in der Milz) zu erwarten.

Zusätzlich war in der neuen Studie eine markante Grenze zwischen weißer Pulpa und Marginalzone im Bereich der sogenannten marginalen Metallophilen in der oberen Dosis zu sehen.

Ein Vergleich in der IHC-Färbung kann nur bei dem Makrophagenmarker CD68 erfolgen, da dieser als einziger in der archivierten Studie erfolgreich angewendet werden konnte. Beide Studien haben eine Vermehrung der Makrophagen in der Thymusrinde gezeigt. Die *Tingible body*-Makrophagen können im Prinzip als unmittelbare Behandlungsfolge, aber auch sekundär in Folge einer stressbedingten Thymusatrophie aufgetreten sein (siehe 4.2.6). Da Stress zur Apoptose von Lymphozyten im Thymus führt, beseitigen folglich die Makrophagen diese Zellen. Im vorliegenden Fall wäre jedoch von einem direkten Substanzeffekt auszugehen, da die Zunahme von Makrophagen der empfindlichste Effekt war. Dieses wäre als sekundäre Reaktion nicht zu erwarten. Stresseffekte werden üblicherweise in Dosierungen gefunden, bei denen klare Organeffekte und/oder Veränderungen an der Nebennierenrinde und/oder verringertes Körpergewicht gesehen werden (Pruett et al., 1999; Pruett, 2001). Die vielen weiteren immunhistochemischen Marker haben die Befunde in der H&E-Färbung der neuen Studie bestätigt: Das verringerte Thymusmark war u.a. durch das Verschwinden von B-Zellen ausgelöst (CD79-Marker). Die Funktion von B-Zellen im Thymusmark ist unbekannt. Da B-Zellen in allen Spezies dort gefunden werden, scheinen sie eine wichtige Rolle zu spielen, evtl. bei der negativen Selektion von T-Zellen (Perera & Huang, 2015).

Neben einer erhöhten Anzahl von Makrophagen im Thymus, konnte die IHC-Färbung mehr apoptotische Zellen detektieren. Die reduzierte Fläche der PALS in der Milz steht im Zusammenhang mit einer reduzierten Anzahl von (zytotoxischen) T-Zellen in der PALS (CD3- und CD8-Marker). Die markante Zellpopulation bei Ratten an der Grenze zwischen weißer Pulpa und Marginalzone kann durch die Ausdünnung von T-Zellen in der Marginalzone (CD3-Marker) stärker hervortreten.

Ein ungewöhnlicher Befund war allerdings mit dem Biomarker Zytokeratin im Thymus feststellbar: an den Epithelzellen wurde in allen Dosisgruppen, inklusive Kontrolle, bei einigen Zellen eine veränderte Morphologie gefunden.

Die Epithelzellen hatten kürzere, dickere oder deformierte Fortsätze, deren Schweregrad mit erhöhter Dosis zunahm. Dieser Effekt könnte mit einer direkten Wirkung von CSA auf Epithelien in Zusammenhang stehen, die sich auch in der Nebenwirkung einer Hypertrichose (verstärkter Haarwuchs) ausdrückt, also nicht nur auf die Thymusepithelien beschränkt ist. Gafter-Gvili und Kollegen haben 2004 herausgefunden, dass die Gabe von CSA das Haarwachstum durch eine erhöhte Zahl an Haarfollikeln bei athymischen Nacktratten induziert. Weitere Studien berichten ebenfalls einen Einfluss von CSA auf Epithelzellen (Ayanoglou & Lesty, 1999; Birraux et al., 2006).

Die Aufstellung des Schwellenwertes LOEL ist in der neuen Studie für die IHC-Färbung derselbe wie für die H&E-Färbung: 1 mg/kg. Dieser Effekt bezieht sich auf eine erhöhte Anzahl von Makrophagen im Thymus. In der archivierten Studie lag der LOEL für die IHC ebenfalls bei 1 mg/kg, aber der Schwellenwert in der H&E-Färbung bei 5 mg/kg. Auch in der archivierten Studie bezog sich der LOEL in der IHC-Färbung auf erhöhte Makrophagen im Thymus. Obwohl möglicherweise beide Substanzen chemisch nicht vollkommen identisch waren, waren die Hauptwirkung bzw. die primären Effekte ähnlich und die hohe Sensitivität der IHC erkannte in beiden Fällen bereits in der untersten Dosis diese Effekte.

4.6 Die Betrachtung der Gesamtdaten zu Standardprüfungen in der Toxizitätsprüfung

Die Daten zu klinischen Befunden, Mortalitäten, Körper- und Organgewichten, Hämatologie, makroskopischen Organuntersuchungen und Histopathologie sind die Standardparameter in einer toxikologischen Studie und in der Tabelle 32 zusammengefasst. Diese Daten sollten immer zusammen betrachtet und in Beziehung gesetzt werden, um die primären und sekundären Immuneffekte einer Substanz zu identifizieren.

In der Gesamtbetrachtung fällt auf, dass die sensitivsten Effekte in der untersten Dosis CSA in der Hämatologie und der Histopathologie im Thymus zu sehen sind. In der Histopathologie konnten bereits in der untersten Dosis, sowohl in der H&E-Färbung als auch in der IHC-Färbung, erhöhte Zahlen an Makrophagen nach CSA gesehen werden. Dieser Befund könnte das erste Zeichen eines primären Immuneffektes sein. Alternativ kann dieser Befund auch als stressbedingt begründet sein.

In der hämatologischen Untersuchung waren die Werte PTT (Partielle Thromboplastinzeit) und PT (Prothrombinzeit) signifikant erniedrigt, welche einen Einfluss auf das Gerinnungssystem zeigten. Dieser Befund wird häufig in Toxizitätsstudien an Labortieren beobachtet (Kurata et al., 2003). Da Gerinnungsfaktoren in der Leber produziert werden, weist ihre Beeinflussung auf eine Hepatotoxizität hin.

In der Toxikologie wäre ein Beispiel die Untersuchung von Badylak & Van Vleet an Hunden, in denen Veränderungen der PTT und PT Indikatoren für eine Leberschädigung waren (Badylak & Van Vleet, 1981). Es ist bekannt, dass CSA die Leber beeinflusst, welches erhöhtes Lebergewicht und histopathologische Veränderungen in der Leber (hepatozelluläre Veränderungen mit erhöhtem Glykogen) nach CSA erklären würde.

In der mittleren Dosisgruppe CSA waren deutliche immunsupprimierende Effekte im Thymus, in der Milz und den mesenterialen Lymphknoten zu sehen. In der oberen Dosis war die Toxizität bereits so fortgeschritten, dass weitere nicht-lymphatische Organe betroffen und die Körpergewichte erniedrigt waren. Die Tiere hatten allerdings noch keinen bedenklichen klinischen Zustand. Hinweise auf Störungen in der Leber-, oder Nierenfunktion, wie in den Organgewichten und Histopathologie ersichtlich, können auch die Werte von erniedrigten Hämoglobin, Protein, Albumin und erhöhten Urea und Bilirubin liefern. Nierenveränderungen können zudem auch durch Stress ausgelöst werden.

Die Gabe einer hohen Dosis von AZA (20 mg/kg) führte zu einer erkennbaren Toxizität, sowohl in Immunorganen als auch in anderen Organen. Interessanterweise nahm das Körpergewicht der Ratten zu, sodass ein appetitsteigernder Effekt von AZA zu vermuten ist. Leider wurde der Futterverbrauch in dieser Studie nicht bestimmt, um diese Vermutung zu bestätigen. Häufig findet man in Toxizitätsstudien keine Erklärung für ein erhöhtes Körpergewicht. So könnte auch eine eingeschränkte Nierenfunktion zu Ödemen führen, die wiederum das Körpergewicht ansteigen lassen. Ein anderer Grund könnte eine schlechte Verstoffwechslung sein. Diese Vermutung kann durch den erhöhten Wert an Cholesterin gestützt werden, der eine Störung im Fettstoffwechsel anzeigt. Vergleichbare Befunde konnte De Waal und Kollegen (1995) zeigen, die AZA und CSA im Rahmen der Internationalen Ringstudien ICISIS in einer 28-Tage Toxizitätsstudie untersucht haben. AZA hatte hier allerdings zu einem signifikant erniedrigten Körpergewicht der Ratten geführt. In den hämatologischen Parametern war auch in der oberen Dosis Hämoglobin und Hämatokrit reduziert. Außerdem war auch das Thymusgewicht in dieser Studie in der oberen Dosis signifikant erniedrigt.

Ein primärer oder sekundärer Immuneffekt kann für die AZA-behandelten Tiere nicht bestimmt werden, da nur eine Dosis verabreicht wurde, die bereits deutliche immunsupprimierende (Thymusatrophie) und weitere nicht-lymphatische Organeffekte (hepatozelluläre Veränderungen) gezeigt hat.

4.7 Die Hauptkomponentenanalyse und *Heatmap*-Darstellung als geeignetes Mittel zur Visualisierung von großen toxikologischen Datenmengen

Die zwei Darstellungsarten Hauptkomponentenanalyse und *Heatmap* fassen die großen Datenmengen aus den toxikologischen Standarduntersuchungen und immunhistochemischen Ergebnissen zusammen und vereinfachen so die Interpretation der Effekte.

Die Hauptkomponentenanalyse ist eine etablierte statistische multivariante Analyse, die häufiger zur Visualisierung von Genexpressionsdaten verwendet wird. Publikationen zur Hauptkomponentenanalyse in *in vivo* Toxizitätsstudien sind begrenzt (Hothorn, 2014; Ikarashi et al., 1994; Keil et al., 1999; Strauss et al., 2009). Eine Anwendung der multivarianten Analyse in der Immuntoxikologie war nicht effektiv genug, um den Einfluss von Substanzen auf die Immunfunktion vorherzusagen (Keil et al., 1999). Ein möglicher Grund kann darin liegen, dass das Immunsystem sehr komplex und facettenreich ist und eng mit dem endokrinen - und Nervensystem kommuniziert.

Ein Teil der archivierten Studien, deren Untersuchung in Kemmerling et al. (2015) veröffentlicht wurde, wurden einer Hauptkomponenten- und Hauptkomponenten-Diskriminant-Analyse unterzogen (Kuper et al., 2015). Das Ergebnis dieser Analyse war, dass die Hauptkomponentenanalyse die Gemeinsamkeiten zwischen jeweils zwei unabhängigen Toxizitätsstudien mit AZA und CSA erkannt und Ausreißer identifiziert hatte.

In der Abb.20 sind ausgewählte Parameter aus Histologie, Klinischer Chemie, Hämatologie und Körper-/Organgewichtsmessungen in einer jeweiligen Dosisgruppe zusammengefasst in einem dreidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Diese Hauptkomponentenanalyse zeigt visuell, dass die Tiere der oberen Dosisgruppe mit CSA und die mit AZA behandelten Tiere gegensätzliche Behandlungseffekte aufweisen und sich klar von den übrigen Gruppen unterscheiden. Die Dosisgruppen 1 und 5 mg/kg CSA liegen in der Nähe der Kontrollgruppe und weisen ähnliche Behandlungseffekte auf. Des Weiteren konnten zwei Ausreißer (*outlier*) identifiziert werden, die eine andere Lage als die übrigen Tiere ihrer Behandlungsgruppe einnehmen. Die Daten dieser Individuen wurden nicht weiter untersucht. In toxikologischen Tierstudien wird zwischen zufälligen Ausreißern und Tieren, die individuell empfindlicher aufgrund Ihrer genetischen Ausstattung, ihres Körperzustands auf eine Substanz reagieren, unterschieden.

Dies deutet darauf hin, dass auch andere Spezies, einschließlich Mensch, empfindlich reagieren können. In der Regel werden Ausreißer aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen, da sie die Ergebnisse stark beeinflussen (hohe Standardabweichung). Die Identifikation dieser Individuen lässt sich nicht durch einen einfachen Blick auf die Ergebnistabellen erkennen.

Die Hauptkomponentenanalyse ermöglicht eine einfache Identifizierung der Ausreißer: Ordnet sich ein Tier aus der Kontrolle oder unteren Dosis in dieselbe Richtung wie die Tiere der oberen Dosis an, handelt es sich womöglich um ein empfindliches Tier. Ist ein Tier in einer komplett anderen Richtung als die übrigen Tiere der Dosisgruppen handelt es sich eher um einen zufälligen Ausreißer, der auch auf einen technischen Fehler hinweisen kann. In dieser Untersuchung handelt es sich anscheinend bei einem Tier der mittleren Dosis CSA um eine empfindliche Reaktion auf CSA, da es sich in der Nähe der oberen Dosis CSA anordnet. Der andere Ausreißer reagiert wahrscheinlich zufällig, da dieser in der Nähe der AZA-Dosisgruppe liegt.

