

Schlussbericht* **zum Forschungsvorhaben (Verbundprojekt)**

„In-vitro-Tests zur Photogenotoxizitätsprüfung als Ersatz von Photokanzerogenitätsstudien an Nagern“

**Der Schlussbericht umfasst die Gesamtergebnisse des Verbundvorhabens aus den Teilprojekten 1 – 4 (Förderkennzeichen 0312916 A/B/C/D) sowie den Projekten der nicht mit Mitteln des BMBF geförderten Kooperationspartner*

Förderkennzeichen: 0312916A

Laufzeit: 01.08.2002 – 30.11.2004

Zuwendungsempfänger: Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn

Projektleiter: Dr. Peter Kasper (Vertreter: Dr. Roland Frötschl)

**weitere Mitarbeiter: Dr. Claudia Elfgang
Fr. Elfi Schütz**

Liste der im Verbund beteiligten Partner:

Dr. Susanne Brendler-Schwaab, Fr. Christine Brauck, Fr. Brita Krämer-Bautz
Bayer HealthCare AG

Prof. Dr. Bernd Epe, Fr. Cynthia Hertel
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Pharmazie

Fr. Krista Meurer
RCC Cytotest Cell Research GmbH

Dr. Elmar Gocke, Dr. Stephan Kirchner
Hoffmann-La Roche Ltd

Dr. Ulla Plappert-Helbig
Novartis Pharma AG

Dr. Pierre Aeby
Cosmital SA (Wella AG Group)

Fr. Elisabeth Schmidt, Dr. Elke Genschow, Dr. Manfred Liebsch
ZEBET, Bundesinstitut für Risikobewertung

INHALT

I. EINLEITUNG	4
I.1. Aufgabenstellung	4
I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	5
I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens	5
I.4. Kenntnisstand vor Beginn der Untersuchungen	6
I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	8
II. HAUPTTEIL	8
II.1 Eingehende Darstellung des erzielten Ergebnisses.....	8
II.1.1 Vorexperimente zur Protokolletablierung in den beteiligten Labors	8
II.1.1.1 Vorexperimente mit Chlorpromazin und Chlorhexidin	8
II.1.2. Löslichkeit und Rangefinder für kodierte Testsubstanzen der Ringstudie...	9
II.1.2.1. Prüfung der Löslichkeit	9
II.1.2.2. Range-finding (Proliferationsindex) für Mikrokerntest +/-UV	10
II.1.2.3. Range-finding (Viabilität) für Cometassay +/-UV	10
II.1.3. Hauptexperimente zur Prüfung der Photogenotoxizität (Ringstudie)	11
II.1.3.1. Photo-Mikrokerntest.....	11
II.1.3.1.1. 8-Methoxy-psoralen.....	12
II.1.3.1.2. Chlorpromazin.....	12
II.1.3.1.3. Lomefloxazin.....	12
II.1.3.1.4. Ciprofloxacin	13
II.1.3.1.5. Methylen Blau	13
II.1.3.1.6. Proflavin.....	13
II.1.3.1.7. Dacarbazin	13
II.1.3.1.8. Doxycyclin.....	14
II.1.3.1.9. Promazin	14
II.1.3.1.10. Ketoprofen	14
II.1.3.1.11. Acridin	14
II.1.3.1.12. Octylmethoxycinnamat.....	14
II.1.3.1.13. Titandioxid.....	15
II.1.3.1.14. Akkumulierte Kontrollwerte im Photo-Mikrokerntest.....	15
II.1.3.2. Zusammenfassung und Diskussion der Daten im Photo-Mikrokerntest	15
II.1.3.3. Photo-Cometassay	18
II.1.3.3.1. 8-Methoxy-psoralen.....	19
II.1.3.3.2. Chlorpromazin.....	20
II.1.3.3.3. Lomefloxazin.....	20
II.1.3.3.4. Ciprofloxacin	20
II.1.3.3.5. Methylen Blau	20
II.1.3.3.6. Proflavin.....	20

II.1.3.3.7. <i>Dacarbazin</i>	21
II.1.3.3.8. <i>Doxycyclin</i>	21
II.1.3.3.9. <i>Promazin</i>	21
II.1.3.3.10. <i>Ketoprofen</i>	21
II.1.3.3.11. <i>Acridin</i>	21
II.1.3.3.12. <i>Octylmethoxycinnamat</i>	22
II.1.3.3.13. <i>Titandioxid</i>	22
II.1.3.3.14. <i>Akkumulierte Kontrollwerte im Photo-Cometassay</i>	22
II.1.3.4. Zusammenfassung und Diskussion der Daten im Photo-Cometassay	22
II.1.3.5. Vergleich der Testmodelle	24
II.1.3.6. Datenerfassung und biometrische Auswertung (Unterauftrag ZEBET)	26
II.1.3.6.1. <i>Erfassung der Daten</i>	26
II.1.3.6.2. <i>Kontrolle der Datenqualität</i>	26
II.1.3.6.3. <i>Berechnung potenzieller Endpunkte</i>	27
II.1.3.6.4. <i>Überprüfung auf Ausreißer und Intra- und Interlaborvergleich</i>	28
II.1.3.6.5. <i>Berechnung von Prädiktionsmodellen</i>	30
II.1.3.6.6. <i>Evaluation der Prädiktionsmodelle</i>	35
II.2. Voraussichtliche Nutzen	36
II.3. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	37
II.4. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses	37
 <u>Anlagen:</u>	
Anlage 1: Abbildungen 1 - 59	39
Anlage 2: Standard Operation Procedures (SOPs) für Photo-Mikrokerntest und Photo-Cometassay	99

I. EINLEITUNG

I.1. Aufgabenstellung

Stoffe, die unter dem Einfluss von Licht (insbesondere dem UV-Anteil d. Sonnenlichtes) zur Bildung reaktiver Zwischenprodukte photoaktiviert werden, können bei dermalen Exposition DNA-Schädigungen auslösen und somit das Risiko UV-bedingter Hauttumoren erhöhen. Eine Bewertung des photokanzerogenen Potenzials als Teil der Sicherheitsprüfung von bestimmten Arzneiwirkstoffen und Kosmetika ist daher unerlässlich. Gegenwärtig wird die experimentelle Prüfung auf Photokanzerogenität meist in einer mit erheblichen Belastungen für die Tiere verbundenen 1-Jahres-Studie an haarlosen Mäusen durchgeführt. Das vorliegende Projekt hat zum Ziel, den Mikrokern- und den Cometassay als In-vitro-Photogenotoxizitätstests im Rahmen einer begrenzten Ringstudie als mögliche Alternativen zur Voraussage des photokanzerogenen Potenzials zu prävalidieren, um damit die Voraussetzungen für eine eigentliche Validierung zu schaffen. Die Tests werden an der für Prüfw Zwecke vielfach genutzten Zelllinie des Chinesischen Hamsters (V79-Zellen) durchgeführt. Als Testsubstanzen für die Ringstudie wurden Stoffe ausgewählt, die bereits in Photogenotoxizitätstests geprüft worden sind, wobei starke und schwache Photomutagene berücksichtigt wurden sowie Substanzen, die nicht photogenotoxisch, aber phototoxisch sind und solche, die UV absorbieren, aber keine phototoxische Aktivität aufweisen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: In der Ringstudie verwendete Testsubstanzen

Nr.	Testsubstanz	UV/Licht- absor- bierend	photo- toxisch	photo- geno- toxisch	photokanzerogen	
					Tier	Mensch
Gruppe 1: Positivsubstanzen (photogenotoxisch)						
1	8-MOP	+	+	+	+	+
2	Chlorpromazin	+	+	+	+	keine Daten
3	Lomefloxazin	+	+	+	+	keine Daten
4	Ciprofloxazin	+	+	+	+	keine Daten
5	Methylen Blau	+	+	+	keine Daten	keine Daten
6	Proflavin	+	+	+	keine Daten	keine Daten
7	Dacarbazin	+	+	+	keine Daten	keine Daten
8	Doxycyclin	+	+	+	keine Daten	keine Daten
Gruppe 2: Negativsubstanzen (nicht-photogenotoxisch)						
2a: phototoxische Substanzen						
9	Promazin	+	+	-	keine Daten	keine Daten
10	Ketoprofen	+	+	-	keine Daten	keine Daten
11	Acridin	+	+	-	keine Daten	keine Daten
2b: nicht-phototoxische, UV-absorbierende Substanzen						
12	Octylmethoxycinnamat (OMC)	+	-	-	-	keine Daten
13	Titandioxid	+	-	-	keine Daten	keine Daten

An der Ringstudie haben sich neben dem BfArM sechs weitere Laboratorien aus dem Bereich der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie, Auftragsforschung und Universität beteiligt. Die Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) hat als

unabhängige Stelle die Verteilung der kodierten Testsubstanzen sowie die biostatistische Auswertung der Ergebnisse übernommen.

Zusätzlich zur Ringstudie wurden in zwei Teilprojekten (Förderkennzeichen 0312916 B und D) mechanistische Untersuchungen mit ausgewählten Substanzen der Ringstudie durchgeführt. Ziel war es, die Art des verursachten DNA-Schadens mit Hilfe von Reparaturenzymen als Sonden genauer zu charakterisieren und somit die Empfindlichkeit der untersuchten Photogenotoxizitätstests auf verschiedene Arten der DNA-Schädigung zu ermitteln. Desweiteren wurden zusätzliche Untersuchungen zur Phototoxizität im hierfür entwickelten Standardverfahren, dem Neutralrot-Assay, durchgeführt mit dem Ziel, die Kenntnis der Korrelation von Photo-Zytotoxizität und Photo-Genotoxizität zu verbessern. Die Ergebnisse dieser Zusatzuntersuchungen werden ausführlich in den Schlussberichten der beiden Teilprojekte beschrieben.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Wesentliche Vorarbeiten für die Ringstudie wurden in einem Vorläuferprojekt des BfArM und der Bayer AG durchgeführt. Auf diesen Studien basierte die Erstellung der „Standard Operation Procedures“ (SOPs), nach denen der Photo-Mikrokerntest und der Photo-Come-tassay einheitlich von allen Projektpartnern durchgeführt wurden. Eine weitgehende Standardisierung der Testdurchführungen in den verschiedenen Labors Auch die technische Ausrüstung (Bestrahlungsquelle, Messgeräte) sowie die verwendeten Zellkultur- und Laborchemikalien wurden zwecks Standardisierung weitgehend abgeglichen. Die Ergebnisse des Vorläuferprojektes bildeten auch die wesentliche Grundlage für die Auswahl der in der Ringstudie geprüften Testsubstanzen.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde als Verbund unter Beteiligung mehrerer Teilnehmer konzipiert, wobei nicht alle Teilnehmer Fördermittel beantragt hatten (siehe Tabelle 2). Die Zusammenarbeit der finanziell geförderten Partner wurde durch eine Kooperationsvereinbarung geregelt. Für die auf eigene Kosten mitwirkenden Teilnehmer wurde eine rechtsverbindliche Zusicherung über die durchzuführenden Arbeiten abgegeben.

Tabelle 2: Liste der am Vorhaben beteiligten Labors

Arbeitsgruppe	Projektleiter	Förderkennzeichen
Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte	Dr. P. Kasper Dr. R. Frötschl	0312916A
Bayer HealthCare AG	Dr. S. Brendler-Schwaab	0312916B
RCC Cytotest Cell Research GmbH	Dr. K. Meurer	0312916C
Institut für Pharmazie Universität Mainz	Prof. Dr. B. Epe	0312916D
F.Hoffmann-La Roche AG	Dr. E. Gocke Dr. S. Kirchner	keine Förderung
Novartis Pharma AG	Dr. U. Plappert-Helbig	keine Förderung
Cosmital SA (Wella AG)	Dr. P. Aeby	keine Förderung
ZEBET d. BfR	Dr. E. Schmidt Dr. M. Liebsch	Unterauftrag in 0312916A

Das Gesamtvorhaben wurde vom BfArM koordiniert. Im Teilvorhaben des BfArM wurde an die ZEBET ein Unterauftrag erteilt, der die Beschaffung und Kodierung der Testsubstanzen und deren Versand umfasst sowie die Erfassung und biometrische Auswertung der Versuchsdaten. Als „Leading“-Labors für methodische Aspekte und Fragen zu den SOPs fungierte das Bayer-Labor (Dr. Susanne Brendler-Schwaab) für den Photo-Cometassays und das BfArM-Labor (Dr. Peter Kasper) für den Photo-Mikrokernstest. Insgesamt wurden im BfArM acht eintägige Treffen für Projektbesprechungen organisiert, an denen Vertreter aller Teilnehmerlabors regelmäßig beteiligt waren.