Die auftretenden Befunde in den Dosisgruppen stimmen mit der Interpretation der Hauptkomponentenanalyse überein: Die größten Unterschiede zwischen den Dosisgruppen waren in der oberen Dosisgruppe mit CSA und AZA zu sehen. Folglich ist die Hauptkomponentenanalyse ein gutes Mittel, um einen schnellen Überblick über die Behandlungseffekte zwischen Dosisgruppen zu erhalten und somit Unterschiede im Wirkmechanismus verschiedener Substanzen zu identifizieren. Sie kann dabei helfen, die Struktur der Daten in einer „blinden“ Weise zu verstehen, ohne ein Vorwissen über die Befunde in den Gruppen zu besitzen. Diese Analyse lässt sich gut in einer toxikologischen Routinestudie einbauen und wäre für zukünftige Untersuchungen eine geeignete Option. Sie müsste allerdings noch weitere Anwendung in toxikologischen Standarduntersuchungen finden, um sicherere Aussagen zu deren Erfolg treffen zu können.

Die andere verwendete Darstellungsweise, welche die Häufigkeit von Befunden aus Histopathologie, Hämatologie, Klinische Chemie und Körper-/Organgewichte miteinander vergleicht, ist die *Heatmap* (Abb 21 A-C). Mit dieser übersichtlichen Darstellung war es möglich, Befunde zu identifizieren, die zusammenhängen, Einzelbefunde aufzudecken oder die Variabilität eines Befundes in einer Gruppe zu betrachten.

Eindeutige Muster in der Darstellung sind bei den histopathologischen Ergebnissen zu sehen (Abb. 21 A). Hier ist ein dosisabhängiger Effekt bei den CSA-Gruppen zu erkennen. Außerdem werden die ersten Befunde im Thymus ab der untersten Dosis mit CSA ersichtlich. Zusammenhängende Effekte sind in der oberen Dosis schwer abzuleiten, da die Toxizität bereits systemisch vorliegt und mehrere Organsysteme parallel betroffen sind.

Diese systemische Toxizität ist ebenfalls in der AZA-Dosisgruppe zu sehen. Wie zu erwarten, sind in dieser Darstellung der unterschiedliche Wirkmechanismus und die daher unterschiedliche Befundkonstellation bei AZA und CSA deutlich erkennbar.

Die Darstellung der hämatologischen und klinisch-chemischen Daten (Abb. 21 B) zeigt eine hohe Variabilität innerhalb und zwischen den Dosisgruppen. Hier lassen sich keine dosisabhängigen Effekte bei CSA ableiten. Einheitliche, zusammenhängende Effekte sind nur in der oberen Dosis mit CSA bei den Werten für Cholesterin, Triglyceride und Bilirubin vorhanden. Erhöhte Werte von Cholesterin und Bilirubin können auf eine Leberstörung hinweisen, die sich nur ansatzweise in der Histopathologie andeutete, aber stärker in einem veränderten Lebergewicht in der oberen Dosis.

Der aussagekräftigste Serumwert bei Azathioprin war das Cholesterin. Hier wurden deutlich stärkere Leberveränderungen in der Histopathologie gesehen.

In der Tabelle 21 C waren die auffälligsten Werte für Körper- und Organgewichte in erhöhtem Lebergewicht in der oberen Dosisgruppe CSA und AZA und finalen Körpergewicht bei CSA zu sehen.

Die Werte in der *Heatmap* stimmen mit den Rohtabellen überein. Verminderte Werte sind allerdings in dieser Darstellung weniger augenscheinlich, da erhöhte Werte mit einer hellen Farbe stärker visuell in den Vordergrund rücken. Eine Lösung könnte eine andere Farbauswahl für die Score sein.

Die *Heatmap* ist eine bekannte Darstellung in der Genetik bzw. mechanistischen Toxikologie, um Genexpressionsdaten zu visualisieren. Für verschiedene Daten aus toxikologischen Standardstudien ist diese Darstellungsweise wenig bekannt. Auman und Kollegen (2007) haben die *Heatmap* Visualisierung für klinisch-chemische Daten verwendet, um Veränderungen zu *clustern*, die auf eine Hepatotoxizität hindeuten. Das hierarchische *Clustern* von individuellen Tierdaten zu histopathologischen Befunden hatte Lobenhofer und Kollegen (2006) ebenfalls als gute Visualisierung angesehen, um biologische Einblicke zu vereinfachen. Dies erhöhe die Möglichkeit, Zusammenhänge zu identifizieren und den Vergleich zu andersartigen Daten, wie z.B. genetischen Daten, zu vereinfachen.

Insgesamt ist auch diese Darstellung für die Anwendung in toxikologischen Studien zu empfehlen, da die Farbmuster einen besseren und schnelleren Überblick über die Befunde geben als lange Tabellen, die von Nicht-Pathologen schwierig zu lesen sind.

Brown und Kollegen (Brown et al., 2016) haben ebenfalls versucht, histopathologische Daten aus toxikologischen Studien grafisch darzustellen. Sie sind zu dem Ergebnis gekommen, dass Grafiken ein effizientes Kommunikationswerkzeug für Pathologen und Nicht-Pathologen sind. Außerdem unterstützen sie die Hypothese-Bildung aus großen komplexen Datensätzen mehrerer Studien, um dadurch Muster und Trends ableiten zu können.

4.8 Immuntoxikologische Standarduntersuchungen

Die Bestimmung von Immunglobulinen im Serum (IgA, IgG und IgM) zur Untersuchung der humoralen Immunität als Antwort auf die immunsuppressiven Substanzen zeigte keine dosisabhängigen Effekte bei CSA. Außerdem konnte kein Isotypen-Klassenwechsel (sog. *immunglobulin class switch*) mit diesen Messungen beobachtet werden.

Allerdings wurde in einer 28-Tage oralen Toxizitätssudie mit AZA und CSA als Modellschubstanzen eine Gemeinsamkeit mit diesen Ergebnissen in der Immunglobulinmessung der IgG-Spiegel im Serum gefunden (De Waal et al. 1995): Die mit CSA-behandelten Tiere der mittleren Gruppe mit der gleichen Dosierung von 5 mg/kg zeigten ebenfalls signifikant reduzierte Werte bei IgG (vgl. Abb. 22B). De Waal et al. vermuteten, dass CSA verschiedene Effekte auf die klassenspezifische Regulation der Antikörper-Produktion oder Effekte auf Isotypenwechsel bewirkt. Die Veränderungen von Immunglobulinen in der immuntoxischen Untersuchung sollen normalerweise auf sekundäre Effekte von Substanzen auf das Immunsystem hinweisen, wobei insbesondere IgA aufgrund der geringeren individuellen Varianz als sensitiver Parameter angesehen wird (Vohr & Rühl-Fehlert, 2001).

Die genauen Einflüsse der beiden Substanzen waren in dieser Untersuchung nicht offensichtlich.

Die zweite immuntoxische Untersuchungsmethode war die Subpopulationsanalyse von Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS) in Milz und mesenterialen Lymphknoten.

Die Untersuchung der Immunzellen war in der Milz nicht so erfolgreich wie erwartet. Die Unterschiede zwischen den Dosisgruppen, den Substanzen und zur Kontrolle waren nicht sehr deutlich. Jedoch gab es vor allem in der unteren Dosis CSA große Unterschiede zwischen den Sektionstagen 1 und 2 und teilweise eine hohe Standardabweichung, die einen möglichen Einfluss von AZA und CSA auf die Immunzellen überdecken könnte. Dies könnte durch eine unterschiedliche Handhabung in der Sektion der Milz zurückzuführen sein. Die Lokalisation der Milzstücke ist für diese Analyse entscheidend, denn je nach Milzabschnitt können die Zusammensetzung der Zellen und damit die Effekte variieren.

Deutliche Effekte auf die Immunzellen konnten im Gegensatz zur Milz in den mesenterialen Lymphknoten gesehen werden. Hier war eine gegensätzliche Reaktion der Tiere vom ersten Sektionstag und zweiten Sektionstag viel größer als der in der Milz gesehene Unterschied: Die Tiere vom ersten Sektionstag hatten zum Teil doppelt so hohe Expressionswerte wie die Kontrolle, während die Tiere vom zweiten Sektionstag deutlich niedrigere Werte besaßen.

Berücksichtigt man die verschiedenen Einflussmöglichkeiten, z.B. Sektionszeitpunkt, Lösungsansätze, Transportwege, Wartezeiten bis zur Analyse, unterschiedliche technische Mitarbeiter mit möglicherweise unbewusst unterschiedlichen Arbeitsweisen, zeigen diese Abweichungen die starke Anfälligkeit der untersuchten Immunparameter für methodische Unterschiede. Dies erklärt eventuell die oft in der Literatur angeführte mangelnde Standardisierung und unterstreicht die Bedeutung von Laborstandards und laborspezifischen historischen Daten. Die einzige Ausnahme war die Messung des Markers CD45 RC^{low} auf Subpopulationen von Leukozyten, deren Werte am Sektionstag 1 und 2 ähnlich waren. Die Gabe von 25 mg/kg CSA löste eine signifikante Reduktion der Leukozyten auf 20% bezogen zur Kontrolle aus. Dies war bei bekannten Wirkmechanismus von CSA zu erwarten. Die restlichen Messungen der Biomarker sind fragwürdig und nicht signifikant. Es war zu erwarten, dass die Mengen an T-Zellen und Subpopulationen und NK-Zellen für beide Substanzen insbesondere für CSA weniger werden. Diese Entwicklung war bei den Tieren vom zweiten Sektionstag zu sehen. De Waal und Kollegen (1995) hatten an CSA-behandelten Tieren signifikant reduzierte T-Zellsubpopulationen in der Milz mithilfe der FACS-Analyse gesehen. Diese Methode wird häufig, wenn sie richtig angewandt wird, als einer der sensitiven Parameter in immuntoxischen Untersuchungen in 28-Tage-Studien angesehen (De Waal et al., 1995; Vohr & Rühl-Fehlert, 2011).

Die Wahl der lymphatischen Organe machte deutlich, dass sekundäre Immunorgane wie die Lymphknoten in der FACS-Untersuchung einbezogen werden sollten. Die Standardorgane für FACS in der immuntoxischen Betrachtung sind in der Regel Milz und Thymus. Die FACS-Untersuchung des Thymus wäre von besonderem Interesse in Dosisbereichen, bei denen keine oder nur minimale histopathologische Veränderungen gesehen werden, um die betroffenen Zelltypen und den LOEL genauer zu bestimmen.

4.9 Der Vergleich verschiedener Knochenmarksuntersuchungen zur Identifizierung von Hämatotoxizität

Die histopathologische Untersuchung des Knochenmarks *in situ* in Oberschenkel- (Femur) und Brustbeinknochen (Sternum) der Ratte ist eine Standarduntersuchung zur Identifizierung einer Hämatotoxizität infolge von Medikamenten oder Chemikalien. Während CSA in den Ratten keine histopathologischen Veränderungen im Knochenmark zeigte, löste AZA nur in wenigen Tieren ein erhöhtes Erythroid: Myeloid-Verhältnis aus. Es war zu erwarten, dass die Gabe von AZA einen stärkeren toxischen Effekt im Knochenmark bewirken würde.

Therapeutische Dosen von 1 - 5 mg/kg/Tag AZA können beim Menschen mit einer Inzidenz von 11 % als unerwünschte Nebenwirkungen eine Knochenmarksdepression mit den Folgen einer Leukopenie, Anämie, Thrombozytopenie und Blutungen verursachen (Carney et al., 1974). Die Erhöhung der Dosis von AZA, so Carney et al., resultiere in einer höheren Gefahr während der Behandlung von Abstoßungsreaktionen bei einer Nierentransplantation, da die Ausscheidung über den Urin vermindert ist. Deshalb sollte die Überdosierung nur an wenigen Tagen geschehen. Die genaue Behandlungszeit ist in dieser Publikation nicht angegeben. Aus einem online verfügbaren Beipackzettel (U.S. National Library of Medicine, Dailymed, 2014) ist zu entnehmen, dass je nach Indikation die Behandlungsdauer von einigen Wochen bis Monaten dauern kann. Die behandelten Patienten sind nicht mit den Ratten aus dem Tierversuch vergleichbar, da die Menschen bereits durch ihre Vorerkrankung ein geschwächtes Immunsystem besitzen und empfindlicher reagieren können. Außerdem ist zu beachten, dass es sowohl Unterschiede in Interspezies, die das Medikament unterschiedlich tolerieren (Carney et al., 1974) als auch individuelle Empfindlichkeiten von Intraspezies gibt. Ein Grund für eine erhöhte Anfälligkeit der Knochenmarkstoxizität bei Menschen ist ein genetischer Polymorphismus in der Thiopurin S-Methyltransferase (TPMT) (Sahasranaman et al., 2008).