Die Arbeiten der ersten Phase des Vorhabens bestanden in der Implementierung der Testmethoden in den an der Ringstudie teilnehmenden Labors sowie der Etablierung eines weitgehend einheitlichen Bestrahlungsstandards. Hierzu wurden Vorexperimente nur mit UV-Bestrahlung in allen Labors durchgeführt, um auf der Basis von UV-Dosis-Wirkungskurven der genotoxischen Effekte die Strahlungsbedingungen der einzelnen Labors zu vergleichen („biologische Kalibrierung“). Die Ergebnisse dienten darüberhinaus zur Festlegung der UV-Höchstdosis für die Experimente der Substanzuntersuchungen. In einem zweiten Schritt des Protokolltransfers sollten jeweils eine Positivsubstanz, Chlorpromazin (photozytotoxisch & photomutagen) und eine Negativsubstanz, Chlorhexidin (photozytotoxisch, aber nicht photomutagen), in beiden Testmethoden von allen Labors geprüft (siehe II.1.1.1.). Im Zuge dieser Arbeiten wurden die Standardmethodenbeschreibungen in Anpassung an die Erfahrungen in den einzelnen Labors bezüglich einiger methodischer Details modifiziert und präzisiert (z.B. Färbung, Zeitangaben, Zytotoxmessung). Gleichzeitig wurden von ZEBET Spreadsheets für die Erfassung der Zytotoxizitäts- und Genotoxizitätsdaten beider Methoden entwickelt (siehe II.1.3.6.).

In der Hauptphase des Vorhabens, der Prüfung ausgewählter kodierter Testsubstanzen, wurden zunächst für alle Substanzen Rangefinder-Experimente durchgeführt. Diese Experimente bestehen aus einer Abfolge aus Löslichkeitstest, Zytotoxizitätstests ohne UV-Bestrahlung zur Ermittlung der Substanztoxizität und schließlich Zytotoxizitätstest mit UV-Bestrahlung zur Ermittlung der Phototoxizität der Testsubstanz (siehe II.1.2.). Letzteres bildet die Basis für den im Hauptexperiment zu prüfenden Testbereich. Aus den für jede Substanz von mehreren Labors erarbeiteten Rangefinder-Daten wurde ein konsolidierter und für alle Labors einheitlicher Testrange pro Substanz für die Hauptstudien festgelegt (siehe II.1.3.).

I.4. Kenntnisstand vor Beginn der Untersuchungen

Die Mehrzahl der routinemäßig verwendeten In-vitro-Genotoxizitätstestsysteme wurde bereits für Zwecke der Photogenotoxizitätspüfung verwendet und für Untersuchungen einzelner Testsubstanzen eingesetzt. Publikationen zu methodischen Aspekten liegen für mehrere Testsysteme vor z.B. Ames-Test (Dean et al. 1991; Chetelat et al. 1993a), Chromosomenaberrationsuntersuchungen an Säugerzellen (Chetelat et al. 1993b, Gocke et al. 1998), Mikrokernstest an Säugerzellen (Kersten et al. 1999, 2002; Snyder und Cooper 1999), Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen an Säugerzellen (Bulera et al. 1999, Chetelat et al. 1996). In den vergangenen Jahren wurden insbesondere im Bereich der In-vitro-Phototoxizitätstestung systematische Untersuchungen zur Optimierung und Standardisierung von Versuchsdesign inkl. Bestrahlungsbedingungen durchgeführt (Spielmann et al., 1994, 1998). Die hierbei gewonnenen grundlegenden Erkenntnisse sind in wesentlichen Teilen auch für die In-vitro-Prüfmethoden der Photomutagenität anwendbar. Die Diskussion methodischer Aspekte der Photogenotoxizitätspüfung sowie des Stellenwertes dieser Prüfmethode in einer Gesamtbatterie waren Gegenstand mehrerer in den letzten Jahren durchgeführter Veranstaltungen. Im Rahmen des „International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP)“, der 1999 in Washington stattfand, wurden vom Arbeitskreis „Photochemische Genotoxizität“ erste Schritte für die weltweite methodische Standardisierung der Testung auf Photomutagenität und ein Testkonzept erarbeitet. Die Ergebnisse sind in Gocke et al. (2000)

publiziert. Die dort dargestellten methodischen Aspekte und Ergebnisse wurden in der Ringstudie berücksichtigt.

Auch auf dem im Jahr 2000 von ZEBET in Berlin organisierten 2. Internationale ECVAM-Workshop zur Phototoxizität wurde die Photogenotoxizität als ein wesentlicher Bestandteil einer wissenschaftlich sinnvollen und methodisch fundierten Phototoxizitätstestung von Stoffen unterschiedlicher Anwendungsbereiche diskutiert und die Notwendigkeit zukünftiger Validierungsaktivitäten herausgestellt. Die Ergebnisse wurden von Spielmann et al. in ATLA (2000) veröffentlicht. In einer Arbeitsgruppe der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM) zum Thema „Photochemische Genotoxizität“ wurden sowohl Grundlagenwissenschaftliche als auch Anwendungs-orientierte Aspekte der Photogenotoxizität zusammengestellt und in einem Review publiziert (Brendler-Schwaab et al. 2004).

Im Rahmen eines vom BfArM und der Bayer AG gemeinsam durchgeführten Vorgängerprojektes „Photomutagenitätsprüfungen in vitro als Vortest auf photokanzerogene Wirkungen in vivo“ wurden verschiedene In-vitro-Säugerzellsysteme an die Bestrahlung mit UV+sichtbarem Licht adaptiert und hinsichtlich ihrer Eignung zur Erfassung photogenotoxischer Effekte geprüft. Es wurden Testsysteme zum Nachweis unterschiedlicher genetischer Endpunkte berücksichtigt: Tests zum Nachweis von Chromosomenbrüchen (Mikrokerntest in V79-Zellen und in humanen Keratinozyten), Tests zum Nachweis von Punktmutationen (XPRT-Test in AS52-Zellen und HPRT-Test in V79-Zellen) und ein Test zum Nachweis von DNA-Stangbrüchen (Cometassay in V79-Zellen). Als Ergebnis dieser vergleichenden Untersuchungen wurde gefunden, dass der Photo-Mikrokerntest in V79-Zellen (Kersten et al., 1999, 2002) sowie der Photo-Cometassay in V79-Zellen die beste Eignung für die Photogenotoxizitätsprüfung in vitro besitzen, da sich beide durch eine sehr gute Praktikabilität und Robustheit sowie hohe Reproduzierbarkeit auszeichnen und außerdem eine hohe Sensitivität zum Erkennen photogenotoxischer Substanzen aufweisen. In umfangreichen systematischen Untersuchungen wurde an der Optimierung der Bestrahlungsbedingungen gearbeitet, die in den jeweiligen SOPs ausführlich beschrieben sind. Der Einfluß weiterer Test-spezifischer Faktoren, wie Auswahl des Behandlungsmediums (PBS versus pH-Indikator enthaltendes Kulturmedium, Einfluss v. Kälberserum) auf die Bestrahlung der Zellkulturen, Zeitpunkt der Testsubstanzbehandlung relativ zur UV-Bestrahlung usw. wurden ebenfalls eingehend untersucht (Kersten et al. 1999, 2002; Gocke et al. 2000) und im Sinne einer Testoptimierung in der SOP berücksichtigt.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass im Rahmen des Vorgängerprojektes die wichtigsten Einflussgrößen auf die Funktionsfähigkeit des In-vitro-Photo-Mikrokerntests und Photo-Comet-Assays ausreichend charakterisiert worden sind. Als Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden SOPs erarbeitet, die eine zuverlässige und praktikable Versuchsdurchführung des Photo-Mikrokerntests und des Comet-Assays beschreiben.

Liste von Publikationen zu den Vorarbeiten des Antragstellers

- L Müller, P Kasper (1998) The relevance of photomutagenicity testing as a predictor of photocarcinogenicity. *Int.J.Toxicol.* 17: 551-558.
- L Müller, P Kasper, B Kersten, J Zhang (1998) Photochemical genotoxicity and photochemical cacinogenesis-Two sides of a coin? *Toxicol.Lett.* 102-103: 383-387.
- B Kersten, J Zhang, P Kasper, SY Brendler-Schwaab R Schleicher, A Wolbert, L Müller (1999) In vitro photogenotoxicity studies using the XPRT test in AS52 Chinese hamster ovary cells. *ATLA* 27: 322.
- J Zhang, B Kersten, P Kasper, L Müller (1999) Photogenotoxicity and apoptosis in human HaCaT keratinocytes induced by 8-methoxypsoralen and lomefloxacin: dependent on the differentiation status? *Toxicol.Lett.* 109 (Suppl. 1): 77.
- B Kersten, J Zhang, SY Brendler-Schwaab, P Kasper, L Müller (1999) The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutat.Res.* 445: 55-71.
- L Müller, S Brendler-Schwaab, P Kasper, B Kersten (2001) In vitro Methoden zur Prüfung von Arzneimitteln auf phototoxische/photokanzerogene Eigenschaften. *ALTEX* 18, 117-121.

- J Zhang, B Kersten, P Kasper, L Müller (2001) Photogenotoxicity and apoptosis in human HaCaT keratinocytes induced by 8-methoxypsoralen and lomefloxacin. Environ. Mutagen Res. 23, 89-96.
- B Kersten, P Kasper, S Y Brendler-Schwaab, L Müller (2001) Effects of visible light absorbing chemicals in the photo-micronucleus test in Chinese hamster V79 cells. Environ. Mutagen Res. 23, 97-102.
- B Kersten, P Kasper, S Y Brendler-Schwaab, L Müller (2002) Use of the photo-micronucleus assay in Chinese hamster V79 cells to study photochemical genotoxicity. Mutat. Res. 519, 49-66.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Wie unter I.3. beschrieben, waren neben den vier mit BMBF-Mitteln geförderten Kooperationspartnern (Teilprojekte A-D) drei weitere Laboratorien an der experimentellen Durchführung der Ringstudie beteiligt. Darüberhinaus war ZEBET im Rahmen eines Unterauftrages im Teilprojekt des Koordinators (Teilprojekt A) beteiligt. Bei der Auswahl der Testsubstanzen hat die Arbeitsgruppe „Photochemische Mutagenese“ der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM) beratend mitgewirkt.

II. HAUPTTEIL

II.1 Eingehende Darstellung des erzielten Ergebnisses

II.1.1 Vorexperimente zur Protokolletablierung in den beteiligten Labors

II.1.1.1 Vorexperimente mit Chlorpromazin und Chlorhexidin

Das aus der Klasse der Phenothiazine stammende Chlorpromazin ist ein bekanntes und gut untersuchtes Photomutagen, das auch im Vorgängerprojekt in den hier verwendeten Testsystemen eingesetzt wurde und gut reproduzierbare positive Befunde zeigte. Im Rahmen der Ringstudie wurde Chlorpromazin als Positivkontrolle eingesetzt. Die Prüfung der unkoordinierten Substanz in allen Labors im Rahmen dieses Vorexperiments diente somit einerseits dem Zweck, die Sensitivität in der Erfassung eines bekannten Photomutagens zu vergleichen und andererseits zur Ermittlung der Konzentration(en) für die Verwendung als Positivkontrolle in der Ringstudie. Chlorhexidin besitzt zwar ein phototoxisches Potenzial; eine photogenotoxische Wirkung wurde dagegen in bisherigen Untersuchungen nicht nachgewiesen und wurde in den Vorexperimenten für den Interlabor-Vergleich als Negativsubstanz verwendet.

Photo-Mikrokerntest mit Chlorpromazin

Wie die Ergebnisse aus 5 Labors (Cosmital und Novartis beteiligen sich im Rahmen des Vorhabens nicht an den Untersuchungen im Mikrokerntest) in Abb. 1 (Anl. 1) zeigen, induzierte Chlorpromazin bei 4 Labors einen sehr steilen Anstieg der Mikrokernrate innerhalb eines relativ engen Konzentrationsbereiches, gefolgt von einem Abfall des genotoxischen Effektes bedingt durch die starke Proliferations-hemmende Wirkung in höheren Konzentrationen. Abweichend hiervon wurde im Labor 3 ein zwar klarer, aber moderater Anstieg der Mikrokernrate beobachtet; darüberhinaus konnten in diesem Labor höhere Konzentrationen geprüft werden, bei denen in den anderen Labors bereits komplette Zytoletalität vorlag. Eine mögliche Ursache für diesen Sensitivitätsunterschied ist nicht bekannt.

Auf der Basis der vorliegenden Daten wurde Chlorpromazin als Positivkontrolle im Photo-Mikrokerntest in Konzentrationen von 0,3 und/oder 0,6 µg/ml eingesetzt werden; zur Mitführung zweier Konzentrationen wurde geraten, um die Gefahr einer Testwiederholung bei negativem Ergebnis mit der Positivkontrolle möglichst gering zu halten.

Photo-Cometassay mit Chlorpromazin

Im Photo-Cometassay zeigte Chlorpromazin in vier Labors einen deutlich positiven Befund in der Erhöhung der Tail-Length (Abb. 3 d. Anl. 1); die Ergebnisse von Labor 2 waren schwächer ausgeprägt, wurden aber nach Labor-internen Kriterien als positiv bewertet. Auf Grund der vorliegenden Daten wurden für die Verwendung von Chlorpromazin als Positivkontrolle im Photo-Cometassay Testkonzentrationen von 6 und/oder 12 µg/ml ausgewählt.

Photo-Mikrokerntest mit Chlorhexidin

Die Ergebnisse der Mikrokern- und Proliferationsuntersuchungen aller beteiligten Labors sind in der Abb. 2 (Anl. 1) gezeigt. Die Konzentrations-abhängige Reduzierung der Proliferation belegt das phototoxische Potenzial der Substanz. Der Photo-Mikrokerntest lief dagegen in allen Untersuchungen klar negativ und ergibt somit auch in dieser Studie keinerlei Hinweis für photogenotoxische Eigenschaften von Chlorhexidin.

Photo-Cometassay mit Chlorhexidin

Die Daten vom Photo-Cometassay mit Chlorhexidin aus fünf Labors sind in Abb. 4 (Anl. 1) gezeigt. Die Untersuchungen zeigten keine signifikante Erhöhung der Tail-Length und somit für Chlorhexidin keinen photogenotoxischen Effekt.

II.1.2. Löslichkeit und Rangefinder für kodierte Testsubstanzen der Ringstudie

II.1.2.1. Prüfung der Löslichkeit

Die Verwendung des Lösungsmittels DMSO für schwer wasserlösliche Substanzen wurde vorgegeben. Bei Verwendung von DMSO wurde die Substanz zunächst in 100% Lösungsmittel gelöst und, entsprechend der allgemein üblichen Vorgabe, den DMSO-Gehalt im Zellkulturmedium auf 1% zu begrenzen, im Verhältnis 1 : 100 dem Medium zugegeben. Ausgehend von einer Substanzhöchstkonzentration im Medium von 5 mg/ml wird als Löslichkeitsgrenze die höchste Konzentration festgelegt, bei der die Zugabe der 100%-igen DMSO Lösung in das Medium keine Präzipitationserscheinung zeigt. Das Auftreten von Präzipitationen wird i.d.R. zeitnah zur Zugabe mit dem Auge bestimmt.

Wie ein Vergleich der Löslichkeitsdaten aus den einzelnen Labors in der Tabelle 3 zeigt, wurden zum Teil extrem unterschiedliche Werte ermittelt. Dies legt nahe, dass die Vorgehensweise wenig standardisiert und möglicherweise von einer stark subjektiven Bewertung der Präzipitationserscheinungen abhängt. Ähnlich große Unterschiede wurden auch in anderen, vergleichbaren Ringstudien gefunden (Spielmann et al. 1998) und werden nach Erfahrungen des BfArM sehr häufig auch in Zulassungsdokumentationen beobachtet (bei In-vitro-Untersuchungen der selben Substanz in unterschiedlichen Laboren).

Wenngleich diese offenbar ungenaue Bestimmung der Löslichkeit unbefriedigend erscheint, so ist hier ein negativer Einfluss auf die Ergebnisse der Ringstudie nicht zu erwarten. Bei der Festlegung der für alle Labors einheitlich zu verwendenden Höchstkonzentration im nachfolgenden Rangefinder-Experiment ohne UV wurde in der Regel die höchste ermittelte Löslichkeitsgrenze verwendet. Für die Festlegung des Testranges im Haupttest zur Ermittlung der Photogenotoxizität gibt es letztendlich drei Kriterien, die nacheinander abgearbeitet wurden: (i) Löslichkeit, (ii) Substanztoxizität (ohne UV), (iii) Phototoxizität (mit UV). Die Löslichkeit spielt als wesentliches Kriterium nur dann eine Rolle, wenn die Substanzen keine (Photo-) Zytotoxizität aufweisen. Dies kommt bei den für das Projekt ausgewählten Testsubstanzen praktisch nicht vor. Die überwiegende Mehrzahl der hier verwendeten Testsubstanzen sind bereits im Dunkeln, aber insbesondere unter UV-Bedingungen so toxisch, dass die Testkonzentrationen im Haupttest deutlich unterhalb der Löslichkeitsgrenze liegen, selbst wenn diese zu hoch angesetzt wurde. Wichtiger ist, dass der umgekehrte Fall, nämlich die Festlegung eines zu niedrigen Testranges für das Hauptexperiment wegen falscher Löslichkeitsbestimmung (mit der Gefahr, eine potenzielle Photogenotoxizität nicht zu erfassen), auf Grund der oben geschilderten Vorgehensweise ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 3: Löslichkeitsdaten für die 13 in der Ringstudie verwendeten Testsubstanzen & daraus abgeleitete Testhöchstkonzentrationen

Nr.	Lösungsm.	In den einzelnen Labors ermittelte Löslichkeitsgrenze [mg/ml]					Höchstkonz. i. Rangefinder [mg/ml]
		BfArM	Bayer	RCC	Mainz	Cosmital	
1	DMSO	117	125	63	127	-	1,2
2	DMSO	313	250	125	500	-	3,2
3	Medium	4	5	-	9	500	5,0
4	Medium	0,02	0,05	7,8	0,04	333	3,2
5	Medium	0,5	0,5	15,6	-	500	5,0
6	Medium	-	1	31	1,4	100	1,0
7	DMSO	9,8	3,1	15,6	4,4	-	0,15
8	Medium	125	0,1	3,9	61	6,3	1,2
9	Medium	500	125	16	500	100	5,0
10	DMSO	417	-	125	333	125	4,2
11	DMSO	36	19	31	87	-	0,45
12	DMSO	500	500	125	500	100	5,0
13	Medium	0,6	0,1	3,9	4,5	5	0,1

II.1.2.2. Range-finding (Proliferationsindex) für Mikrokerntest +/-UV

Die Festlegung des zu testenden Konzentrationsbereiches in der Hauptstudie erfolgt auf der Basis der Zytotoxizität der Testsubstanz unter UV-Bestrahlung. Für die Mikrokernuntersuchungen wird die Zytotoxizität anhand eines Proliferationsindex bestimmt. In einem ersten Schritt wird die Substanztoxizität, ausgehend von der höchsten löslichen Konzentration (bzw. 5000 µg/ml bei Substanzen ohne Löslichkeitbegrenzungen) experimentell überprüft. Der zweite Schritt besteht aus der Prüfung der Phototoxizität, wobei hier als höchste Testkonzentration die niedrigste Konzentration mit deutlicher zytotoxischer Wirkung (PI <1.3) im Dunkelexperiment zu verwenden ist. Entsprechend werden die Höchstkonzentrationen für das Hauptexperiment auf der Basis der Phototoxizitätsdaten ausgewählt, wobei die Toxizitätsdaten aus mehreren Laboren zu Grunde gelegt werden, so dass sich u.U. ein entsprechend weiter Testrange für die Hauptstudie ergeben kann. Dieses Vorgehen nimmt die Erfahrungen aus vorangegangenen Ringstudien mit ähnlicher Fragestellung auf (Spielmann et al. 1998, v.d. Hude et al. 2000) und soll verhindern, dass die Prüfung einer Substanz im Hauptexperiment in den einzelnen Labors in völlig unterschiedlichen Konzentrationsbereichen erfolgt.

Die Ergebnisse der Range-finding-Experimente im Proliferationstest mit und ohne UV für die 13 Substanzen der Ringstudie sind in Anlage 1 in den Abbildungen 5-11 (Anl. 1) dargestellt. Eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven der PI-Werte nach UV-Bestrahlung gegenüber dem Kurvenverlauf der unbestrahlten Kontrollen kann als Kennzeichen einer phototoxischen Wirkung der Testsubstanz interpretiert werden.

II.1.2.3. Range-finding (Viabilität) für Cometassay +/-UV

Für den Cometassay wird die Zytotoxizität anhand von Zellzählungen und dem Nachweis abgestorbener Zellen mit der Trypanblau-Methode und einer daraus ermittelten relativen (zur Kontrolle) Viabilitätsrate bestimmt. Das schrittweise Vorgehen von Dunkel und UV-Experiment erfolgt analog zu dem im Abschnitt II.1.2.2. beschriebenen Verfahren, wobei als Kriterium für die Zytoxizitätsgrenze eine relative Viabilität von 60% zur Anwendung kommt. Die Ergebnisse der Range-finding-Experimente im Viabilitätstest mit und ohne UV für die 13 Substanzen der Ringstudie sind in Anlage 1 in den Abbildungen 13-19 dargestellt.

II.1.3. Hauptexperimente zur Prüfung der Photogenotoxizität (Ringstudie)

Sämtliche Untersuchungen der Ringstudie (Löslichkeit, Range-finder, Photogenotoxizitätstests) wurden mit geblindeten Substanzen durchgeführt (Versand durch ZEBET in der 1. Jahreshälfte 2003). Die Dekodierung erfolgte erst nach Abschluss der experimentellen Arbeiten und Abgabe sämtlicher Daten bei ZEBET auf dem 7. Projektarbeitstreffen im BfArM am 22.02.2005.

II.1.3.1. Photo-Mikrokerntest

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 4) zeigt die Verteilung der Testsubstanzen auf die einzelnen Labors für den Photo-Mikrokerntest. Die Daten der Universität Mainz wurden wegen unzureichender Auswertbarkeit der Präparate (vermutlich auf Grund von Präparations-/Färbeproblemen), die jedoch erst nach Dekodierung der Testsubstanzen erkannt wurde, nicht in der Gesamtauswertung berücksichtigt. Dementsprechend wurden mit Ausnahme von Proflavin, dass in nur zwei Labors geprüft wurde, alle übrigen Substanzen in drei oder vier Labors parallel geprüft. Pro Labor wurden für jede getestete Substanz zwei unabhängige Prüfexperimente („Runs“) durchgeführt, so dass die Ringstudie für den Photo-Mikrokerntest insgesamt 84 Testdurchläufe umfasst.

Tabelle 4: Laborverteilung der Testsubstanzen im Photo-Mikrokerntest

	BfArM Lab 1	Bayer Lab 2	RCC Lab 3	Mainz ¹ Lab 5	La Roche Lab 4	Insgesamt ²
8-MOP	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	(✓ ✓)		3
Chlorpromazin	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓		✓ ✓	4
Lomefloxazin	✓ ✓	✓ ✓		(✓ ✓)	✓ ✓	3
Ciprofloxazin	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	(✓ ✓)		3
Methylen Blau	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	(✓ ✓)	✓ ✓	4
Proflavin			✓ ✓		✓ ✓	2
Dacarbazin	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	(✓ ✓)		3
Doxycyclin	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	(✓ ✓)		3
Promazin	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓		✓ ✓	4
Ketoprofen	✓ ✓		✓ ✓	(✓ ✓)	✓ ✓	3
Acridin	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	(✓ ✓)		3
OMC	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓		✓ ✓	4
Titandioxid	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	(✓ ✓)		4
insgesamt:	12	11	12	- ¹	7	42 (84 runs)

¹Mikrokerndaten von Labor Mainz wurden für Gesamtauswertung nicht berücksichtigt

²ohne Daten Labor Mainz

Der mit der jeweiligen Testsubstanz zu prüfende Konzentrationsbereich wurde auf der Basis der Rangefinder-Daten gemeinsam für alle Labors festgelegt. Darüberhinaus wurden in jedem Test die folgenden Kontrollen mitgeführt: Vehikelkontrollen jeweils mit und ohne UV-Bestrahlung, eine Kontrolle zur Prüfung möglicher klastogener Effekte der Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung (es wurde die Höchstkonzentration der UV-Experimente verwendet) sowie als Positivkontrolle eine Behandlung mit Chlorpromazin plus UV-Bestrahlung. Neben der Mikrokernrate wurde als Endpunkt einer zytotoxischen Wirkung der Proliferationsindex bestimmt.