Die Auswertung der Knochenmarksaustriebe, die in toxikologischen Studien fallweise durchgeführt werden, war aus technischen Gründen nicht möglich. Die vergleichende Auswertung von Knochenmarkszellen erfolgte daher an den zytologisch besser erhaltenen Zytopräparaten (Cytospots). Der Nachteil von Knochenmarksausstrichen liegt darin, dass abhängig vom ausgeübten Druck auf das Deckglas die Zellen auf den Objektträgern unterschiedlich verteilt bzw. auch beschädigt werden können. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen von Tieren sind unterschiedlich empfindlich gegenüber mechanischen Einflüssen und es gibt möglicherweise auch hier Speziesunterschiede. Die Zytospots könnten demgegenüber gleichmäßigere Ergebnisse liefern.

Die Auswertung der Zytospots resultierte in der vorliegenden Untersuchung allerdings in variablen Ergebnissen, die keinen dosisabhängigen Effekt zeigten. Zudem zeigten die Knochenmarkszellen vermehrt Vakuolenbildung (Abb.30). Im normalen Blutbild kommen Vakuolen nur bei phagozytierenden Monozyten vor, oder wenn Zellen mit alkoholischen Färbungen behandelt worden sind, welche die Zellmembran angreifen können. Wahrscheinlich lag ein mechanischer Effekt vor, der durch die Zentrifugation bedingt war und die Zellmembran porös werden ließ. Der Hersteller der Zytocentrifuge, Thermo Fisher, hat angegeben, dass dieses Gerät für die Verwendung von Knochenmarkszellen geeignet ist.

Letztlich können in der Zusammenschau von Literatur und eigenen Ergebnissen keine verallgemeinernden Aussagen zum Qualitätsvergleich von Knochenmarksaustriechen und Zytospots getroffen werden.

Die histopathologische Untersuchung des Knochenmarks, die i.d.R. der Pathologe durchführt, ist eine zeitaufwendige Arbeit, die ein bestimmtes Maß an Sorgfalt und Erfahrung erfordert.

Ansprechender ist die automatische Analyse von Knochenmarkszellen, die schneller und einfacher als andere Methoden zur Knochenmarksuntersuchung ist, wenn das Messgerät validiert ist. Die automatische Analyse des Knochenmarks kann durch eine FACS-Analyse durchgeführt werden (Reagan et al., 2011). Diese Methode findet selten in der toxikologischen Standardanalyse Anwendung, da frische Zellen erforderlich sind, sodass, anders als bei Paraffinschnitten oder Knochenmarksaustriechen, die Auswertung unmittelbar erfolgen muss.

In dieser Arbeit wurde die Vorgehensweise von Saad et al. (2000) für die differentielle Knochenmarksanalyse mithilfe der Durchflusszytometrie in der Ratte übernommen. Eine Abnahme von 50% zur Kontrolle der lymphoiden Zellen und Erythrozyten bei den mit AZA-behandelten Tieren stimmt mit der Erwartung einer Knochenmarkshemmung überein. Dieser Effekt ist nicht in diesem Ausmaß in der histopathologischen Untersuchung zu sehen, stimmt aber überein mit dem geringeren Werten für Hämoglobin und Hämatokrit, die auf eine Anämie (Mangel an Erythrozyten) hinweisen.

Ähnliche Effekte wurden in Fischer-344-Ratten gesehen, die mit 25 mg/kg AZA oder CSA über 30 Tage verabreicht wurden: Die Durchflusszytometrie zeigte eine Reduktion der Knochenmarkszellularität in der AZA-Gruppe, jedoch keine Veränderungen in der CSA-Gruppe (Smith et al., 2003).

Ebenfalls in dieser Methode sind deutliche Unterschiede in den Tieren der Sektionstage 1 und 2 zu sehen. Mögliche Einflüsse dieses Effektes könnte ein erhöhtes Stressaufkommen der Tiere sein, da die Hälfte der Tiere am ersten Tag aus dem Stall genommen und zur Sektion gekommen war und entsprechend ein Einfluss auf das soziale Gefüge der Tiere im Versuch bestanden haben könnte.

Ebenso sind verschiedenste unterschiedliche Handhabungen z.B. im Sektionsablauf, beim Ausspülen des Knochenmarks aus dem Femur und bei der weiteren Verarbeitung bis zur Messung seitens der Techniker an beiden Sektionstagen denkbar.

Insgesamt lieferte die Durchflusszytometrie von Knochenmark eine halbautomatische, übersichtliche und schnelle Methode, die für die Bewertung von Knochenmarkstoxizität in der Ratte in präklinischen Studien geeignet ist.

Der direkte Vergleich der FACS-Analyse mit der mikroskopischen Knochenmarksauswertung an Ausstrichen konnte in dieser Arbeit aufgrund von Artefakten nicht erfolgen. Criswell und Kollegen (1998) haben allerdings in ihrer Studie herausgefunden, dass die Induktion von hämatologischen Abnormalitäten gezeigt durch manuelle Knochenmarksdifferenzierung durch die effizientere und zuverlässigere Durchflusszytometrie in vielen präklinischen Toxizitätsstudien ersetzt werden kann.

Als Ergänzung zur FACS-Analyse und als Vergleich zur manuellen Differenzierung wurde das Hämatologie-System Advia 2120i für eine automatische Knochenmarkzellendifferenzierung in der Ratte verwendet. Der Advia 2120i wurde bereits für die Untersuchung von humanen Knochenmark (Jang et al., 2014) und bei Hunden (Tan et al., 2014) eingesetzt, aber es wurde bisher keine Verwendung in Nagern berichtet. Automatische Hämatologie-Analysiergeräte werden weitverbreitet in veterinären und humanen Laboratorien angewendet und auch Knochenmarkspalten von Menschen werden in den identischen Instrumenten analysiert wie für den Veterinärmarkt adaptiert. Es wird davon ausgegangen, dass das Knochenmark, bestehend aus verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen, ein ähnliches Streulicht und biochemische Eigenschaften wie die reifen Bestandteile im peripheren Blut erzeugt (Tan et al., 2014).

Die Analyse von Knochenmark im Advia resultierte in einer merklichen Reduzierung von Zellen insbesondere in weißen Blutzellen und Lymphozyten in allen Tieren der AZA-Gruppe. Die weiteren analysierten Zellen (Neutrophile, Eosinophile und Monozyten) zeigten nur am Sektionstag 1 fast keine vorhandenen Zellen im Knochenmark. Diese Ergebnisse stimmen für die AZA-Gruppe mit denen, die in der Durchflusszytometrie erreicht wurden, überein. Die Ergebnisse der CSA-behandelten Tiere können nicht zusammen bewertet werden, da die Ergebnisse der Sektionstage 1 und 2 stark auseinander gehen. In allen gemessenen Zellpopulationen bei CSA zeigte Sektionstag 1 sehr wenige Zellen, was für die niedrige Dosis von 1 mg/kg CSA sehr unwahrscheinlich ist, dass hier bereits ein Effekt zu sehen ist. Am Sektionstag 2 nahmen die Zellen durchgehend in der oberen Dosis CSA im Gegensatz zu den anderen Dosierungen zu. Diese zellproliferierende Tendenz ist auch sehr unwahrscheinlich.

Diese Methode lässt sich mit verhältnismäßig wenig praktischem und zeitlichem Aufwand gegenüber der manuellen Knochenmarkszell-Differenzierung durchführen und erscheint als Screening-Methode für Knochenmarksanalysen in der präklinischen Phase besonders interessant. Wenngleich die Messung an sich nicht aufwendig für den technischen Mitarbeiter ist, ist die Interpretation der Zytogramme eine größere Herausforderung für den Hämatologen, die Erfahrung benötigt.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass diese Methode noch nicht für Nager etabliert ist und kein passendes Programm für diese Spezies von dem Hersteller auf den Markt erhältlich ist. Erfahrene technische Mitarbeiter waren sich bei den Knochenmarksmessungen nicht eindeutig sicher, ob die Vorläuferzellen in den richtigen Zellgruppen einsortiert wurden, da die Zytogramme des Knochenmarks ein etwas anderes Bild ergab als im peripheren Blut. Zusätzlich wurde an einigen Publikationen von der Messung von Artefakten hingewiesen. Bauer et al. (2012) haben die automatische Blutanalyse des Advia 2120 in Hunden, Katzen und Pferden evaluiert. Sie stellten eine schlechte Korrelation zwischen der manuellen und automatischen Messung bei den Monozyten fest.

Als Grund sehen Bauer und Kollegen die niedrigere analysierende Zellzahl in manuellen Messungen im Vergleich zum Advia. Außerdem sind Monozyten in ihrer Morphologie und Größe hoch variabel, so dass sie schwer von anderen Zellpopulationen differenziert werden können.

Weiterhin wird der Advia mit einer sogenannten „Pseudobasophilie“ in Zusammenhang gebracht. Pseudobasophilie ist ein technisches Problem, bei dem abnormale Zellen im peripheren Blut als Basophile gezählt werden. Dieses Phänomen wird häufig bei unerfahrenen Bedienern des Advia beobachtet, welches durch ein Verständnis der Basophilen-Methode und des Zytogramms verbessert werden kann (Gibbs et al., 2009). Dieses Phänomen ist auch bei der Untersuchung von Knochenmark denkbar.

Zukünftig sollten auch andere automatische Hämatologie-Analysegeräte in Betracht gezogen werden. Beispielsweise haben Criswell et al., (2014) mit dem Sysmex XT-2000iV in Knochenmark von Ratten eine differentielle Knochenmarkszählung mit Behandlungsbedingten Effekten vergleichbar zur mikroskopischen Analyse erreicht.

Die FACS-Analyse von Knochenmark ist eine etablierte und gängige Methode im Gegensatz zum Advia. Außerdem bietet sie sehr viel mehr individuelle Möglichkeiten der Analyse, wenn bestimmte Zellpopulationen gesucht werden. Für Screening-Methoden *in vivo* ist sie zukünftig die Methode der Wahl.

Eine weitere Vorhersage von hämatotoxischen Eigenschaften von Substanzen lieferte der CFU (*Colony-Forming Unit*)-Assay, der *in vitro* an humanen CD34⁺-Zellen und *ex vivo* an Knochenmarkszellen der Ratte durchgeführt wurde. Die Behandlung der humanen Knochenmarkszellen mit den Substanzen AZA, CSA, BAP und HCB zeigten grundsätzliche Unterschiede in den Effekten zwischen den Immunsuppressiva und den Umweltchemikalien. Eine Konzentration von 30.000 ng/ml AZA oder CSA ließ keine Kolonien (CFU und BFU) auf dem Medium wachsen. Ein dosisabhängiger Effekt war bei AZA ab 1000 ng/ml mit einer stetigen Reduktion der Kolonien zu finden. Bei CSA trat eine Reduktion von Kolonien erst ab 10.000 ng/ml auf. Dieser früher eintretende schädigende Einfluss auf das Knochenmark bei AZA war gegenüber CSA zu erwarten. Die Umweltchemikalien hingegen lösten bis 10.000 ng/ml keine komplette Hemmung der Kolonien aus.

Die Kurven zeichneten sich in ihrem Verlauf durch Auf- und Abstiege der Kolonienanzahl aus. Aus diesem *in vitro* Versuch ist zu schließen, dass BAP und HCB keine unmittelbare Knochenmarkstoxizität bewirken. Der Wirkmechanismus der beiden Substanzen, soweit bekannt, lässt zudem keinen Einfluss auf das Knochenmark vermuten. Bei BAP können jedoch die Metaboliten eine schädigende Wirkung besitzen. Vielversprechende Ergebnisse konnte die mikroskopische Betrachtung der Zellen in den Kolonien in einem Vorversuch zeigen. Anhand von morphologischen Charakteristika konnten bei den mit AZA behandelten Zellen erste Veränderungen wie beschädigte Zellmembranen bereits ab 100 ng/ml gesehen werden.

Der *ex vivo* CFU-Assay, der mit den Knochenmarkszellen aus dem Rattenversuch durchgeführt wurde, zeigte in keiner der Dosisgruppen eine Wachstumshemmung. Ein Grund dafür ist, dass diese Zellen nicht aktiv in der *in vitro*-Schale mit der Substanz behandelt wurden. Die genaue physiologische Gewebekonzentration im Tier, die nach Aufnahme und Metabolisierung der Substanz die Knochenmarkszellen erreicht haben könnte, ist schwer nachzuvollziehen.