Die in der nachfolgenden Beschreibung der Testergebnisse verwendeten Kriterien zur Bewertung eines positiven Befundes (photogenotoxischer Effekt) richteten sich einerseits nach dem im jeweiligen Test ermittelten UV-Kontrollwert und andererseits nach dem Mittelwert der für jedes Labor ermittelten historischen UV-Kontrollen. Da diese Kontrollen teilweise erhebliche Labor-spezifische Unterschiede aufwiesen, wurden (entsprechend den

Vorschlägen der OECD-Guidelines für In-vitro-Genotoxizitätstests) Labor-spezifische Kriterien entwickelt.

Tab. 5: Kriterien für Labor-spezifische Beurteilung positiver Ergebnisse im Photo-Mikrokerntest

Labor 1	1. Signifikanz 2. MN: Faktor 2 über Vehikelkontrolle 3. MN > 4%
Labor 2	1. Signifikanz 2. MN: Faktor 2 über Vehikelkontrolle 3. MN > 4%
Labor 3	1. MN: Faktor 2 über Vehikelkontrolle 2. MN > 1,7%
Labor 4	1. MN: Faktor 2 über Vehikelkontrolle 2. MN : Faktor 2,5 über MW d. hist. UV-Kontrollen

Grafische Darstellungen der Ergebnisse für die Ringstudien-Untersuchungen im Photo-Mikrokerntest sind in der Anlage I, in den Abbildungen 20 – 32 zu finden.

II.1.3.1.1. 8-Methoxypsoralen

8-Methoxypsoralen (8-MOP) wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 20 (Anl. 1) zeigen, dass 8-MOP nach UV-Bestrahlung in allen Untersuchungen zu einer deutlichen Erhöhung der Mikrokernrate mit Maximalwerten von über 10% führt. Der Rückgang der Mikrokernrate bei höheren Konzentrationen kann mit der im Proliferationsindex dokumentierten zunehmenden Hemmung der Zellproliferation erklärt werden. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen liegen im normalen Bereich, sowohl für die basalen Mikrokernwerte als auch für den Proliferationsindex. Ohne UV-Bestrahlung induziert 8-MOP in V79-Zellen keine Mikrokernrate. Bezogen auf die Klassifizierung von 8-MOP als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aller drei Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.1.2. Chlorpromazin

Das photogenotoxische Potenzial von Chlorpromazin wurde in vier Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 21 (Anl. 1) zeigen, dass Chlorpromazin nach UV-Bestrahlung die Mikrokernrate in allen Untersuchungen deutlich erhöht. Die glockenförmigen Kurvenverläufe zeigen auch hier, dass mit zunehmender Hemmung der Zellproliferation (PI) die Mikrokernrate wieder abnimmt. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induzierte Chlorpromazin in V79-Zellen keinen signifikanten Anstieg der Mikrokernrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Chlorpromazin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aller vier Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.1.3. Lomefloxacin

Das photogenotoxische Potenzial von Lomefloxacin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 (Anl. 1) gezeigt. Lomefloxacin zeigt nach UV-Bestrahlung in 5 von 6 Experimenten einen positiven Befund. Im ersten Run von Labor 2 wurde zwar ein Anstieg der Mikrokernrate auf über 5% festgestellt und damit das Teilkriterium > 4% erreicht, jedoch wurde auf Grund des relativ hohen UV-Kontrollwertes von 3,8% das zweite Kriterium (mind. 2 x UV-Kontrolle) verfehlt, weshalb dieser Run als negativ zu bewerten ist. In den Laboren 1 und 2 zeigen sich erhebliche quantitative Unterschiede zwischen den Wiederholungsexperimenten (Intralabor-Varianzen). Der Proliferationsindex zeigt insbesondere bei Labor 1 und 2 bereits bei der niedrigsten Testkonzentration eine deutliche Reduktion an, was auf

eine starke phototoxische Wirkung der Substanz hinweist. Ohne UV-Bestrahlung induzierte Lomefloxacin in 5 von 6 Experimenten keine Mikrokerne; im zweiten Run von Labor 5 war die Mikrokernrate bei 1250 µg/ml auf 7.0% erhöht. Eine schwache klastogene Wirkung in hohen Konzentrationen auch ohne UV ist für Fluorochinolone bekannt und der Topoisomerase-Hemmung zu schreiben; bei gleicher Konzentration zeigt sich mit UV eine deutliche Potenzierung der Chromosomen-brechenden Wirkung. Bezogen auf die Klassifizierung von Lomefloxacin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse in 5 von 6 Runs ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.1.4. Ciprofloxacin

Das photogenotoxische Potenzial von Ciprofloxacin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokernstest untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 23 (Anl. 1) zeigen, dass Ciprofloxacin nach UV-Bestrahlung die Mikrokernrate in allen Untersuchungen deutlich erhöht; die Daten weisen eine sehr gute Reproduzierbarkeit in den Wiederholungsexperimenten der einzelnen Labors auf. Der Kurvenverlauf des Proliferationsindex zeigt für alle 6 Runs eine über den gesamten Konzentrationsbereich gleichartig zunehmende Hemmung der Zellproliferation. Die Werte der Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Ciprofloxacin keine Mikrokerne. Bezogen auf die Klassifizierung von Ciprofloxacin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aller drei Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.1.5. Methylen Blau

Methylen Blau wurde in vier Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokernstest untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 24 (Anl. 1) zeigen, dass Methylen Blau nach UV-Bestrahlung in 7 von 8 Runs einen positiven Befund zeigt. Im ersten Run von Labor 2 wurden die Kriterien für einen positiven Befund nicht erreicht, was jedoch im wesentlichen an der Testung in einem ungeeigneten (zu hohen) Konzentrationsbereich liegt. Die klar positiven photogenotoxischen Effekte im Wiederholungsexperiment wurden ausschließlich in niedrigeren Konzentrationen gefunden. Die Proliferationsindices mit Methylen Blau zeigen zwischen den Labors erhebliche quantitative Unterschiede auf. Die Werte der Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Methylen Blau keine Mikrokerne. Bezogen auf die Klassifizierung von Methylen Blau als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aller drei Labors im Prinzip ein richtiges (positives) Ergebnis; das negative Ergebnis in einem Run ist als Folge der Verwendung ungeeigneter Testkonzentrationen plausibel erklärbar.

II.1.3.1.6. Proflavin

Das photogenotoxische Potenzial von Proflavin wurde in nur zwei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokernstest untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 25 (Anl. 1) zeigen, dass alle 4 Runs mit Proflavin die Kriterien für einen positiven Photogenotoxizitäts-Befund erfüllen. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induzierte Proflavin in V79-Zellen keine Mikrokerne. Bezogen auf die Klassifizierung von Proflavin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse der beiden Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.1.7. Dacarbazin

Dacarbazin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokernstest untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 26 (Anl. 1) zeigen, dass Dacarbazin nach UV-Bestrahlung die Mikrokernrate in allen Untersuchungen deutlich erhöht, teilweise mit drastischen Effekten von über 20% Mikrokern-haltigen Zellen. Die Proliferationsindices mit Dacarbazin lassen eine deutliche Hemmung der Zellproliferation in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ml erkennen. Die Werte der Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Dacarbazin keine Mikrokerne. Bezogen auf die Klassifizierung von Dacarbazin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aller drei Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.1.8. Doxycyclin

Doxycyclin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest untersucht. Auch diese Substanz zeigt in allen Untersuchungen deutlich photogenotoxische Effekte (Abb. 27, Anl. 1). Der Kurvenverlauf des Proliferationsindex zeigt für alle 6 Runs eine über den gesamten Konzentrationsbereich weitgehend homogen verlaufende Zunahme in der Proliferationshemmung. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Vehikelkontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Doxycyclin keine Mikrokerne. Bezogen auf die Klassifizierung von Doxycyclin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aller drei Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.1.9. Promazin

Promazin wurde in vier Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest geprüft (Abb. 28, Anl. 1). In Labor 1 und 4 wurden mit UV-bestrahltem Promazin in beiden Runs reproduziert photogenotoxische Effekte nachgewiesen. In Labor 2 wurden beide Runs als negativ bewertet, während in Labor 3 ein Versuch als (schwach) positiv und der andere als negativ zu bewerten war. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Vehikelkontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Promazin keinen signifikanten Anstieg der Mikrokernrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Promazin als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse in einem Labor ein richtiges (negatives) Ergebnis, in einem Labor ein widersprüchliches und in zwei Labors jeweils falsch-positive Ergebnisse.

II.1.3.1.10. Ketoprofen

Ketoprofen wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest geprüft (Abb. 29, Anl. 1). In Labor 3 wurde mit Ketoprofen nach UV-Bestrahlung reproduziert ein signifikanter Anstieg der Mikrokernrate beobachtet. Nach den Kriterien von Labor 4 wurden beide Runs negativ bewertet. In Labor 1 war der erste Run negativ, während im zweiten Run ein als positiv zu bewertendes Ergebnis gefunden wurde. Der Kurvenverlauf der Proliferationsindices läßt für UV-bestrahltes Ketoprofen eine deutlich zytotoxische Wirkung erkennen. Ohne UV-Bestrahlung induziert Ketoprofen keine Mikrokerne. Bezogen auf die Klassifizierung von Ketoprofen als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aus drei Labors ein richtiges (negatives) Ergebnis, ein widersprüchliches und ein falsch-positives Ergebnis.

II.1.3.1.11. Acridin

Acridin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest geprüft (Abb. 30, Anl. 1). In den Labors 1 und 2 wurde mit Acridin nach UV-Bestrahlung reproduziert ein signifikanter Anstieg der Mikrokernrate beobachtet. Die Ergebnisse in Labor 3 zeigten ein widersprüchliches Bild mit einem als positiv und einem als negativ bewerteten Run. Die Konzentrations-abhängige Reduktion des Proliferationsindex in allen Experimenten zeigt an, dass UV-bestrahltes Acridin ein klar zytotoxisches Potenzial aufweist. Ohne UV-Bestrahlung induziert Acridin keinen signifikanten Anstieg der Mikrokernrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Acridin als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse in einem Labor ein widersprüchliches und in zwei Labors falsch-positive Ergebnisse.

II.1.3.1.12. Octylmethoxycinnamat

Octylmethoxycinnamat (OMC) wurde in vier Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest geprüft (Abb. 31, Anl. 1). Die Daten von Labor 1 weisen für UV-bestrahltes OMC ein reproduziert negatives Ergebnis auf. In den übrigen drei Labors wurden in jeweils einem Run eine Erhöhung der Mikrokernrate gefunden, die die Kriterien eines positiven Befundes erfüllen, während der jeweils zweite Run negativ verlief. Die Reduktion der PIs im oberen Konzentrationsbereich deutet auf eine Zell-toxische

Wirkung hin. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Vehikelkontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert OMC keinen signifikanten Anstieg der Mikrokernrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Octylmethoxycinnamat als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse in einem Labor ein richtiges (negatives) Ergebnis und in drei Labors widersprüchliche Ergebnisse.

II.1.3.1.13. Titandioxid

Titandioxid wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Mikrokerntest geprüft (Abb. 32, Anl. 1). Im Labor 1 wurde mit Titandioxid nach UV-Bestrahlung reproduziert ein signifikanter Anstieg der Mikrokernrate beobachtet, so dass beide Runs nach den verwendeten Kriterien als eindeutig positiv zu werten sind. Die Ergebnisse in Labor 2 zeigen ein widersprüchliches Bild mit einem als positiv und einem als negativ bewerteten Run, wobei ersteres als schwach positiv (maximal Effekt von 4,2% bei einer Konzentration) zu sehen ist. In Labor 3 verliefen beide Versuche eindeutig negativ. Der Kurvenverlauf der Proliferationsindices ergibt keinen signifikanten Hinweis auf eine zelltoxische Wirkung. Ohne UV-Bestrahlung induziert Titandioxid keinen signifikanten Anstieg der Mikrokernrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Titandioxid als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aus drei Labors ein richtiges (negatives) Ergebnis, ein widersprüchliches und ein falsch-positives Ergebnis.

II.1.3.1.14. Akkumulierte Kontrollwerte im Photo-Mikrokerntest

Die im Zuge sämtlicher Ringstudienexperimente (bis zu 24 Experimente pro Labor) akkumulierten Werte der unbestrahlten und der UV-bestrahlten Vehikelkontrollen sowie der Positivkontrollen (UV-bestrahltes Chlorpromazin) sind in Abbildung 49 für jedes Labor in Form sog. Box-Whisker-Plots (Erläuterungen in II.1.3.6.4.) dargestellt. Der Mittelwert für die Mikrokernrate der unbestrahlten V79-Zellen zeigte den niedrigsten Wert im Labor 3 mit 0,14%, gefolgt von Labor 1 mit 0,42% und 0,74% bzw. 0,76% in Labor 2 und 4. Die Bestrahlung der Zellen mit UV aber ohne Substanzbehandlung führte in allen Labors zu einer (der Forderung in der SOP entsprechenden) leichten Erhöhung der Mikrokernraten, die in Labor 3 im Mittel einer Verdopplung, in den übrigen 3 Labors einer Verdreifachung der unbestrahlten Kontrolle entsprach. Die Positivkontrolle Chlorpromazin in der niedrigeren Konzentration von 0,3 µg/ml zeigte den gewünschten klaren Effekt; im Mittel war die Mikrokernrate 3-6-fach gegenüber der UV-Kontrolle erhöht. Die (als Reserve) nicht in allen Experimenten mitgeführte höhere Konzentration von Chlorpromazin zeigte eine weitere Steigerung des photogenotoxischen Effektes.

Die Mittelwerte der verschiedenen Kontrollen des Proliferationsindex zeigen im Vergleich zur Mikrokernrate einen reziproken Verlauf (Abb. 50). Die bloße UV-Bestrahlung und mehr noch die Behandlung mit UV-bestrahltem Chlorpromazin bewirken eine deutlich zunehmende Hemmung der Zellproliferation. Interessant sind die auch hier abweichenden Werte in Labor 3. Der Level der Basisproliferation ist im Vergleich zu den drei anderen Labors (PI-Mittelwerte von 3,0 – 3,2) mit einem Wert von 2,6 deutlich niedriger.

II.1.3.2. Zusammenfassung und Diskussion der Daten im Photo-Mikrokerntest

Im Interlabor-Vergleich der Daten aus dem Mikrokerntest fällt generell auf, dass Labor 3 systematisch über alle Versuche deutlich geringere Mikrokernraten aufweist, sowohl für Kontrollwerte als auch für Werte nach Substanzexposition. Der Mittelwert der historischen UV-Kontrollen liegt bei nur 0,2% und damit ca. 5 – 10-fach niedriger als in den anderen Labors. Eine Erklärung für diesen Unterschied wurde nicht gefunden; Labor-spezifische Differenzen in den Bestrahlungsbedingungen können ausgeschlossen werden, da die Unterschiede im Mikrokernlevel auch bei unbestrahlten Kontrollkulturen gefunden werden. Trotz dieser gravierenden Interlabor-Unterschiede in den absoluten Werten der Mikrokernraten zeigten die relativen Werte der Substanzeffekte (faktorielle Erhöhung gegenüber Kontrollen) weitgehende Übereinstimmung. Auch im Anteil qualitativ richtiger Resultate zeigt Labor 3 gegenüber den anderen Labors keine erkennbaren Abweichungen (Tab. 6 und 7).

Von den acht als photogenotoxisch klassifizierten Substanzen wurden im Photo-Mikrokern-test sechs einheitlich in allen Untersuchungen (insgesamt 36 Runs) richtig erkannt (Tab. 6). Lomefloxazin und Methylen Blau wurden jeweils in einem Run (von 6 bzw. 8 Runs) nicht als photogenotoxisch erkannt. Im Fall von Methylen Blau kann dieses falsch-negative Ergebnis der Prüfung der Wahl eines inadecuaten Konzentrationsbereiches zugeschrieben werden, was im korrigierten Wiederholungsexperiment zu einem richtigen Ergebnis führte. Für Lomefloxazin ist das negative Ergebnis als grenzwertig anzusehen, da ein Anstieg in Lomefloxazin-plus-UV-behandelten Zellen auf 5,2% Mikrokern-haltige Zellen erkennbar war, aber wegen des gleichzeitig relativ hohen UV-Kontrollwertes das Kriterium einer Verdopplung nicht erreichte. Insgesamt zeigen diese Daten, dass der Photo-Mikrokern-test etablierte photogenotoxische (und photokanzerogene) Substanzen sehr sensitiv und zuverlässig erfasst (weitere Details der biometrischen Auswertung unter II.3.1.6.).

Tabelle 6: Übersicht der Gesamtergebnisse im Photo-Mikrokern-test

	Einstufung photo- genotoxisch	Labor 1		Labor 2		Labor 3		Labor 4		Testergebnis	
		1	2	1	2	1	2	1	2	richtig	falsch
8-MOP	+	+	+	+	+	+	+			6	0
Chlorpromazin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	0
Lomefloxazin	+	+	+	-	+			+	+	5	1
Ciprofloxazin	+	+	+	+	+	+	+			6	0
Methylen Blau	+	+	+	-	+	+	+	+	+	7	1
Proflavin	+					+	+	+	+	4	0
Dacarbazin	+	+	+	+	+	+	+			6	0
Doxycyclin	+	+	+	+	+	+	+			6	0
Promazin	-	+	+	-	-	+	-	+	+	3	5
Ketoprofen	-	-	+			+	+	-	-	3	3
Acridin	-	+	+	+	+	+	-			1	5
OMC	-	-	-	+	-	-	+	+	-	5	3
Titandioxid	-	+	+	+	-	-	-			3	3

Für die Gruppe der vor Studienbeginn als nicht-photogenotoxisch klassifizierten Testsubstanzen ist die Teilgruppe mit bekanntem phototoxischen Potenzial (Promazin, Ketoprofen, Acridin) besonders interessant. Alle drei Substanzen erwiesen sich bei der Bestimmung des Proliferationsindex mit und ohne UV-Bestrahlung in den Rangefinder-Experimenten als potente phototoxische Substanzen, d.h. eine substantielle Hemmung der Zellproliferation trat unter UV bereits in weit niedrigeren Testkonzentrationen auf. Im Photo-Mikrokern-test zeigten alle drei Substanzen gemischte, d.h. positive und negative Resultate. Eine Laborspezifische Zuordnung der Ergebnisse im Sinne einer überdurchschnittlichen (In)-Sensitivität eines einzelnen Labors ist nicht erkennbar; alle Labors sind sowohl an der Generierung positiver wie auch negativer Resultate gleichmäßig beteiligt (Tab.7). In Anbetracht dieser Ergebnisse sind Zweifel an der aus den (begrenzten) Daten des Vorgängerprojektes abgeleiteten Klassifizierung dieser Substanzgruppe als „nicht-photogenotoxisch“ angebracht. Stattdessen wäre eine Charakterisierung als schwach-wirksame Photogenotoxine, die in Abhängigkeit von der Sensitivität und Variabilität des biologischen Testsystems mal mehr und mal weniger zur Ausprägung kommen, eine vermutlich angemessenere Interpretation des Datenprofils.

Unterstützung findet diese Einschätzung insbesondere auch, wenn man die photobiologischen Grundlagen der untersuchten Effekte genauer betrachtet. Da die Phototoxizität ebenso wie die Photogenotoxizität mechanistisch auf die Bildung reaktiver Produkte (Radikale) aus der Testsubstanz zurückgeführt wird und die meisten Radikale auch mit DNA reagieren können, kann eine enge Korrelation beider Endpunkte erwartet werden. Es kann vermutet werden, dass das relative Ausmaß von phototoxischen zu photogenotoxischen Effekten von der intrazellulären Verteilung der Substanz bzw. der gebildeten Photoprodukte abhängt. Für einige Substanzen mit stark photogenotoxischem Potenzial sind Eigenschaften, die eine unmittelbare Nähe zur DNA gewährleisten, bekannt, wie z.B. die (der Photoaktivierung vorausgehende) DNA-Interkalation von Methoxypsoralenen oder die Affinität der Fluorochinolone, wie Lome- und Ciprofloxazin, an die DNA-bindenden Topoisomerasen.

Tabelle 7: Interlabor-Vergleich des Anteils qualitativ akkurater Ergebnisse im Photo-Mikrokerntest

	Photogenotoxische Substanzen (Tab. 1: Nr. 1- 8)	Nicht-photogenotoxische Substanzen (Tab. 1: Nr. 9 - 13)
Labor 1	14/14 (100%) richtig positiv	3/10 (30%) richtig negativ
Labor 2	12/14 (86%) richtig positiv	4/8 (50%) richtig negativ
Labor 3	14/14 (100%) richtig positiv	5/10 (50%) richtig negativ
Labor 4	8/8 (100%) richtig positiv	3/6 (50%) richtig negativ

Das Verhältnis von Toxizität zur Genotoxizität ist in dem verwendeten Testmodell auch in einem anderen biologischen Zusammenhang von Bedeutung. Es ist bekannt, dass In-vitro-Säugerzelltests zum Nachweis von Chromosomenaberrationen bzw. Mikrokernen positive Effekte als Folge von extremer Zytotoxizität zeigen können („High-toxicity Clastogens“). Solche Effekte sind als In-vitro-Artefakte anzusehen und ohne Bedeutung für physiologische Bedingungen in vivo (Galloway 2000, Kirkland and Müller 2000). Allerdings bereitet die Identifizierung von Hochtoxizitäts-bedingten Mikrokernen/Chromosomenaberrationen Schwierigkeiten, da auch „echte“ genotoxische Klastogene in der Regel immer eine zytotoxische Komponente aufweisen. Theoretisch wäre also denkbar, dass stark phototoxische Substanzen als *High Toxicity Clastogens* (HTC) Mikrokern auslösen könnten. Die Darstellungen der Korrelation von Proliferationsindices und Mikrokernraten in Abbildung 33 deuten an, dass für die „Negativ“-Substanzen (Substanz Nr. 9-13 in Tab.1) das Maximum erhöhter Mikrokernraten eher mit niedrigen PI-Werten (>2.0) korrelieren, d.h. unter Bedingungen stärkerer Zytotoxizität auftreten. Für die Positivsubstanzen (Substanz Nr. 1-8 in Tab.1) liegt das Gesamtmaximum für Mikrokernraten klar im Bereich von PI-Werten > 2.0 erkennbar. Für die im untersuchten Modell verwendete Methode der Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Proliferationsindex liegen allerdings keine ausreichenden Erfahrungen mit der Prüfung von bekannten HTCs vor, so dass ein PI-Schwellenwert zur Diskriminierung zwischen „echten“ und Toxizitäts-bedingten (Photo-) Klastogenen nicht verfügbar ist. Es ist darauf hinzuweisen, dass auch bei etablierten Routinetestsystemen diese Problematik bei weitem nicht ausreichend geregelt ist. Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass bei kombinierter Anwendung der Endpunkte Mikrokern (für Genotoxizität) und PI (für Zytotoxizität) die Gefahr von Artefaktbildung in der oben geschilderten Form gering ist, da die Mikrokernbildung unmittelbar von der Proliferationsaktivität der Zellen abhängt; eine sehr stark gehemmte Proliferation (als Ausdruck extremer Zytotoxizität) würde also der (möglicherweise Hochzytotoxizitäts-bedingten) Bildung von Mikrokernen entgegenwirken.