Hierzu müssten Studien zur physiologisch-basierten toxikokinetischen (PB-TK) Modellierung durchgeführt werden, um die Aufnahme und Verteilung von Chemikalien basierend auf biochemischen Reaktionsraten, physiologischen und anatomischen Eigenschaften vorherzusagen

Der *in vitro* CFU-Assay eignet sich gut für eine Vorhersage von Knochenmarkstoxizität in präklinischen Studien. Seine Vorteile liegen in der Abbildung von dosisabhängigen Effekten, dem Vergleich verschiedener Substanzen in womöglich verschiedenen Spezies und dem Verzicht von Tierversuchen. In dieser *in vitro* Methode sind allerdings nicht indirekte hämatopoetische Effekte wie durch Spezies-spezifische Metabolite oder sekundäre Hämatoxizität durch andere Organschaden oder -dysfunktion testbar (Criswell et al., 2014).

Es scheint, dass eine Kombination aus der Auszählung von Kolonien und der mikroskopischen Betrachtung hinsichtlich morphologischer Zellveränderungen als Reaktion auf die Substanz sensitivere Ergebnisse liefern könnte.

Dieser *in vitro* Hämatoxizitäts-Assay kann eine Schlüsselrolle in der Lücke zwischen präklinischer und klinischer Untersuchung spielen. Dieser Test könnte in der Vorhersage der *maximum tolerated dose* (MTD) entscheidend beitragen, die für die Wahl der Startdosis in der klinischen Phase I als Basis herangezogen wird. Des Weiteren wird die Myelosuppression mit Reduktion der Granulozyten (Granulozytopenie, Agranulozytose) als größeres klinisches Risiko im Vergleich zur Lymphozytopenie angesehen und viele Chemotherapeutika lösen als Nebenwirkung eine Myelosuppression aus (Gribaldo, 2002).

Der Begriff Myelosuppression versteht sich in diesem Zusammenhang als Störung der myeloischen Reihe und nicht allgemein als Knochenmarksuppression. Der *colony-forming unit* Test befindet sich derzeit in der Validierung der ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*).

4.11 Ausblick

Die histologischen Immunbiomarker in Milz und Thymus der Ratte konnten in den meisten Studien zelluläre Veränderungen empfindlicher anzeigen als die H&E-Färbungen. Damit können sie bereits in der ersten Teststufe als Ergänzung zur H&E-Färbung sinnvoll sein, um frühzeitig in der Entwicklung von Medikamenten bzw. chemischen Produkten immunmodulatorische bzw. immuntoxische Befunde zu erkennen. Insbesondere ergeben sich folgende Vorteile: Die Biomarker können bei der Bestimmung von Schwellenwerten (wie NOEL, LOEL) helfen, historische Kontrolldaten zu den Biomarkern kommen auch weiteren Untersuchungen zugute ebenso wie ein Vergleich von Ergebnissen über mehrere Untersuchungen zusätzliche Einblicke in die mechanistischen Hintergründe der Veränderungen ermöglicht. Schließlich führt die wiederholte Anwendung einer Methode zu erhöhter Routine und Reproduzierbarkeit, indem die Laboranten ihre methodische Kompetenz erweitern.

Die Auswahl der sechs Biomarker deckte die wichtigsten Immunzellen bzw. interagierende Zellen ab und ist im Aufwand praxistauglich. Abhängig vom Wirkmechanismus und von den histopathologischen Ergebnissen können auch weitere Biomarker getestet werden oder das Spektrum eingengt werden. Es entspricht dem Wesen dieser Untersuchung das kein vollständig festgelegtes Standardpanel verwendet wird, sondern die Art der Untersuchung den Effekten angepasst werden muss.

Wenn diese Biomarker sich weiterhin gut etablieren erscheint es zukünftig sinnvoll sie in einer Best Practice Guidance als Basistestung zur Immuntoxizität aufzunehmen, um immuntoxische Effekte genauer zu identifizieren. Werden Effekte mit diesen Immunmarkern ersichtlich, können danach in einer weiteren Teststufe spezifische Untersuchungen wie Funktionstest zu betroffenen Immunzellen durchgeführt werden („*tired approach*“).

Das anfängliche Ziel, die beschwerliche manuelle Knochenmarksdifferenzierung durch eine einfachere und schnellere Methode zu ersetzen ist bis dato nicht möglich. Diese Aussage wird durch die Untersuchung von Tan et al. (2014) unterstützt, der Knochenmarksproben von Hunden automatisiert mit dem Advia 2120 analysierte und mit der manuellen Differenzierung verglich. Sie schlussfolgerten, dass automatische Analysen die mikroskopische Betrachtung nicht ersetzen sollten, sie könnten jedoch eine nützliche Ergänzung sein. Die Untersuchungen mit dem Advia 2120i müssten weiter validiert werden, um die Ergebnisse richtig interpretieren zu können.

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass nur geringe Mengen an Knochenmark erforderlich sind und die Ergebnisse binnen Sekunden pro Probe verfügbar wären. Nachteilig ist, dass nicht alle Zelltypen erfasst werden können.

In den Untersuchungsmethoden zum Nachweis von hämatotoxischen Effekten im Knochenmark der Ratte ist die FACS-Analyse eine gute und etablierte Methode für die Messung von spezifische Zellpopulationen („phänotypisieren“), die sich leicht in toxikologischen Standarduntersuchungen einbauen lässt. Die Charakterisierung von großen Zellzahlen kann innerhalb eines Tages erfolgen.

Eine ebenfalls vielversprechende Methode zur Knochenmarksuntersuchung als Alternative zum Tierversuch ist der *in vitro* CFU-Assay. Seine Vorteile liegen in dem Vergleich von Substanz-Effekten von verschiedenen Spezies, der Abbildung dosisabhängiger Effekte und Hinweise zu unterschiedlichen Wirkmechanismen bei Umweltchemikalien und Medikamenten auf das Knochenmark. Hier erscheint insbesondere der Vergleich zwischen den *in vitro* CFU-Assays von humanen und aus der Ratte stammenden Knochenmarkszellen interessant, der als erster Screening-Test zur Untersuchung einer Hämatotoxizität angewandt werden kann. Eine Kombination mit der Histologie könnte die Sensitivität der Methode erhöhen.

Der nächste Schritt wäre die Untersuchung der Hämatotoxizität im *in vivo* Rattenversuch (beispielsweise durch FACS-Messung und Advia), sodass über Expositionsrechnungen auf die Wirkung im Menschen geschlossen werden kann. Diese Methoden bedürfen einer weiteren Etablierung mit weiteren hämatotoxischen Substanzen, da hier nur AZA als primär hämatotoxisch getestet wurde.

Die Durchführung der oralen 28-Tage Toxizitätsstudie in Ratten in dieser Arbeit wurde gemäß der OECD 407 durchgeführt und enthielt neben immuntoxischen Untersuchungsmethoden zusätzliche Untersuchungen zur Analyse von Knochenmarkszellen. Die Generierung von vielen Untersuchungsproben, insbesondere vom Knochenmark, war ein Sonderfall und führte zu erheblichem Laboraufwand. Für eine weitere Tierstudie wäre es empfehlenswert, auf einige erfolgreiche Methoden zu fokussieren. Hierdurch werden Sektionstage und damit die methodische Variabilität zwischen den Sektionsintervallen verringert. Diese methodische Variabilität hatte sich im Vergleich unterschiedlicher Sektionstage erwiesen und kann das Ergebnis der Studie beeinflussen. Hier müsste weiter geklärt werden, welche Faktoren insbesondere für diese Beobachtung verantwortlich sind.

Die Laser-Scanning Methode ermöglichte die Darstellung von zellulären Details, die für zukünftige mechanistische Untersuchungen von Interesse sein können. An Gefrierschnitten, die gegenüber Paraffinschnitten aufgrund der fehlenden prozessierungsbedingten Schrumpfung exakter die subzelluläre Position eines Markers darstellen, lassen sich parallel mehrere Nachweise durchführen und ihre Lokalisation in den Zellen simultan bewerten. Hier wäre eine quantitative, morphometrische Bildanalyse z.B. zur Zählung von positiven Zellen in bestimmten Kompartimenten aussichtsreicher als mit der H&E-Färbung am Lichtmikroskop. Besonders spannend könnte diese Mikroskopier-Technik für das sogenannte *live cell imaging* oder *real time imaging* sein, die das dynamische Wandern von Immunzellen im lebenden Tier oder in Zellkulturen nachverfolgen kann (wie in Germain et al., 2006).

Insgesamt ist für die Identifizierung von immuntoxischen oder immunmodulierenden Effekten von Chemikalien oder Medikamenten in präklinischen Studien die Durchführung mehrerer Tests nötig, wie vielfach in der Literatur beschrieben. Die Abdeckung mehrerer Endpunkte in Untersuchungen von verschiedenen beteiligten Zellen und Organsystemen des Immunsystems und eine *weight-of-evidence* Bewertung von Toxikologen sind entscheidend. Die Aufstellung von Schwellenwerten (wie dem NOAEL) ist für immuntoxische Effekte nicht einfach, kann allerdings durch die Verwendung der obigen Biomarker erleichtert werden. Bei der Bewertung eines immuntoxischen Potentials ist es nicht einfach, Schwellenwerte zu definieren, da viele Reaktionen keiner typischen Dosis-Wirkungs-Kurve folgen und die Bewertung der Adversität eines Immuneffekts am klinisch gesunden Tier oft schwierig ist. Zudem ist die Bewertung immuntoxischer Wirkungen in Zusammenhang mit der Gesamtoxizität einer Substanz komplex und ihre Bewertung muss die Gesamtheit der Studienparameter einbeziehen und bedarf hoher Fachkenntnis. Aufgrund unterschiedlicher Expertise und dem Wunsch mit relativ überschaubarem Aufwand zu Ergebnissen zu kommen, sind Screening-Methoden und Übersichtsdarstellungen der Resultate (wie mithilfe PCA-Analyse, *Heatmap*-Darstellung) für die zukünftige Immuntoxikologie erforderlich.

5 Zusammenfassung

In der präklinischen Entwicklung von Medikamenten und bei der toxikologischen Testung von Chemikalien ist eine frühzeitige Abschätzung der Immuntoxizität, das heißt die Untersuchung von unerwünschten Nebenwirkungen auf die Immunfunktion von Versuchstieren, ein wichtiger Bestandteil der Risikoabschätzung für den Menschen. Immuntoxikologische Untersuchungsmethoden beinhalten unter anderem die Histopathologie von lymphatischen Organen und Knochenmark, Subpopulationsanalysen, Hämatologie und Zytologie. Aus allen Untersuchungen müssen die empfindlichsten Methoden bestimmt werden, die einen Schwellenwert ableiten lassen, bei dem in der höchsten Dosis kein (adverser) toxischer Effekt auftritt [NO(A)EL].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Immunbiomarker im Rahmen von oralen 28-Tage Toxizitätsstudien gemäß der OECD Test-Richtlinie Nr. 407 an Ratten mit Hilfe neuer Methoden zu etablieren, um die Bewertung von Substanzen bzgl. der Immuntoxizität zu optimieren.

Im ersten Schritt wurden immunhistochemische Biomarker (Färbung der wichtigsten Immunzellen und interagierenden Zellen) in lymphatischen Organen an archivierten Material von 14 - 28-Tage Toxizitätsstudien in der Ratte etabliert. Die verabreichten Testsubstanzen in diesen Studien waren bekannte immunmodulatorische Substanzen: Die Immunsuppressiva Azathioprin und Cyclosporin A, Entwicklungssubstanzen aus der Antibiotikagruppe der Oxazolidinone und zwei Umweltchemikalien, Benzo[a]pyren und Hexachlorbenzol.

Im zweiten Schritt wurden die gewonnenen Erfahrungen in einer neu geplanten oralen 28-Tage Toxizitätsstudie an Ratten mit Cyclosporin A und Azathioprin angewandt. Neben den Routineprüfungen zur Immuntoxizität und den immunhistochemischen Biomarker, wurden in dieser Tierstudie neue *state-of-the-art* Methoden zur Untersuchung von Knochenmarkstoxizität (automatisch, manuell zytologisch und *in vitro*) verglichen. Der Nachweis hämatotoxischer Effekte mittels Biomarkern ist von großem Interesse, da die mikroskopische Auswertung von Knochenmark zeitintensiv ist und ein enormes Expertenwissen erfordert.

Die immunhistochemischen Biomarker in Kombination mit der Terminologie der *Enhanced Histopathology* (= semiquantitative deskriptive Befundung separater Kompartimente in lymphatischen Organen) in Milz und Thymus konnten in den meisten Studien (sowohl archiviertes als auch frisches Gewebe) zelluläre Veränderungen empfindlicher bestimmen als die routinemäßig angewandte H&E-Färbung.

Die immunhistochemische Untersuchung eignet sich gut in der ersten Teststufe zur Immuntoxizität in Routinestudien zusammen mit der H&E-Färbung sowie weiteren studienspezifischen Parametern wie Organgewichten und hämatologischen Parametern. Sie kann die Ableitung von Schwellenwerten unterstützen und mechanistische Informationen liefern. Für mechanistische Untersuchungen erwies sich zusätzlich die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie für zelluläre Details besonders vielversprechend.

Des Weiteren konnten neue Darstellungsarten die großen Datenmengen aus den toxikologischen Standarduntersuchungen und den immunhistochemischen Ergebnissen übersichtlich zusammenfassen und vereinfachen die Interpretation von Effekten. Die *Heatmap*-Darstellung visualisiert in farblicher Weise zusammenhängende Effekte und Einzeleffekte. Die Hauptkomponentenanalyse stellt dagegen in einem dreidimensionalen Koordinatensystem Ausreißer dar und kann Unterschiede im Wirkmechanismus verschiedener Substanzen aufzeigen.

Hinsichtlich der verschiedenen Knochenmarksuntersuchungen ist festzustellen, dass das anfängliche Ziel, die beschwerliche manuelle Knochenmarksdifferenzierung durch eine einfachere und schnellere Methode zu ersetzen nicht erreicht werden konnte. Als Ergänzung ist eine automatische Knochenmarkszelldifferenzierung wünschenswert, die aber mit dem Hämatologie-System Advia 2120i weiter validiert werden müsste, da nicht alle Zelltypen sicher klassifiziert wurden. Die FACS-Analyse ist eine gute und etablierte Methode für die Messung von spezifische Zellpopulationen und könnte zukünftig als *ex vivo* Screening-Methode und Ersatz von manueller Knochenmarksdifferenzierung fungieren. Eine vielversprechende Alternative zum Tierversuch ist der *in vitro* CFU (colony-forming unit)-Assay, der einen Vergleich zwischen humanen und aus der Ratte stammenden Knochenmarkszellen ermöglicht und dosisabhängige Effekte aufzeigt. Dieser Test könnte als erstes Screening ohne die Verwendung von Tieren zur Untersuchung einer Hämatotoxizität angewandt werden.

Insgesamt ist für die Identifizierung von immuntoxischen oder immunmodulierenden Effekten von Chemikalien oder Medikamenten in präklinischen Studien die Durchführung mehrerer Tests erforderlich, die anschließend mit einer *weight-of-evidence* Betrachtung interpretiert werden. Hierbei können zuverlässige Immunbiomarker zu einer schnellen und sensitiven Bewertung beitragen.

6 Summary

An Early assessment of immunotoxicity (the investigation of adverse health effects as a result of the interaction of xenobiotics with the immune system) is an important part in the preclinical development of drugs and in the toxicological testing of chemicals. Immunotoxicity testing includes, among others, histopathology of lymphoid organs, subpopulation analysis, hematology and cytology. From all investigations the most sensitive methods have to be found, which indicate a threshold value at which no-observed-(adverse)-effect level NO (A) EL is found at the highest dose tested.

The aim of this thesis was to establish immunobiomarkers in oral 28-day toxicity studies according to OECD Test Guideline No. 407 in rats in order to optimize the assessment of immunotoxic substances according to international guidelines by the application of newly established methods.

In the first step, immunohistochemical biomarkers were established in lymphoid organs in archived material of 14 - 28-day toxicity studies in the rat. The test samples were well-known immunomodulators: the immunosuppressants azathioprine and cyclosporine A, development candidates from the antibiotic group of the oxazolidinones, and the two environmental chemicals benzo [a] pyrene and hexachlorobenzene.

In a second step, the applied methods was extended to a newly planned oral 28-day toxicity study with cyclosporine A and azathioprine. In addition to the routine testing for immunotoxicity and use of immunohistochemical biomarkers, new state-of-the-art methods for evaluating bone marrow toxicity were included. Today, the detection of hematotoxic effects via biomarkers is of great interest since the microscopic evaluation of bone marrow is time-consuming and requires enormous expert knowledge. To enable comparison different bone marrow techniques (automatic, manual visual and *in vitro*) were carried out in addition.

The immunohistochemical biomarkers in spleen and thymus, in combination with the terminology of *Enhanced Histopathology* (= semiquantitative descriptive terminology to characterize separate compartments of lymphoid organs), were found to be more sensitive in most of the studies in detecting cellular changes when compared with routine H&E staining. This examination is well-suited for the first step of immunotoxicity testing in routine, supports the derivation of thresholds for risk assessment and provides mechanistic information. In addition, for mechanistic investigations confocal laser scanning microscopy turned out to be particularly promising for cellular details.

Furthermore, new ways in which standard toxicological studies and the immunohistochemical results can be presented were useful to manage large amounts of data and thus to simplify the interpretation of effects. The heatmap representation clearly visualizes synergistic and individual effects. The principal component analysis (displayed as a three-dimensional coordinate system) helps to identify outliers and could show differences in the mechanism of action of various substances.

With regard to the different bone marrow examinations, it should be noted that the initial goal of replacing the cumbersome manual bone marrow differentiation by a simpler and faster method is not possible so far. An automatic bone marrow cell differentiation is also desirable, but the hematology system Advia 2120i has to be more extensively validated due to its weaknesses in identification of some cell populations. The FACS analysis is a reliable and established method for the measurement of specific cell populations and could function in future as an *ex vivo* screening method and replacement of manual bone marrow differentiation. A promising alternative to the animal experiment is the *in vitro* CFU (colony-forming unit) assay, which allows a comparison between human and rat bone marrow cells and shows dose-dependent effects. This test could be used as a first screening step avoiding the use of animals for the investigation of hematotoxicity.

Overall, the identification of immunotoxic or immunomodulatory effects of chemicals or drugs in preclinical studies requires the implementation of several tests and the subsequent interpretation with a weight-of-evidence approach. For this purpose, reliable immunobiomarkers can contribute to a rapid and sensitive immunotoxicity assessment.

7 Literaturverzeichnis

Auman J. T., Boorman G. A., Wilson R. E., Travlos G. S. Paules R. S., Heat Map Visualization of High-Density Clinical Chemistry Data. *Physiol Genomics*, 31(2): 352–356, 2007.

Arakawa Y., Immunotoxicity Risk Assessment for Chemicals and Regulatory Science. *Ind Health*, 52(2): 87–89, 2014.

Ayanoglou C.M., Lesty C., Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in the rat: a histological, ultrastructural and histomorphometric evaluation. *J Periodontal Res*, 34(1):7-15, 1999.

Badylak S.F. & Van Vleet J.F., Alterations of prothrombin time and activated partial thromboplastin time in dogs with hepatic disease. *Am J Vet Res*, 42(12):2053-6, 1981.

Bajénoff M., Breart B., Huang A.Y., Qi H., Cazareth J., Braud V.M., Germain R.N., Glaichenhaus N., Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med*, 203(3):619-31, 2006.

Bala S, Weaver J., Hastings K.L., Clinical relevance of preclinical testing for allergic side effects. *Toxicology*, 209 (2): 195-200, 2005.

Basketter D.A., Bremmer J.N., Kammuller M.E., Kawabata T., Kimber I., Loveless S.E., Magda S., Pal T.H.M., Stringer D.A., Vohr H.W., The identification of chemicals with sensitizing or immunosuppressive properties in routine toxicology. *Food Chem Toxicol*, 32(3):289-96, 1994.

Battifora H., Kopinski M., The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 34: 1095-1100, 1986.

Bauer N., Nakagawa J., Dunker C., Failing K., Moritz A., Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV™ compared to the ADVIA® 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *J Vet Diagn Invest*, 24(1):74-89, 2012.

Beschorner W.E., Namnoum J. D., Hess A. D., Shinn C. A., and Santos G. W., Cyclosporin A and the thymus. *Immunopathology. Am J Pathol*, 126(3): 487–496, 1987.

Bhattacharya S., The facts about penicillin allergy: A review. *J Adv Pharm Technol Res*, 1(1): 11-17, 2010.

Birraux J., Kirby J.A., Thomason J.M., Taylor J.J., The effect of cyclosporin on cell division and apoptosis in human oral keratinocytes. *J Periodontal Res*, 41(4):297-302, 2006.

Blanton R.H., Lyte M., Myers M.J., Bick P.H., Immunomodulation by polyaromatic hydrocarbons in mice and murine cells. *Cancer Res*, 46(6):2735-9, 1986.

Boenisch T., Diluent buffer ions and pH: their influence on the performance of monoclonal antibodies in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 7(4): 300-306, 1999.

- Bolliger A.P., Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. *Vet Clin Pathol*, 33(2):58-67, 2004.
- Booker C.D. & White K.L. Jr., Benzo(a)pyrene-induced anemia and splenomegaly in NZB/WF1 mice. *Food Chem Toxicol*, 43(9):1423-31, 2005.
- Boverhof D.R., Ladics G., Luebke B., Botham J., Corsini E., Evans E., Germolec D., Holsapple M., Loveless S.E., Lu H., van der Laan J.W., White K.L., Yang Y., Approaches and considerations for the assessment of immunotoxicity for environmental chemicals: a workshop summary. *Regul Toxicol Pharmacol*. 68(1), 96-107, 2014.
- Brown A.P., Drew P., Knight B., Marc P., Troth S., Wuersch K., Zandee J., Graphical display of histopathology data from toxicology studies for drug discovery and development: An industry perspective. *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:167-172, 2016.
- Buchwalow I.B. & Böcker W., *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Springer Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-642-04608-7, 2010.
- Campana D., Thompson J.S., Amlot P., Brown S., Janossy G., The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol*. 138(2):648-55, 1987.
- Carney D.M., Zukoski C.F., Ogden D.A., Massive azathioprine overdose. Case report and review of the literature. *Am J Med*, 56(1):133-6, 1974.
- Caspritz G. & Hadden J., The immunopharmacology of immunotoxicology, and immunorestitution. *Toxicol Pathol*, 15(3): 320-332, 1987.
- Cesta M.F., Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicol Pathol*, 34: 455-465, 2006.
- Colić M., Jovanović S., Mitrović S., Dujčić A., Immunohistochemical identification of six cytokeratin-defined subsets of the rat thymic epithelial cells. *Thymus*, 13(3-4):175-85, 1989.
- Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N., Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*, 47: 200-202, 1941.
- Criswell K.A., Bleavins M.R., Zielinski D., Zandee J.C., Walsh K.M., Flow cytometric evaluation of bone marrow differentials in rats with pharmacologically induced hematologic abnormalities. *Cytometry*, 32(1): 18-27, 1998.
- Criswell K.A., Bock J.H., Wildeboer S.E., Johnson K., Giovanelli R.P., Comparison of the Sysmex XT-2000iV and microscopic bone marrow differential counts in Wistar rats treated with cyclophosphamide, erythropoietin, or serial phlebotomy. *Vet Clin Pathol*, 43(2): 137-53, 2014.
- Cummings J., Ward T.H., Dive C., Fit-for-purpose biomarker method validation in anticancer drug development. *Drug Discov Today*, 15(19-20):816-25, 2010.
- Damoiseaux J.G., Döpp E.A., Calame W., Chao D., MacPherson G.G., Dijkstra C.D., Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology*, 83(1):140-7, 1994.
- De Jong W.H., Kroese E.D., Vos J.G., Van Loveren H., Detection of Immunotoxicity of Benzo[a]pyrene in a Subacute Toxicity Study after Oral Exposure in Rats. *Tox Scie*, 50: 214-220, 1999.