Die beiden Substanzen, die als nicht-phototoxisch und nicht-photogenotoxisch klassifiziert sind, OMC und Titandioxid, zeigten im Photo-Mikrokerntest ebenfalls gemischte Ergebnisse mit 5 von 8 richtig-negativen Runs für OMC und 3 von 6 richtig-negativen Runs für Titandioxid. Bei der Bestimmung des Proliferationsindex mit und ohne UV-Bestrahlung in den Rangfinder-Experimenten war eine phototoxische Wirkung von Titandioxid nicht erkennbar; für OMC wurde eine Linksverschiebung der PI-Konzentrations-Wirkungskurven unter UV gesehen, die auf eine phototoxische Wirkung in sehr hohen Konzentrationen hinweist. Eine Interferenz der Genotoxizitätsbefunde mit Phototoxizität wie oben beschrieben kann jedoch insbesondere für Titandioxid ausgeschlossen werden. Die positiven Photogenotoxizitätsdaten sind damit als falsch-positiv zu bewerten und scheinen auf eine Übersensitivität des Photo-Mikrokerntestes hinzudeuten.

Intra- vs. Interlabor-Unterschiede

Eine Betrachtung der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse innerhalb eines jeden Labors zeigt, dass 33 von 42 Prüfungen im Photo-Mikrokerntest qualitativ (positiv oder negativ) gleichartige Ergebnisse im ersten und zweiten Run ergeben haben. Widersprüchliche Ergebnisse zeigen sich erwartungsgemäß vermehrt bei solchen Substanzen, die eine offenbar nur schwach photogenotoxische Wirkung zeigen (Gruppe 2, Tab. 1), was sich in Abhängigkeit von der Sensitivität und der unvermeidlichen Variabilität eines biologischen Testmodells als negatives, grenzwertiges oder schwach positives Ergebnis manifestieren und bei Testwiederholungen entsprechend zum Ausdruck kommen kann. Interessant ist, dass Intralabor- und Interlabor-Varianz korrelieren und eine Erhöhung bei den selben Testsubstanzen (Promazin, Ketoprofen, OMC, Titandioxid) aufzeigen. Dies läßt den Schluss zu, dass die Unterschiede zwischen den Labors nicht als Folge einer unzureichenden Standardisierung der Testbedingungen angesehen werden können, wenn man unterstellt, dass innerhalb eines Labors eine hohe Standardisierung bei Wiederholungsexperimenten gegeben ist.

II.1.3.3. Photo-Cometassay

Tabelle 8 zeigt die Verteilung der Testsubstanzen auf die einzelnen Labors. für den Photo-Cometassay. Dementsprechend wurden die Substanzen in zwei bis fünf Labors parallel geprüft.

Tabelle 8: Laborverteilung der Testsubstanzen im Photo-Cometassay

	BfArM Lab 1	Bayer Lab 2	RCC Lab 3	Mainz Lab 5	Cosmit. Lab 6	Novartis Lab 7	Insgesamt
8-MOP	✓ ✓		✓ ✓	✓ ✓		✓ ✓	4
Chlorpromazin	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓		✓ ✓	5
Lomefloxazin		✓ ✓			✓ ✓	✓	2,5
Ciprofloxazin	✓ ✓				✓ ✓		2
Methylen Blau	✓ ✓		✓ ✓		✓ ✓		3
Proflavin	✓ ✓		✓ ✓		✓ ✓		3
Dacarbazin	✓ ✓	✓ ✓				✓ ✓	3
Doxycyclin		✓ ✓	✓ ✓		✓ ✓		3
Promazin			✓ ✓		✓ ✓	✓ ✓	3
Ketoprofen	✓ ✓	✓ ✓			✓ ✓		3
Acridin	✓ ✓		✓ ✓			✓ ✓	3
OMC	✓ ✓		✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓		4
Titandioxid		✓ ✓			✓ ✓	✓ ✓	3
insgesamt	9	6	8	3	9	6,5	41,5 (83 runs)

Pro Labor wurden für jede getestete Substanz zwei unabhängige Experimente („Runs“) durchgeführt. Für Lomefloxazin liegen in einem Labor (Lab 7) keine brauchbaren Daten des Wiederholungsruns vor. Insgesamt umfasst die Ringstudie für den Photo-Cometassay somit 83 Testdurchläufe.

Der mit der jeweiligen Testsubstanz zu prüfende Konzentrationsbereich wurde auf der Basis der Rangefinder-Daten gemeinsam für alle Labors festgelegt. Darüberhinaus wurden in jedem Test die folgenden Kontrollen mitgeführt: Vehikelkontrollen jeweils mit und ohne UV-Bestrahlung, eine Kontrolle zur Prüfung möglicher genotoxischer Effekte der Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung (es wurde die höchste lösliche Konzentration der UV-Experimente verwendet) sowie als Positivkontrolle Chlorpromazin mit UV-Bestrahlung. Als Hauptmeßparameter für die induzierten DNA-Einzelstrangbrüche wurde die „tail length“ bestimmt. Zusätzlich wurden der „tail moment“ sowie die „tail intensity“ mit Hilfe der Auswertesoftware berechnet. Neben diesen Endpunkten zur Bestimmung der Genotoxizität wurden als Endpunkt einer zytotoxischen Wirkung die Zellvitalität und Anzahl lebender Zellen bestimmt.

Die in der nachfolgenden Beschreibung der Testergebnisse verwendeten Kriterien zur Bewertung eines positiven Befundes (photogenotoxischer Effekt) richten sich nach dem im jeweiligen Test ermittelten UV-Kontrollwert. Da diese Kontrollen teilweise erhebliche Labor-spezifische Unterschiede aufwiesen, wurden (entsprechend den Vorschlägen der OECD-Guidelines für In-vitro-Genotoxizitätstests) Labor-spezifische Kriterien entwickelt. Diese beziehen sich auf den Mittelwert aus 2 Objektträgern je Experiment. Als einheitliches Kriterium in allen Labors wurde zusätzlich eine Mindest-Viabilitätsrate von 60% definiert; das Auftreten von Cometen in Bereichen stärkerer Zytotoxizität wurde nicht gewertet.

Tabelle 9: Kriterien für Labor-spezifische Beurteilung positiver Ergebnisse im Photo-Cometassay

Labor 1	1. Tail Length: Faktor 2 über bestrahlter Vehikelkontrolle 2. rel. Viabilität > 60%
Labor 2	1. Tail Length: Faktor 1,25 oder 8 µm über bestrahlter Vehikelkontrolle 2. rel. Viabilität > 60%
Labor 3	1. Tail Length: Faktor 1,5 über bestrahlter Vehikelkontrolle 2. rel. Viabilität > 60%
Labor 5	1. Tail Length signifikant gegenüber bestrahlter Vehikelkontrolle erhöht 2. rel. Viabilität > 60%
Labor 6	1. Tail Length: Faktor 1,4 über bestrahlter Vehikelkontrolle 2. rel. Viabilität > 60%
Labor 7	1. Tail Length: Faktor 2 über bestrahlter Vehikelkontrolle 2. rel. Viabilität > 60%

Grafische Darstellungen der Ergebnisse für die Ringstudien-Untersuchungen im Photo-Cometassay sind in der Anlage 1, in den Abbildungen 35 – 47 zu finden.

II.1.3.3.1. 8-Methoxypsoralen

8-Methoxypsoralen (8-MOP) wurde in vier Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 35 (Anl. 1) zeigen, dass 8-MOP nach UV-Bestrahlung in allen Untersuchungen zu einem negativen Ergebnis führt. Dieses „falsch negative“ Ergebnis lässt sich anhand der DNA-DNA-Crosslinking-Eigenschaften von 8-MOP erklären. Unter UV-Bestrahlung wird 8-MOP aktiviert und vernetzt die beiden DNA-Einzelstränge. Das methodische Prinzip des Cometassays basiert auf der Wanderung von DNA-Einzelsträngen im elektrischen Feld. Eine Vernetzung von DNA-Einzelsträngen verhindert dementsprechend diese Wanderung. Dies führt zu einer Tail length, die der der bestrahlten Vehikelkontrolle entspricht oder sogar darunter liegen kann. Somit ist die vernetzende Eigenschaft von 8-MOP unter UV-Bestrahlung in allen

Labors korrekt erfasst worden. Schlußfolgernd ist der Photo-Cometassay ungeeignet, den photogenotoxischen Effekt von 8-MOP nachzuweisen auf Grund der spezifischen DNA-DNA vernetzenden Eigenschaften der Substanz unter UV-Bestrahlung.

II.1.3.3.2. Chlorpromazin

Das photogenotoxische Potenzial von Chlorpromazin wurde in fünf Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 36 (Anl. 1) zeigen, dass Chlorpromazin nach UV-Bestrahlung die DNA-Einzelstrangbruchrate in allen Untersuchungen deutlich erhöht. Es ist durchgängig in allen Labors eine dosisabhängige Steigerung der Tail length zu beobachten. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induzierte Chlorpromazin in V79-Zellen keinen signifikanten Anstieg der DNA-Einzelstrangbruchrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Chlorpromazin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Experimente aller fünf Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.3.3. Lomefloxacin

Das photogenotoxische Potenzial von Lomefloxacin wurde in drei Labors im Photo-Cometassay untersucht, wobei von einem Labor Daten von nur einem Run vorliegen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 (Anl. 1) gezeigt. Lomefloxacin induzierte nach UV-Bestrahlung in allen 5 ausgewerteten Experimenten keinen photogenotoxischen Effekt. Ohne UV-Bestrahlung induzierte Lomefloxacin kein positives Ergebnis. Bezogen auf die Klassifizierung von Lomefloxacin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen 5 Experimente ein falsches (negatives) Ergebnis.

II.1.3.3.4. Ciprofloxacin

Das photogenotoxische Potenzial von Ciprofloxacin wurde in zwei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 38 (Anl. 1) zeigen, dass Ciprofloxacin nach UV-Bestrahlung die DNA-Einzelstrangbruchrate in allen 4 Experimenten deutlich erhöht; die Daten weisen eine sehr gute Reproduzierbarkeit in den Wiederholungsexperimenten der einzelnen Labors auf. Die Werte der Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Ciprofloxacin keine DNA-Einzelstrangbrüche. Bezogen auf die Klassifizierung von Ciprofloxacin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Experimente beider Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.3.5. Methylen Blau

Methylen Blau wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 39 (Anl. 1) zeigen, dass Methylen Blau nach UV-Bestrahlung in 4 von 6 Experimenten einen positiven Befund induziert. In zwei Labors wurde jeweils ein Experiment als positiv und ein Experiment als negativ bewertet. Die beiden als negativ bewerteten Experimente weisen ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Tail length auf, aber erst bei einer parallelen Zytotoxizität, die einer Zell-Viabilität unter 60% entspricht. Daher wurden diese Werte nicht für die Bewertung der Photogenotoxizität herangezogen. Die Werte der Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Methylen Blau keine DNA-Einzelstrangbrüche. Bezogen auf die Klassifizierung von Methylen Blau als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Experimente aller drei Labors im Prinzip ein richtiges (positives) Ergebnis; das negative Ergebnis in zwei Runs ist auf Grund der Grenzziehung anhand von Zytotoxizität erklärbar.

II.1.3.3.6. Proflavin

Das photogenotoxische Potenzial von Proflavin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 40 (Anl. 1) zeigen, dass alle 6 Runs mit Proflavin die Kriterien für einen positiven Photogenotoxizitäts-Befund erfüllen. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen liegen im

normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induzierte Proflavin in V79-Zellen keine DNA-Einzelstrangbrüche. Bezogen auf die Klassifizierung von Proflavin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Experimente der drei Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.3.7. Dacarbazin

Dacarbazin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 41 (Anl. 1) zeigen, dass Dacarbazin nach UV-Bestrahlung die DNA-Einzelstrangbruchrate in allen Untersuchungen extrem erhöht, es werden Tail length Werte von bis zu knapp 100 µm (bei einem Kontrollwert von ca. 50 µm) erreicht. Die Werte der Kontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Dacarbazin keine DNA-Einzelstrangbrüche. Bezogen auf die Klassifizierung von Dacarbazin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Experimente aller drei Labors ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.3.8. Doxycyclin

Doxycyclin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay untersucht. Für Doxycyclin ergibt sich ein uneinheitliches Bild. In einem Labor war Doxycyclin in beiden Experimenten positiv, in einem Labor in beiden Experimenten negativ, das dritte Labor hatte ein klar positives und ein klar negatives Experiment (Abb. 42 in Anl. 1). Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Vehikelkontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Doxycyclin keine DNA-Einzelstrangbrüche. Bezogen auf die Klassifizierung von Doxycyclin als photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen nur die Experimente von einem Labor ein richtiges (positives) Ergebnis.

II.1.3.3.9. Promazin

Promazin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay geprüft (Abb. 43 in Anl. 1). In zwei Labors wurden mit UV-bestrahltem Promazin in beiden Runs reproduziert photogenotoxische Effekte nachgewiesen. In einem Labor wurde ein Run wegen starker Zytotoxizität (rel. Viab. < 60%) als negativ und einer als positiv bewertet. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Vehikelkontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert Promazin keinen signifikanten Anstieg der DNA-Einzelstrangbruchrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Promazin als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse überwiegend eine falsch-positive Photogenotoxizität an.

II.1.3.3.10. Ketoprofen

Ketoprofen wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay geprüft (Abb. 44 in Anl. 1). In allen drei Labors wurde mit Ketoprofen nach UV-Bestrahlung reproduziert ein signifikanter Anstieg der DNA-Einzelstrangbruchrate beobachtet. Ohne UV-Bestrahlung induziert Ketoprofen keine DNA-Einzelstrangbrüche. Bezogen auf die Klassifizierung von Ketoprofen als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Experimente aller drei Labors ein falsches (positives) Ergebnis.

II.1.3.3.11. Acridin

Acridin wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay geprüft (Abb. 45 in Anl. 1). In Labor 3 wurde in 1 Experiment mit Acridin nach UV-Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der DNA-Einzelstrangbruchrate beobachtet. Alle anderen Experimente wurden als negativ bewertet, wobei im stark cytotoxischen Bereich in einigen Fällen auch ein Anstieg der DNA-Einzelstrangbruchrate zu beobachten war. Ohne UV-Bestrahlung induziert Acridin keinen signifikanten Anstieg der DNA-Einzelstrangbruchrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Acridin als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Experimente in einem Labor ein widersprüchliches und in zwei Labors ein richtiges (negatives) Ergebnis.

II.1.3.3.12. Octylmethoxycinnamat

Octylmethoxycinnamat (OMC) wurde in vier Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay geprüft (Abb. 46 in Anl. 1). Alle 8 Experimente wurden als negativ bewertet. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Vehikelkontrollen liegen im normalen Bereich. Ohne UV-Bestrahlung induziert OMC keinen signifikanten Anstieg der DNA-Einzelstrangbruchrate. Bezogen auf die Klassifizierung von Octylmethoxycinnamat als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Experimente in allen Labors ein richtiges (negatives) Ergebnis.

II.1.3.3.13. Titandioxid

Titandioxid wurde in drei Labors mit jeweils zwei unabhängigen Experimenten im Photo-Cometassay geprüft (Abb. 47 in Anl. 1). In allen Labors induzierte Titandioxid nach UV-Bestrahlung reproduzierbar keinen Anstieg der Tail length, das gleiche gilt ohne UV-Bestrahlung. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Vehikelkontrollen liegen im normalen Bereich. Bezogen auf die Klassifizierung von Titandioxid als nicht-photogenotoxische Substanz (siehe Tab. 1) zeigen die Ergebnisse aus drei Labors ein richtiges (negatives) Ergebnis.

II.1.3.3.14. Akkumulierte Kontrollwerte im Photo-Cometassay

Die im Zuge sämtlicher Ringstudienexperimente (bis zu 18 Experimente pro Labor) akkumulierten Werte der unbestrahlten und der UV-bestrahlten Vehikelkontrollen sowie der Positivkontrollen (UV-bestrahltes Chlorpromazin) sind in Abbildung 51 (Anl. 1) für jedes Labor in Form sog. Box-Whisker-Plots mit markiertem Median dargestellt. Der Mittelwert für die Tail Length der unbestrahlten V79-Zellen war wie folgt in aufsteigender Reihenfolge: Labor 4: 11,17 µm; Labor 7: 12,9 µm; Labor 1: 13,84 µm; Labor 3: 22,74; Labor 6: 25,15; Labor 2: 27,74. Die Bestrahlung der Zellen mit UV aber ohne Substanzbehandlung führte in allen Labors zu einer (der Forderung in der SOP entsprechenden) leichten Erhöhung der Tail Length Werte, die von Faktor 1,1, - 1,4 schwankte mit Ausnahme von Labor 4, bei dem die Tail Length im Mittel um Faktor 2,8 erhöht war nach Bestrahlung. Die Positivkontrolle Chlorpromazin in der mittleren Konzentration von 3 µg/ml zeigte den gewünschten klaren Effekt; im Mittel war die Tail Length 1,7 – 2,6-fach gegenüber der UV-Kontrolle erhöht, mit Ausnahme von Labor 4, das mit einer Konzentration von 1,5 µg/ml Chlorpromazin bereits eine Erhöhung um Faktor 3,5 erreichte. Die (als Reserve) nicht in allen Experimenten mitgeführte höhere Konzentration von Chlorpromazin zeigte eine weitere Steigerung des photogenotoxischen Effektes.

II.1.3.4. Zusammenfassung und Diskussion der Daten im Photo-Cometassay

Von den acht als photogenotoxisch klassifizierten Substanzen wurden im Photo-Cometassay vier einheitlich in allen Untersuchungen (insgesamt 26 Runs) richtig erkannt. Methylen Blau wurde in 2 von 6 Runs und Doxycyclin in 3 von 6 Runs nicht als photogenotoxisch erkannt. Lomefloxacin wurde in keinem Experiment (5 Runs) als photogenotoxisch eingestuft. Im Fall von Methylen Blau beruht dieses falsch-negative Ergebnis der Prüfung auf der Zytotoxizitätsgrenze von 60%, oberhalb derer Tail Length Werte nicht mehr zur Interpretation des Ergebnisses herangezogen wurden, in diesen beiden Experimente dort aber deutlich erhöht waren. Die Gesamtbeurteilung der Substanz wäre in beiden Labors aber auf Grund dieser Datenlage und dem klar positiven 2. Experiment gewesen, dass Methylen Blau als photogenotoxisch einzustufen ist. Für die schwankenden Ergebnisse bei Doxycyclin könnte die gleiche Erklärung gelten wie beim Photo-Mikrokerntest (s. II.1.3.5). Eine Erklärung für das negative Ergebnis von Lomefloxacin in allen Experimenten konnte nicht gefunden werden. Auffällig ist, dass parallel keine Photo-Zytotoxizität unter UV-Bestrahlung von Lomefloxacin induziert wurde, was ebenfalls völlig unerwartet ist und nicht den bisher in der Literatur beschriebenen Effekten von Lomefloxacin unter Bestrahlung entspricht.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass der Photo-Cometassay etablierte photogenotoxische (und photokanzerogene) Substanzen sensitiv und zuverlässig erfasst (weitere Details der biometrischen Auswertung unter II.3.1.6.), sieht man von dem Sonderfall 8-MOP ab. Für die Einstufung von DNA-DNA-Crosslinkern muß ein spezielles Protokoll verwendet werden, das hier eingesetzte Routineprotokoll ist ungeeignet, den Effekt von 8-MOP und anderen DNA-DNA-Crosslinkern nachzuweisen. Lomefloxacin wurde im Photo-Cometassay nicht als photogenotoxisch erkannt. Hier könnten eventuell weitere Protokollvarianten zur Erfassung des photogenotoxischen Effekts im Photo-Cometassay führen.

Tabelle 10: Übersicht der Gesamtergebnisse im Photo-Cometassay

	Einstufung photo- genotoxisch	Labor 1		Labor 2		Labor 3		Labor 5		Labor 6		Labor 7		Test- ergebnis	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	richtig	falsch
8-MOP	+	-	-			-	-	-	-			-	-	0	8
Chlorpromazin	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	10	0
Lomefloxacin	+			-	-					-	-	-		0	5
Ciprofloxacin	+	+	+							+	+			4	0
Methylen Blau	+	-	+			-	+			+	+			4	2
Proflavin	+	+	+			+	+			+	+			6	0
Dacarbazin	+	+	+	+	+							+	+	6	0
Doxycyclin	+			+	+	-	+			-	-			3	3
Promazin	-					+	+			+	+	-	+	1	5
Ketoprofen	-	+	+	+	+					+	+			0	6
Acridin	-	-	-			+	-					-	-	5	1
OMC	-	-	-			-	-	-	-	-	-			8	0
Titandioxid	-			-	-					-	-	-	-	6	0

Für die Gruppe der vor Studienbeginn als nicht-photogenotoxisch klassifizierten Testsubstanzen ist die Teilgruppe mit bekanntem phototoxischen Potential (Promazin, Ketoprofen, Acridin) besonders interessant. Für alle drei Substanzen konnte auch mittels Trypanblau-Färbung im Photo-Cometassay die Induktion von Photo-Cytotoxizität nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte Ketoprofen, das in allen Labors als positiv photogenotoxisch erfaßt wurde, die geringste Photo-Cytotoxizität. Neben dem eindeutig positiven Ergebnis für Ketoprofen zeigten Promazin und Acridin gemischte, d.h. positive und negative Resultate. Eine Labor-spezifische Zuordnung der Ergebnisse im Sinne einer überdurchschnittlichen (In-) Sensitivität eines einzelnen Labors ist auf Grund der geringen Datenlage nicht bestimmbar. Im Vorgängerprojekt wurden diese 3 Substanzen nicht im Photo-Cometassay getestet, daher liegen keine Vergleichsdaten vor.

Die beiden Substanzen, die als nicht-phototoxisch und nicht-photogenotoxisch klassifiziert sind, OMC und Titandioxid, konnten mit dem Photo-Cometassay klar als negativ eingestuft werden (jeweils kein abweichendes Experiment).

Intra- vs. Interlabor-Unterschiede

Eine Betrachtung der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse innerhalb eines jeden Labors zeigt, dass 36 von rund 42 Prüfungen im Photo-Cometassay qualitativ (positiv oder negativ) gleichartige Ergebnisse im ersten und zweiten Run ergeben haben. Widersprüchliche

Ergebnisse zeigten sich bei zwei als photogenotoxisch eingestuften Substanzen und bei 2 als photocytotoxisch aber nicht photogenotoxisch eingestuften Substanzen. Interessant ist, dass Intralabor- und Interlabor-Varianz auch beim Photo-Cometassay korrelieren und eine Erhöhung bei den selben Testsubstanzen (Methylenblau, Doxycyclin, Promazin, Acridin) aufzeigen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Unterschiede zwischen den Labors nicht als Folge einer unzureichenden Standardisierung der Testbedingungen angesehen werden können.

II.1.3.5. Vergleich der Testmodelle

In der Genotoxizitätsprüfung gibt es eine Vielzahl von Testmodellen, mit denen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Endpunkten analysiert werden kann. Die Auswahl der beiden in diesem Vorhaben untersuchten Testmodellen, Mikrokerntest und Cometassay, beruhte auf den Ergebnissen eines Vorläuferprojektes; andere, alternativ untersuchte Säugerzelltests erwiesen sich hierbei als weniger geeignet für die Prüfung der Photogenotoxizität.