- De Jong W.H. & Van Loveren H., Screening of Xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study. *Methods*, 41.1: 3-8, 2007.
- De Waal E.J., Timmerman H.H., Dortant P.M., Kranjc M.A.M., van Loveren H., Investigation of a screening battery for immunotoxicity of pharmaceuticals within a 28-day oral toxicity study using azathioprine and cyclosporin A as model compounds. *Regul Tox and Pharm*, 21(3), 327-338, 1995.
- Diekema D.I. & Jones R.N., Oxazolidinones: a review. *Drugs*, 59(1): 7-16, 2000.
- Duramad P., Holland NT. Biomarkers of Immunotoxicity for Environmental and Public Health Research. *Int J Environ Res Public Health*, 8(5): 1388-1401, 2011.
- Dunstan R.W., Wharton K.A. Jr, Quigley C., Lowe A., The use of immunohistochemistry for biomarker assessment--can it compete with other technologies?. *Toxicol Pathol*, 39(6):988-1002, 2011.
- Elmore S.A., Enhanced histopathology of the lymph nodes. *Toxicol Pathol*, 34: 634-647, 2006a.
- Elmore S.A., Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol*, 34: 648-655, 2006b.
- Elmore S.A., Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicol Pathol*, 34: 656-665, 2006c.
- Elmore S.A., Enhanced histopathology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*, 34: 666-686, 2006d.
- Elmore S.A., Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*, 34: 687-696, 2006e.
- Elmore S.A., Histopathology of the Lymph Nodes. *Toxicol Pathol*, 34(5): 425-454, 2006f.
- Elmore S.A., Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 35(4): 495-516, 2007.
- Elmore S.A., Enhanced histopathology evaluation of lymphoid organs. *Methods Mol Biol*, 598: 323-39, 2010.
- Elmore S.A., Enhanced Histopathology of the Immune System: A review and Update. *Toxicol Pathol*, 40: 148-156, 2012.
- EMA Guideline on Repeat Dose Toxicity, CPMP/SWP/1042/99 Rev 1, 2010, unter http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf (abgerufen am 19.06.2017).
- Ezendam J., Vissers I., Bleumink R., Vos J.G., Pieters R., Immunomodulatory effects of tetrahydrobenzoquinone, a reactive metabolite of hexachlorbenzene. *Chem Res Toxicol*, 16: 688-694, 2003.
- Freissmuth M., Offermanns S., Böhm S., *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, eBook ISBN 978-3-642-12354-2, 2012.
- Gafter-Gvili A., Kalechman Y., Sredni B., Gal R., Gafter U., Cyclosporin A-induced hair growth in mice is associated with inhibition of hair follicle regression. *Arch Dermatol Res*, 296(6):265-9, 2004.

- Germain R.N., Miller M.J., Dustin M.L., Nussenzweig M.C., Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. *Nat Rev Immunol*, 6(7):497-507, 2006.
- Germain R.N., Bajénoff M., Castellino F., Chieppa M., Egen J.G., Huang A.Y., Ishii M., Koo L.Y., Qi H., Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev*, 221:163-81, 2008.
- Gibbs G., Campbell G., Christie I., Pseudobasophilia and the Advia 120. *Hematology*, 14(3):159-63, 2009.
- Gown A.M., Willingham M.C., Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem*, 50(4):449-54, 2002.
- Grayson M.H., Chaplin D.D., Karl I.E., Hotchkiss R.S., Confocal fluorescent intravital microscopy of the murine spleen. *J Immunol Methods*, 256(1-2):55-63, 2001.
- Gribaldo L., Haematotoxicology: scientific basis and regulatory aspects. *Altern Lab Anim*, 30 Suppl 2:111-3, 2002.
- Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.M., Nyska A., Snyder P., Walker D., Walter G., STP position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. *Toxicol Pathol*, 33: 404-408, 2005.
- Harboe N.M.G. & Inglid A., Immunization, isolation of immunoglobulin and antibody titre determination. *Scand J Immunol Suppl*, 10: 345-351, 1983.
- Harleman J.H., Approaches to the identification and recording of findings in the lymphoreticular organs indicative for immunotoxicity in regulatory type toxicity studies. *Toxicology*, 142(3): 213-9, 2000.
- Harleman J. H., The immune system--multiple sites but one system. *Exp Toxicol Pathol*, 57(5-6), 359-361, 2006.
- Hattori A., Kunz H. W., Gill T. J., Shinozuka H., Thymic and lymphoid changes and serum immunoglobulin abnormalities in mice receiving cyclosporine. *Am J Pathol*, 128(1): 111-120, 1987.
- Hayat M.A., Fixation and embedding In: *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy*. Kluwer Academic, NY, 71-93, 2002.
- Hirabashi Y. & Inue T., Aryl hydrocarbon receptor biology and xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells. *Biochem Pharmacol*, 77: 521-535, 2009.
- Ho S., Clipstone N., Timmermann L., Northrop J., Graef I., Fiorentino D., Nourse J., Crabtree G.R., The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol*, 80: 40-45, 1996.
- Hothorn L.A., Statistical evaluation of toxicological bioassays – a review. *Toxicol. Res*, 3, 418-432, 2014.
- Hulka B.S., Overview of biological markers. *Biological markers in epidemiology* (Hulka BS, Griffith JD, Wilcosky TC, eds), 3-15. New York Oxford University Press, 1990.

- IARC, A review of human carcinogens: pharmaceuticals. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 100A, 319-331, 2012.
- ICH S8, Immunotoxicity studies for Human Pharmaceuticals. CHMP/167235/2004, EM(E)A, 2006.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) harmonization project: Risk Assessment Terminology. Part 1: IPCS/OECD key generic terms used in chemical hazard/Risk assessment part 2: IPCS Glossary of Key Exposure Assessment Terminology, World Health Organization, 2004,
- unter: <http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/terminology/en/> (abgerufen am 19.06.2017).
- Ikarashi, I., Tauchi, K., Yukawa, M., Application of principal component analysis to the results of toxicological tests. Pharmacokinetics, 48, 487-492, 1994.
- Jacobsen M., Clausen P.P., Smidth S., The effect of fixation and trypsinization on the immunohistochemical demonstration of intracellular immunoglobulin in paraffin embedded material. Acta Pathol Microbiol Scand A, 88(6): 369-76. 1980.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M., Immunologie. 5. Aufl., Spektrum Akad. Verl. Heidelberg, Berlin, ISBN 978-3-8274-1078-8, 2002.
- Jang M.J., Choi H.W., Lee S.Y., Lee O.J., Kim H.R., Shin J.H., Suh S.P., Ryang D.W., Shin M.G. Application of bone marrow samples for discrimination of acute promyelocytic leukemia from other types of acute leukemia using the routine automated hematology analyzer. Int J Lab Hematol, 36; 531 – 540, 2014.
- Junqueira L.C., Carneiro J, Hrsg. M. Gratzl, Histologie. 6. Auflage, Springer, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540219651, 2004.
- Keil D., Luebke R. W., Ensley M., Gerard P. D., Pruett S. B., Evaluation of multivariate statistical methods for analysis and modeling of immunotoxicology data. Toxicol Sci, 51 (2): 245-258, 1999.
- Kemmerling J., Fehlert E., Kuper C.F., Rühl-Fehlert C., Stropp G., Vogels J., Krul C., Vohr H.W. The transferability from rat subacute 4-week oral toxicity study to translational research exemplified by two pharmaceutical immunosuppressants and two environmental pollutants with immunomodulating properties. Eur J Pharmacol, 759:326-42, 2015.
- Kilty C.G., Keenan J., Shaw M., Histologically defined biomarkers in toxicology. Expert Opin Drug Saf, 6(2):207-15, 2007.
- Knuckles M.E., Inyang F., Ramesh A., Acute and subchronic oral toxicities of benzo[a]pyrene in F-344 rats. Toxicol Sci, 61(2): 382-8, 2001.
- Koller L.D., Immunotoxicology today. Toxicol Pathol, 15(3): 346-51, 1987.
- Kroese E.D., Muller J.J.A., Mohn G.R., Dortant P.M., Wester P.W., Tumorigenic effects in Wistar rats orally administered benzo[a]pyrene for two years (gavage studies). Implications for human cancer risks associated with oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. The Netherlands: National institute of public health and the environment (RIVM), 2017, unter: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/658603010.pdf> (abgerufen am 19.06.2017).
- Kuiper-Goodman T., Grant D.L., Moodie C.A., Korsrud G.O., Munro I.C., Subacute toxicity of hexachlorobenzene in the rat. Toxicol Appl Pharmacol, 40(3):529-49, 1977.

- Kuper C.F., Harleman J.H., Richter-Reichhelm H.B., Vos J.G., Histopathologic approaches to detect changes indicative of immunotoxicity. *Toxicol Pathol*, 28: 454-466, 2000.
- Kuper C.F., Rühl-Fehlert C., Elmore S.A., Parker G.A., Immune System in Haschek W.M., Rousseaux C.G., Wallig M.A. (Eds), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. Elsevier, Academic Press, pp 1795-1862, ISBN: 9780124157590, 2013.
- Kuper C.F., Vogels J., Kemmerling J., Fehlert E., Rühl-Fehlert C., Vohr H.W., Krul C., Integrated analysis of toxicity data of two pharmaceutical immunosuppressants and two environmental pollutants with immunomodulating properties to improve the understanding of side effects-A toxicopathologist's view. *Eur J Pharmacol*, 759:343-55. 2015.
- Kurata M., Sasayama Y., Yamasaki N., Kitazawa I., Hamada Y., Horii I., Mechanism for shortening PT and APTT in dogs and rats--effect of fibrinogen on PT and APTT. *J Toxicol Sci*, 28(5):439-43, 2003.
- Kuter D.J. & Tillotson G.S., Hematologic Effects of Antimicrobials: Focus on the Oxazolidinone Linezolid. *Pharmacotherapy*, 21(8): 1010-1013, 2002.
- Ladics G.S., Kawabata T.T., Munson A.E., White K.L. Jr., Evaluation of murine splenic cell type metabolism of benzo[a]pyrene and functionality in vitro following repeated in vivo exposure to benzo[a]pyrene. *Toxicol Appl Pharmacol*, 116(2): 258-66, 1992.
- Lobenhofer E.K., Boorman G.A., Phillips K.L., Heinloth A.N., Malarkey D.E., Blackshear P.E., Houle C., Hurban P., Application of visualization tools to the analysis of histopathological data enhances biological insight and interpretation. *Toxicol Pathol*, 34(7):921-8, 2006.
- Lodish H., Flygare J., Chou S., From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life*, 62(7): 492-6, 2010.
- Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D., *Der Experimentator Immunologie.3.Aufl.*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2009.
- Maltzman J.S. & Koretzky G.A., Azathioprine: old drug, new actions. *J.Clin Invest*, 111: 1122-1124, 2003.
- Mason D.Y., Cordell J., Brown M., Pallesen G., Ralfkiaer E., Rothbard J., Crumpton M., Gatter K.C., Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *J Clin Pathol*, 42: 1194-1200, 1989.
- Mason D.Y., Cordell J.L., Brown M.H., Borst J., Jones M., Pulford K., Jaffe E., Ralfkiaer E., Dallenbach F., Stein H., et al., CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood*, 15; 86(4): 1453-9, 1995.
- Mayeux R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *NeuroRx*, 1(2):182-8, 2004.
- Michielsen C.C., van Loveren H., Vos J.G., The role of the immune system in hexachlorobenzene-induced toxicity. *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 5: 783-92, 1999.
- Miettinen M., Immunostaining of intermediate filament proteins in paraffin sections. Evaluation of optimal protease treatment to improve the immunoreactivity. *Pathology, research and practice* 184: 431-436, 1989.
- Naeim F., Rao P.N., Song S.X., Grody W.W., *Atlas of Hematopathology*, Elsevier, Academic Press, 2013.

- Naylor S., Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn* 3: 525-529, 2003.
- Nebert D.W., Shi Z., Gálvez-Peralta M., Uno S., Dragin N., Oral benzo[a]pyrene: understanding pharmacokinetics, detoxication, and consequences--Cyp1 knockout mouse lines as a paradigm. *Mol Pharmacol*, 84(3):304-13, 2013.
- OECD Veröffentlichungen zur Umweltsicherheit und –hygiene, OECD-Grundsätze der Guten Laborpraxis, 1999.
- OECD Test Nr. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, 16.10.2008.
- OECD Test Nr. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, 28.07.2011.
- OpenStax College, Rice University, Anatomy and physiology. Houston, Texas, 2013.
- Ordonez N.G., Manning J.T. jr., Brooks T.E., Effect of trypsinization on the immunostaining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol*, 12(2): 121-129, 1988.
- Palazzi X., Burkhardt J.E., Caplain H., Dellarco V., Fant P., Foster J.R., Francke S., Germann P., Gröters S., Harada T., Harleman J., Inui K., Kaufmann W., Lenz B., Nagai H., Pohlmeyer-Esch G., Schulte A., Skydsgaard M., Tomlinson L., Wood C.E., Yoshida M., Characterizing "Adversity" of Pathology Findings in Nonclinical Toxicity Studies: Results from the 4th ESTP International Expert Workshop, *Toxicol Pathol*, 44(6):810-24, 2016.
- Pearse G., Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. *Toxicol Pathol* 34: 504, 2006.
- Perera j. & Huang H., The development and function of thymic B cells. *Cell Mol Life Sci*, 72(14): 2657–2663, 2015.
- Pessina A., Albella B., Bueren J., Brantom P., Casati S., Gribaldo L., Croera C., Gagliardi G., Foti P., Parchment R., Parent-Massin D., Sibiril Y., Van Den Heuvel R., Prevalidation of a model for predicting acute neutropenia by colony forming unit granulocyte/macrophage (CFU-GM) assay. *Toxicol In Vitro*, 15(6):729-40, 2001.
- Pinkus G.S., O'Connor E.M., Etheridge C.L., Corson J.M. Optimal immunoreactivity of keratin proteins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue requires preliminary trypsinization. An immunoperoxidase study of various tumours using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem*, 33(5): 465-473, 1985.
- Pruett S.B., Ensley D.K., Crittenden P.L., The role of chemical-induced stress responses in immunosuppression: a review of quantitative associations and cause-effect relationships between chemical-induced stress responses and immunosuppression. *J Toxicol Environ Health*, 39(2):163-92, 1993.
- Pruett S.B., Quantitative aspects of stress-induced immunomodulation. *Int Immunopharmacol*, 1(3):507-20, 2001.
- Ramos-Vara J.A., Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Path*, 42: 405-426, 2005.

- Reagan W.J., Irizarry-Rovira A., Poitout-Belissent F., Bolliger A.P., Ramaiah S.K., Travlos G., Walker D., Bounous D., Walter G, Bone Marrow Working Group of ASVCP/STP, Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Vet Clin Pathol*, 40(2): 119-34, 2011.
- Reichel F.X., Schwenk M., *Regulatory Toxicology*. Aufl. 1, Springer Verlag Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-642-35373-4, 2014.
- Rich I.N., In vitro hematotoxicity testing in drug development: a review of past, present and future applications. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 6(1): 100-9, 2003.
- Richter-Reichhelm H.B., Dasenbrock C.A., Descotes G., Emmendorfer A.C., Harleman J.H., Hildebrand B., Küttler K., Rühl-Fehlert C.I., Schilling K., Schulte A.E., Vohr H.W., Validation of a modified 28-day rat study to evidence effects of test compounds on the immune system. *Regul Toxicol Pharmacol*, 22: 54-56, 1995.
- Richter-Reichhelm H.B. & Schulte A.E., Results of a cyclosporin a ringstudy. *Toxicology*, 129(1): 91-4, 1998.
- Rink L., Kruse A., Haase H., *Immunologie für Einsteiger*. Spektrum Akad. Verl. Heidelberg, ISBN-13: 978-3827424396, 2012.
- Rock K., Kono H., The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*, 3: 99-126, 2008.
- Rühl-Fehlert C., Bradley A., George C., Germann P.G., Bolliger A.P., Schulte A., Harmonization of immunotoxicity guidelines in the ICH process- pathology considerations from the guideline Committee of the European Society of Toxicological Pathology (ESTP). *Exp Toxicol Pathol*, 57: 1-5, 2005.
- Saad A., Palm M., Widel S., Reiland S., Differential Analysis of Rat Bone Marrow by Flow Cytometry. *Comp Haematol Int*, 10(2): 97–101, 2000.
- Sahasranaman S., Howard D., Roy S., Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol*, 64(8):753-67, 2008.
- Schmeits P.C., Schaap M.M., Luijten M., van Someren E., Boorsma A., van Loveren H., Peijnenburg A.A., Hendriksen P.J., Detection of the mechanism of immunotoxicity of cyclosporine A in murine in vitro and in vivo models. *Arch Toxicol*, Epub, 2014.
- Schütt C., Bröker B., *Grundwissen Immunologie*. 3.Aufl., Springer Spektrum, Heidelberg, ISBN 978-3-8274-2646-8, 2011.
- Schulte A., Althoff J., Ewe S., Richter-Reichhelm H.B., BGVV Group Investigators, Two immunotoxicity ring studies according to OECD TG 407-comparison of data on cyclosporin A and hexachlorobenzene. *Regul Toxicol Pharmacol*, 36(1):12-21, 2002.
- Schuurman H.J., van Laarhoven J.P., Broekhuizen, R., Brekelmans P., Spierenburg G.T., Figdor C.G., De Bruyn C.H., Purine metabolism in human thymocyte subsets: relevance for lymphocytic differentiation. *Adv Exp Med Biol*, 165 (Pt B): 99-106, 1984.
- Schuurman H-J., Kuper C. F., Vos J. G., Histopathology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity. *Toxicology*, 86(3), 187-212, 1994.

Shi S.R., Liu C., Taylor C.R., Standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen-retrieval technique: from experiments to hypothesis. *J Histochem Cytochem*, 55(2):105-9, 2007.

Smith H.W., Winstead C.J., Stank K.K., Halstead B.W., Wierda D., A predictive F344 rat immunotoxicology model: cellular parameters combined with humoral response to NP-CgammaG and KLH. *Toxicology*, 194(1-2):129-45, 2003.

Socolovsky M., Lodish H.F., Daley G.Q., Control of hematopoietic differentiation: Lack of specificity in signaling by cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(12): 6573–6575, 1998.

Stockholm Convention Website, unter: <http://chm.pops.int/> (abgerufen am 19.06.2017).

Strauss V., Wiemer J., Leibold E., Kamp H., Walk T., Mellert W., Looser R., Prokoudine A., Fabian E., Krennrich G., Herold M., van Ravenzwaay B., Influence of strain and sex on the metabolic profile of rats in repeated dose toxicological studies. *Toxicol Lett*, 191(1):88-95, 2009.

Tan E., Abrams-Ogg A.C., Defarges A., Bienzle D., Automated hematologic analysis of bone marrow aspirate samples from healthy Beagle dogs. *Vet Clin Pathol*, 43(3):342-51, 2014.

The ICISIS Group Investigators, Report of validation study of direct immunotoxicity in the rat. *Toxicology*, 125: 183-201, 1998.

Thermo Fisher Scientific Produktinformation zu Shandon Cytospin 4 Zytozentrifuge, unter http://www.thermo.com.cn/Resources/200802/productPDF_24989.pdf (abgerufen am 05.09.2017).

Uno S., Dalton T.P., Dragin N., Curran C.P., Derkenne S., Miller M.L., Shertzer H.G., Gonzales F.J., Nebert D.W., Oral benzo(a)pyrene in CYP 1 knockout mouse lines: CYP1A1 Important in detoxication, CYP1B1 metabolim required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol Pharmacol*, 69, 1103-1114, 2005.

US Agency for Toxic Substances & Diseases Registry (ATSDR), Toxicological Profile for Hexachlorobenzene, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2013, unter: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=627&tid=115> (abgerufen am 19.06.2017).

US EPA Health Effects Test Guidelines, Immunotoxicity, OPPTS 870.7800, 2013.

US Environmental Protection Agency (EPA), IRIS Toxicological Review of Benzo[a]pyrene, Washington DC, *Sci Total Environ*, 270(1-3): 123-33, 2017.

US National Library of Medicine, Dailymed, Drug label information, Imuran –azathioprine tablet, Prometheus Laboratories Inc., updated January 1, 2014, unter: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=aaa6c540-4c84-48a0-939c-cd423134fa2a> (abgerufen am 05.09.2017).

Van Birgelen A.P., Hexachlorobenzene as a possible major contributor to the dioxin activity of human milk. *Environ Health Perspect*, 106: 683-688, 1998.

Vohr H.W., Rühl-Fehlert C., Industry experience in the identification of the immunotoxic potential of agrochemicals. *Sci Total Environ*, 270(1-3):123-33, 2001.

Vohr H.W., *Toxikologie*, Band 1, Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA Weinheim, 2010.

- Vos J.G., van Logten M.J., Kreeftenberg J.G., Kruizinga W., Hexachlorobenzene-induced stimulation of the humoral immune response in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 320: 535-50, 1979a.
- Vos J.G., van Logten M.J., Kreeftenberg J.G., Steerenberg P.A., Kruizinga W., Effect of hexachlorobenzene on the immune system of rats following combined pre- and postnatal exposure. *Drug Chem Toxicol*, 2(1-2):61-76, 1979b.
- Ward J.M., Erexson C.R., Faucette L.J., Foley J.F., Dijkstra C., Cattoretti G., Immunohistochemical markers for the rodent immune system. *Toxicol Pathol*, 34(5): 616-30, 2006.
- Webster J.D., Miller M.A., Dusold D., Ramos-Vara J., Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *J Histochem Cytochem*, 57(8): 753-61, 2009.
- Wester K., Wahlund E., Sundström C., Ranefall P., Bengtsson E., Russell P.J., Ow K.T., Malmström P.U., Busch C., Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 8(1):61-70, 2000.
- Wester P.W., Muller J.J., Slob W., Mohn G.R., Dortant P.M., Kroese E.D., Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2-year oral study in Wistar rats. *Food Chem Toxicol*, 50(3-4):927-35, 2012.
- Whiteland J.L., Nicholls S.M., Shimeld C., Easty D.L., Williams N.A., Hill T.J., Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leukocytes in paraffin-embedded rat and mouse tissues with monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem*, 43(3): 313-20, 1995.
- Wilcox M.H., Update on linezolid: the first oxazolidinone antibiotic. *Expert Opin Pharmacother*, 6(13): 2315-2326, 2005.
- Willard-Mack C.L., Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol*, 34(5): 409-24, 2006.
- Xie R., Chung J.Y., Ylaya K., Williams R.L., Guerrero N., Nakatsuka N., Badie C., Hewitt S.M., Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 59(4):356-65, 2011.
- Yang, Y.-W. & Luo, W.-H. Recruitment of bone marrow CD11b+ Gr-1+ cells by polymeric nanoparticles for antigen cross-presentation. *Sci Rep* 7, 44691, 2017.
- Zaccharia K.J., McClure P.R., Using immunotoxicity information to improve cancer risk assessment for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Int J Toxicol*, 32: 236-250, 2013.
- Zhang P, Chitkushev L, Brusic V, Zhang GL, Biomarkers in Immunology: from Concepts to Applications. ACM-BCB, 2013.

Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Differenzierung der Immunzellen (vereinfachte Darstellung).

Aus den Stammzellen im Knochenmark differenzieren die Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems sowie die roten Blutzellen. (Verändert nach OpenStax, 2013).

Abb.2 Zellulärer Aufbau des Thymus (verändert nach Junqueira & Carneiro, 2004).

Abb.3 Aufbau der Milz.

Schematische Darstellung der Milz oben mit roter Pulpa (rosa) und Vergrößerung eines Querschnitts der weißen Pulpa (verändert nach Janeway, 2002).

Abb.4 Ablauf der histologischen Arbeitsschritte

Abb.5 Ablauf des CFU (*colony-forming unit*)-Assay
(Abbildung verändert aus www.stemcell.com)

Abb.6 Hämatopoese im Knochenmark und die gezählten CFU-Kolonien für den humanen CFU-Assay.

Bas (*basophil*); BFU (burst-forming unit) CFU (*colony-forming unit*); E (*erythroid*); Eo (*eosinophil*); GEMM (*granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte*); GM (*granulocyte-macrophage*); Meg (*megakaryocyte*). (Abbildung verändert nach Socolovsky et al., 1998).

Abb.6 Hämatopoese im Knochenmark und die gezählten CFU-Kolonien für den humanen CFU-Assay.

Bas (*basophil*); BFU (burst-forming unit) CFU (*colony-forming unit*); E (*erythroid*); Eo (*eosinophil*); GEMM (*granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte*); GM (*granulocyte-macrophage*); Meg (*megakaryocyte*). (Abbildung verändert nach Socolovsky et al., 1998).

Abb.7 Darstellung der Zytozentrifuge *Cytospin*.

Äußere und innere Gerätedarstellung und als Resultat *Cytoslides* mit konzentrierten Knochenmarkszellen (*Cytospots*), die sich mikroskopisch untersuchen lassen.

Darstellung außen und innen übernommen von Thermo Fisher Scientific.

Abb.8 Vergleich der manuellen und automatischen Knochenmarksanalyse mit dem Advia Hämatologie-System.

Abb.9 Zelluläre Lokalisation der aktivierten Caspase-3.

(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x15), (2) Milz periarteriolen lymphatische Scheiden (PALS) (x20)

Abb.10 Zelluläre Lokalisation von CD3.

(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x7), (2) Milz mit periarteriolen lymphatische Scheiden (PALS), B-Zell-Follikeln (BF), Marginalzone (MZ) und rote Pulpa (RP) (x8)

Abb.11 Zelluläre Lokalisation von CD8.

(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x8), (2) Milz mit periarterioläre lymphatische Scheiden (PALS) und Marginalzone (MZ) (x8)

Abb.12 Zelluläre Lokalisation von CD68.

(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x5), (2) Milz mit weiße Pulpa (WP), Marginalzone (MZ) und rote Pulpa (RP) (x5)

Abb.13 Zelluläre Lokalisation von CD79a.

(1) Thymus Rinde (R) und Mark (MK) (x6), (2) Milz mit periarterioläre lymphatische Scheiden (PALS), B-Zell-Follikeln (BF), Marginalzone (MZ) und rote Pulpa (RP) (x5)

Abb.14 Zelluläre Lokalisation von Zytokeratin.

Thymus mit epithelfreien Bereichen (Pfeile) und dicke Epithelzellfortsätze im Mark (MK) (x10)

Abb.15 A-E Ausgeprägte histopathologische Effekte in Milz und Thymus erhoben an H&E-Färbungen.

A) Erythropoetische Foci in der roten Milzpulpa (RP) an OXA I Kontrolltier (Pfeil) (x20)

B) Vermehrte Megakaryozyten (Pfeil) in der roten Milzpulpa an OXA II Kontrolltier (x15)

C) Unterschiede in der Blutfülle der roten Milzpulpa. **C1** Blutgehalt bei einem Kontrolltier, **C2** vermehrte Blutfülle nach BAP in der oberen Dosisgruppe (x7)

D) Unterschiede in der Thymozytendichte der Thymusrinde. **D1** Kontrolltier **D2** obere Dosisgruppe BAP, *Tingible body*-Makrophagen (x5)

E) Unterschiede im Verhältnis von Rinde (R) und Mark (MK) des Thymus. **E1** Relation bei einem Kontrolltier (Pfeil), **E2** OXA IV mittlere Dosis, Abnahme Verhältnis Rinde/Mark (Pfeil) (x2). **E3** OXA IV obere Dosis, hochgradige Depletion von corticalen Thymozyten (x10)

Abb.16 F-M Ausgeprägte histologische Effekten in Milz und Thymus erhoben an IHC-Färbungen.

F) Epithelfreie Areale der äußeren Thymusrinde mit IHC-Nachweis Zytokeratin. **F1** Kontrolltier mit epithelfreien Regionen (Pfeil), die nach AZA obere Dosis (**F2**) vollständig verschwunden sind (x12)

G) Unterschiede in der Ausprägung von Apoptosen in Thymus im IHC-Nachweis von Caspase-3. **G1** Kontrolle mit geringen Mengen positiver Zellen, **G2** AZA obere Dosis mit erhöhter Anzahl apoptotischer Zellen in Rinde (R) und Mark (MK) (x12)

H) Unterschiede in der Menge CD79⁺ B-Lymphozyten im Thymusmark.. **H1** Kontrolltier, **H2** AZA obere Dosis (x7)

I) Unterschiedliche Häufung von Makrophagen im Thymus mit CD68. **I1** Kontrolltier, **I2** Verdichtung der Makrophagen an der Mark-Rindengrenze nach BAP obere Dosis (x4)

J) Unterschiede in der Menge von CD3⁺ T-Lymphozyten in der Milz. **J1** Kontrolltier, **J2** verstärkte Präsenz von T-Lymphozyten in den B-Zellfollikeln (BF) nach HCB obere Dosis (x12)

K) Darstellung der Mengen von zytotoxischen T-Lymphozyten mit CD8 in der Milz. **K1** Kontrolltier, **K2** Abnahme der T-Lymphozyten in der PALS nach HCB obere Dosis (x7)

L) Fokal vermehrte T-Lymphozyten im Thymusmark mit CD8 nach BAP mittlere Dosis (x7)

M) CD79⁺ Megakaryozyten in der Milz eines mit OXA III behandelten Tieres (x10)

Abb.17 N-Q Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von ausgewählten Biomarkern in Milz und Thymus.

- N)** Zytokeratin (rot, AF594) im Thymus, DAPI (blau) (40x)
- O)** Caspase-3 (grün, AF488) im Thymus, DAPI (blau), (20x)
- P)** CD79 (grün, AF488) in der Milz DAPI (blau) (40x)
- Q)** CD68 (grün, AF488) in der Milz, DAPI (blau) (40x)

Abb.18 *Tile Scan*-Ausschnitt am LSM 700 in der Milz.

CD68 (grün, AF488), DAPI (blau) (40x).

RP: rote Milzpulpa, MZ: Marginalzone,

PALS: periarteriöle lymphatische Scheiden

Abb. 19 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an einem Gefrierschnitt der Milz: CD4-Färbung der T-Helferzellen

Abb.20 Hauptkomponentenanalyse verschiedener toxikologischer Parameter gruppiert nach Dosisgruppen.

Generierung mit der Genedata Expressionist Software.

Abb.21 *Heatmap*-Darstellung ausgewählter toxikologischer Standard-Untersuchungen.

- A)** Histopathologische Befunde
- B)** Hämatologie und Klinische Chemie
- C)** Körper- und Organgewichte

Generierung mit der Genedata Expressionist Software

Abb.22 Konzentrationen der Immunglobuline im Serum.

A) IgA, **B)** IgG, **C)** IgM

n= 10 Tiere pro Dosisgruppe (Dreifachbestimmung); Signifikanzen: * $P \leq 0.05$ ** $P \leq 0.01$

Abb.23 A-F Durchflusszytometrische Analysen in der Milz an Sektionstag 1 und 2.

- A)** CD45RC low,
- B)** CD45RC high (Leukozyten),
- C)** CD4 total (T-Helferzellen),
- D)** CD3 total (T-Zellen),
- E)** CD8 total (zytotoxische T-Zellen),
- F)** NK total (Natürliche Killerzellen)

Signifikanzen: * $P \leq 0.05$ ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$

Abb.24 A-F Durchflusszytometrische Analysen im mesenterialen Lymphknoten.

- A)** CD45RC low,
- B)** CD45RC total (Leukozyten),
- C)** CD4 total (T-Helferzellen),
- D)** CD3 total (T-Zellen),
- E)** CD8 total (Zytotoxische T-Zellen),
- F)** NK total (Natürliche Killerzellen)

4/5 Tiere wurden in der Dosisgruppe für die Berechnung mit einbezogen.

Signifikanzen: ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$

Abb.25 *Dot-plot*-Darstellung und *Gating*-Strategie der Subpopulationsanalyse von Knochenmarkszellen (Femur) der Ratte.

Färbung mit CD45:FITC, CD71:PE und LDS-751. SSC = *side scatter* (Seitwärtsstreulicht),

FSC = *forward scatter* (Vorwärtsstreulicht).

Abb.26 A-C Subpopulationsanalyse von Vorläuferzellen im Knochenmark der Ratte hinsichtlich hämatotoxischer Eigenschaften nach Gabe von CSA und AZA.

A) Lymphoide Zellen, **B)** Retikulozyten, **C)** Erythrozyten.

Signifikanz: * $P \leq 0.05$; # 4 Tiere wurden in der Dosisgruppe für die Berechnung mit einbezogen.

Abb.27 Immunfluoreszenz-gelabelte Knochenmarkszellen aus der Subpopulationsanalyse.

Rot: LDS 751 (Zellkern-Färbung),

Blau: CD71:PE (erythoide Zellen),

Grün: CD45:FITC (myeloide und lymphoide Zellen).

Abb.28 A-E Ergebnisse zur automatischen hämatologischen Analyse von Knochenmarkszellen mithilfe des Advia Hämatologie-System.

A) Weiße Blutzellen, **B)** Lymphozyten, **C)** Neutrophile Granulozyten, **D)** Eosinophile Granulozyten, **E)** Monozyten.

4/5 Tiere wurden in der Dosisgruppe für die Berechnung mit einbezogen.

Abb. 29 A-B Verschiedene Reifestadien der Knochenmarkszellen eines Kontrolltieres.

A): Ausstrich, **B):** Zytopot

Abb.30 Vakuolen-Bildung in einer Knochenmarkszelle (vermutlich Monoblast) bei mikroskopischer Betrachtung eines Zytopots.

Abb.31 A-F Mikroskopische Aufnahmen zu verschiedenen Kolonien des CFU-Assays mit humanen CD34⁺-Zellen.

A, B): BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*);

C): CFU-G (*colony-forming unit -granulocyte*);

D): CFU-M (*colony-forming unit -macrophage*);

E): CFU-GM (*colony-forming unit -granulocyte-macrophage*),

F): CFU-GEMM (*colony-forming unit -granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte*)

Abb.32 A-D Ergebnisse aus dem CFU-Assay mit humanen CD34⁺-Knochenmarkszellen.

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentration von **A)** Azathioprin **B)** Cyclosporin **A C)** Benzo(a)pyren und **D)** Hexachlorbenzol behandelt (Auszählung von Triplikaten).

Abb.33 A-D Morphologische Charakteristika gefärbter Cytopots aus dem CFU-Assay mit humanen CD34⁺-Knochenmarkszellen nach Gabe von Azathioprin.

Färbung mit May-Grünwald-Giemsa. **A)** 1, **B)** 100, **C)** 1.000, **D)** 100.000 ng/ml Azathioprin.

Abb.34 Ergebnisse aus dem CFU-Assay mit Knochenmarkszellen aus der Ratte (*ex vivo*).

Die Zellen wurden mit Mediumkontrolle (IMDM), Positivkontrolle (Topotecan) und verschiedenen Konzentration von Azathioprin (AZA) und Cyclosporin (CSA) behandelt.

(n = 50 Tiere)

Tabellenverzeichnis

Tab.1 Terminologie der *Enhanced Histopathology*.
(Verändert aus Kuper et al., 2013)

Tab.2 Studienübersicht von archivierten Toxizitätsstudien für die (Immun-) Histologische Auswertung.

Tab.3 Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern für die ABC-Methode.

Tab.4 Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern für die Fluoreszenz.

Tab.5 Dosierungsgruppen der subakuten oralen Toxizitätsstudie.

Tab.6 Liste von Parametern für Hämatologie und Blutgerinnung.

Tab.7 Liste von Parametern für Klinische Chemie.

Tab.8 Informationen zur Verwendung der Antikörper in der subakuten oralen Toxizitätsstudie.

Tab.9 Verwendete Antikörper für die Subpopulationsanalyse von Milz- und Lymphknotenzellen.

Tab.10 Protokoll May-Grünwald-Färbung von Knochenmarksaustriichen.

Tab.11 Verwendete Antikörper für die Subpopulationsanalyse von Knochenmarkszellen.

Tab.12 Protokoll FACS-Färbung von Knochenmarkszellen.

Tab.13 Verwendete Antigene und ihre Zielzellen.

Tab.14 Gegenüberstellung der neuen (*Enhanced Histopathology*) und alten Terminologie angewandt an den H&E-Befunden.

Tab. 15 Azathioprin: Ergebnisse der H&E-Färbung.

Tab. 16 Azathioprin: Ergebnisse der IHC-Färbung.

Tab.17 Cyclosporin A: Ergebnisse der H&E-Färbung.

Tab.18 Cyclosporin A: Ergebnisse der IHC-Färbung.

Tab.19 Oxazolidinon I: Ergebnisse der H&E-Färbung.

Tab.20 Oxazolidinon I: Ergebnisse der IHC-Färbung.

Tab.21 Oxazolidinon II: Ergebnisse der H&E-Färbung.

Tab.22 Oxazolidinon III: Ergebnisse der H&E-Färbung.

Tab.23 Oxazolidinon III: Ergebnisse der IHC-Färbung.

Tab.24 Oxazolidinon IV: Ergebnisse der H&E-Färbung.

Tab.25 Oxazolidinon IV: Ergebnisse der IHC-Färbung.

Tab.26 Benzo(a)pyren: Ergebnisse der H&E-Färbung.

Tab.27 Benzo(a)pyren: Ergebnisse der IHC-Färbung.

Tab.28 Hexachlorbenzol: Ergebnisse der H&E-Färbung.

Tab.29 Hexachlorbenzol: Ergebnisse der IHC-Färbung.

Tab.30 Vergleich der LOELs in den H&E- und IHC-Färbungen der archivierten Studien.

Tab.31 Vergleich von (Durch-)Lichtmikroskopie und konfokale Fluoreszenzmikroskopie für die Untersuchung von Paraffinschnitten der lymphatischen Organe.

Tab.32 Übersicht der toxikologischen Standarduntersuchungen mit potenziell Substanzbedingten Effekten unter Angabe der LOELs.

Tab.33 Ergebnisse der H&E-Färbung von Cyclosporin A und Azathioprin.

Tab.34 Ergebnisse der IHC-Färbung von Cyclosporin A und Azathioprin.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt habe.

Ich versichere außerdem, dass ich die vorliegende Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Dortmund,

Jessica Kemmerling