Die im Cometassay nachgewiesenen DNA-Schäden umfassen DNA-Strangbrüche, Alkalilabile Stellen sowie DNA-DNA und DNA-Protein-Crosslinks. Crosslinks führen allerdings im Gegensatz zu den anderen Schadenstypen zu einer Stabilisierung der chromosomalen DNA und sind daher an Hand einer gegenüber Negativkontrolle reduzierten DNA-Migration erkennbar. Prinzipiell handelt es sich bei den im Cometassay nachgewiesenen Schadenstypen nicht um Mutationen (irreversible Veränderungen des genetischen Materials), sondern um primäre DNA-Läsionen, die durch zelluläre Reparaturprozesse zum Teil sehr schnell wieder beseitigt werden können. Dies hat zur Folge, dass die Analyse der DNA-Schädigungen im Cometassay unmittelbar nach Exposition gegenüber mutagenen Agenzien erfolgen sollte (entsprechend werden gemäß Protokoll des Vorhabens die Zellen sofort nach Behandlung präpariert), um so eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu stellt der Mikrokerntest eine Methode zum Nachweis von (azentrischen) Chromosomenbruchstücken dar; die prinzipiell mögliche Anwendung dieser Methode auch zum Nachweis von fehlverteilten ganzen Chromosomen als Folge von Schädigungen der Mitosespindel spielt im Rahmen der Photogenotoxizität keine Rolle. Die Entstehung von Mikrokerneln setzt eine zelluläre Prozessierung von primären DNA-Läsionen voraus, die i.d.R. die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen und strukturellen Chromosomenaberrationen einschließt und insbesondere des Durchlaufens einer Mitose bedarf, in der azentrische Chromosomenbruchstücke, d.h. solche ohne Zentromer (= Mitosespindelfaseransatzstelle) nicht auf die entstehenden Hauptkerne der Tochterzellen verteilt werden. In der nachfolgenden Interphase werden solche Bruchstücke von einer Kernmembran umschlossen und bilden die gut erkennbaren Mikrokerne. Dieser Entstehungsmechanismus der Mikrokerne hat für das Design des Testsystems zur Folge, dass (im Gegensatz zum Cometassay) zwischen Behandlung und Zellpräparation eine ausreichende Inkubationsdauer inklusive mindestens einer Zellteilung erfolgen muss, damit Mikrokerne nachweisbar werden.

Angesichts dieser fundamentalen Unterschiede zwischen Mikrokerntest und Cometassay in Bezug auf die untersuchten Endpunkte und erforderlichen Testverläufe kann erwartet werden, dass die Testsysteme mit unterschiedlicher Sensitivität auf Substanzen reagieren, die über verschiedene Mechanismen eine genotoxische Wirkung ausüben. Im Idealfall ergänzen sich die Endpunkte derart, dass ein möglichst breites Spektrum an genotoxischen Substanzen erfasst werden kann.

Von den acht als photogenotoxisch klassifizierten Substanzen wurden vier, nämlich Chlorpromazin, Ciprofloxazin, Proflavin und Dacarbazin in beiden Modellen einheitlich in allen Untersuchungen richtig erkannt. Gravierende Unterschiede zeigten sich für 8-MOP und Lomefloxazin, die in allen Untersuchungen des Photo-Cometassays negativ und des Photo-Mikrokerntests positiv waren. Für 8-MOP kann der Unterschied mit den Crosslinking-Eigenschaften der photoaktivierten Substanz erklärt werden. Solche Substanzen sind mit

dem Endpunkt Mikrokern sensitiv zu erfassen; im Cometassay ist die Wirkung von Crosslinkern dagegen – wie oben beschrieben – nicht mit einer verstärkten Ausbildung von Kometen korreliert, sondern im Gegenteil nur indirekt über eine Reduzierung der Kontrollwerte erkennbar. Die negativen Ergebnisse mit Lomefloxazin im Photo-Cometassay sind unerwartet, insbesondere angesichts der positiven Befunde im Photo-Cometassay mit dem strukturell sehr ähnlichen Gyrase-Hemmer Ciprofloxazin. Lomefloxazin ist hinsichtlich photogenotoxischer und photokanzerogener Eigenschaften experimentell ausreichend charakterisiert und diesbezüglich eindeutig als Positivsubstanz anzusehen. Die Befunde im Photo-Cometassay sind somit als falsch-negativ zu bewerten.

Doxycyclin zeigte in drei von sechs Runs im Photo-Cometassay ein negatives Ergebnis. Im Photo-Mikrokerntest wurden alle sechs Runs zwar als positiv gewertet, allerdings mit unerwartet geringer Effekthöhe. Wie in den mechanistischen Untersuchungen der Universität Mainz gezeigt wurde (s. Schlussbericht des entsprechenden Teilprojektes), dürfte die Ursache hierfür in einer Komplexbildung von Doxycyclin mit Calcium- und Magnesiumionen des verwendeten Kulturmediums liegen, die eine (teilweise) Ausfällung der Substanz bewirkt. In Vergleichsuntersuchungen mit Ca^{++} - und Mg^{++} -freiem Phosphatpuffer induzierte Doxycyclin drastisch höhere photogenotoxische Effekte. Untersuchungen mit Doxycyclin im Photo-Cometassay unter solchen (geeigneteren) Bedingungen liegen nicht vor. Beim Vergleich der Ergebnisse mit Doxycyclin ist auch zu beachten, dass drei der positiven Befunde im Mikrokerntest erst in Konzentrationen größer als 100 µg/ml auftraten und damit oberhalb der im Cometassay verwendeten maximalen Testkonzentration.

Mit der Positivsubstanz Methylen Blau wurden zwei von sechs Runs im Photo-Cometassay als negativ bewertet, im Vergleich zu einem negativen Run im Mikrokerntest. Die Bewertung als negativ im Cometassay trotz klaren Anstiegs der Tail Length beruht auf zu starker Zytotoxizität, d.h. Viabilitätslevels unterhalb von 60%. Wie im Schlussbericht des Teilprojektes der Universität Mainz ausführlich beschrieben, wird für Methylen Blau eine extrazelluläre photochemische Aktivierung mit der Bildung von H_2O_2 angenommen, da Methylen Blau auf Grund der negativen Ladungen nur in geringem Umfang in die Zellen gelangen dürfte. Diese Bedingungen der Bildung reaktiver Photoprodukte „fernab“ von der Kern-DNA könnten eine relative Begünstigung und Dominanz von photozytotoxischen vor photogenotoxischen Effekten zur Folge haben, was durch das Datenprofil im Photo-Cometassay (Anstieg der Tail Length im Bereich extrem geringer Viabilität) bestätigt zu sein scheint.

Für die Gruppe der vor Studienbeginn als nicht-photogenotoxisch klassifizierten Substanzen mit phototoxischen Eigenschaften (Promazin, Ketoprofen, Acidin) wurden in beiden Testmodellen sowohl positive als auch negative Befunde erzielt. Die hier vorliegenden Gesamtdaten deuten darauf hin, dass die Einstufung der genannten Substanzen als nicht-photogenotoxisch, die auf der Basis begrenzter Daten des Vorläuferprojektes beruhte, nicht gerechtfertigt erscheint. Das Datenprofil lässt eher darauf schliessen, dass es sich um Substanzen mit vorwiegend phototoxischen, aber auch schwach photogenotoxischen Eigenschaften handelt. Aus den mechanistischen Zusatzuntersuchungen ergibt sich zumindest für das genauer untersuchte Promazin, dass kein (durch die Phototoxizität vermittelter) falsch-positiver Ausgang der Photogenotoxizitätstests vorzuliegen scheint, sondern tatsächlich verschiedene Arten oxidativer DNA-Modifikationen gebildet werden und somit primäre Genotoxizitätsläsionen vorliegen. Eine definitive Bewertung der Einzelergebnisse als richtig (positiv oder negativ) oder falsch (positiv oder negativ) ist unter diesen Umständen nicht mit der nötigen Zuverlässigkeit möglich. Ergebnisse aus Tierstudien zur Photogenotoxizität oder aus Photokanzerogenitätsstudien an Nagern, die als Standard heran gezogen werden könnten, liegen für diese Substanzen nicht vor.

Deutliche Unterschiede im Ergebnisprofil zwischen Photo-Cometassay und -Mikrokerntest wurden für die beiden Substanzen, die als nicht-phototoxisch und nicht-photogenotoxisch klassifiziert sind, gefunden. OMC und Titandioxid waren in allen Untersuchungen mit insgesamt 14 Runs des Cometassays negativ, während im Mikrokerntest je drei Testläufe mit jeder Substanz positive Resultate zeigten. Basierend auf den Kenntnissen zur fehlenden Phototoxizität für beide Substanzen und den negativen Ergebnissen für OMC in der

Photokanzerogenitätsstudie an Nagern, sind die negativen Ergebnisse als richtig anzuerkennen. Mit sechs falsch-positiven Befunden lässt der Photo-Mikrokerntest demnach hier eine Übersensitivität bzw. geringe Spezifität erkennen.

Die Gesamtergebnisse der Ringstudie lassen ein abschliessendes Urteil zur Eignung der untersuchten Testmodelle für die Photogenotoxizitätsprüfung bzw. ob eines der beiden Testmodelle für diese Zwecke zu präferieren wäre, zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zu. Bezüglich Protokolltransfer und Praktikabilität können beide Tests auch für eine breite Anwendung in der Routineprüfung als grundsätzlich geeignet angesehen werden. Als gravierendes Problem erweist sich jedoch das Fehlen einer genügenden Anzahl gut etablierter Standardsubstanzen mit abgesicherten Datenprofilen, die eine verlässliche Einordnung von Versuchsergebnissen als richtig oder falsch erlaubt. Auf der Basis der hier untersuchten, sehr begrenzten Anzahl von brauchbaren Standardsubstanzen lässt sich in Ansätzen erkennen, dass die Tests über eine hohe Sensitivität zur Erfassung potenziell photogenotoxischer Substanzen verfügen. Für die Beurteilung der Spezifität liegen mit nur zwei untersuchten Negativsubstanzen zu wenig Daten für eine Bewertung vor. Dessen ungeachtet liefern die Daten der Ringstudie nützliche Informationen für Teilaspekte der Validierung der Testmodelle, insbesondere in Bezug auf die Bewertung der von ECVAM definierten Module *Test definition*, *Within-laboratory variability*, *Transferability*, *Between-laboratory variability* (Hartung et al. 2004). Die Bewertung der Daten im Rahmen eines Reviewprozesses durch eine unabhängige Validation Management Group muss darüber entscheiden, ob und welche weiteren Arbeiten zur Komplettierung der Gesamtvalidierung erforderlich sein werden.

II.1.3.6. Datenerfassung und biometrische Auswertung (Unterauftrag ZEBET)

II.1.3.6.1. Erfassung der Daten

Zu Beginn der Studie wurde festgelegt, welche Informationen von jedem Labor in die Datenblätter aufzunehmen sind. Es wurden dann standardisierte Spreadsheets entwickelt. Dies geschah auf Basis von MS EXCEL, da EXCEL in allen Laboratorien vorhanden und die Nutzung vertraut war. Die beiden Testsysteme, PMNT und PCA, stellten sehr unterschiedliche Ansprüche an die Form und den Umfang der Dateneingabe.

Kleine Variationen gab es auch zwischen der Datenaufnahme der Vorversuche und der Hauptversuche. In den Vorversuchen wurden die Tests jeweils an einer Positiv- und einer Negativ-Substanz durchgeführt und die Ergebnisse direkt verglichen. Im Hauptversuch wurde mit den codierten Testchemikalien gearbeitet und jeweils Positivkontrollen (PC) mitgeführt.

Weiterhin wurden in beiden Fällen als erstes Rangefinder-Experimente zum Erfassen der zytotoxischen Bereiche durchgeführt, die jeweils auch eine etwas unterschiedliche Struktur bei der Versuchsdurchführung und Datenaufnahme verlangten. Beispielhaft sind für die Hauptversuche beider Testsysteme für eine Substanz in einem Labor die ausgefüllten Spreadsheets angefügt (Abb. 56-59 in Anl. 1).

Da die Spreadsheets geschützt waren, konnten die Laboratorien nur an den gekennzeichneten Stellen die entsprechenden Werte eintragen. In Anlehnung an Prinzipien der Guten Labor Praxis (GLP) wurde die Dateneingabe systematisiert und vereinheitlicht. Die Erfassung der Rohdaten wurde soweit möglich automatisiert, um die Fehlerrate zu minimieren. Durch eine automatische Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven mit Standardabweichung konnten die Laboratorien sofort die Qualität ihrer Versuche bzw. teilweise auch Fehler bei der Eingabe erkennen (Plausibilitätskontrolle).

II.1.3.6.2. Kontrolle der Datenqualität

Die Übermittlung der Spreadsheets erfolgte elektronisch. Darüber hinaus fertigten die Laboratorien einen Ausdruck an und bestätigten mit ihrer Unterschrift die Richtigkeit der Daten. Die Plausibilität und Konsistenz der Daten wurde anhand der gemessenen Konzen-

trationen, der Einhaltung der Akzeptanzkriterien und der (Daten-)Struktur überprüft, sowie die Übereinstimmung der Ausdrücke mit den gesendeten Spreadsheets verglichen. Bevor die abschließende Auswertung durchgeführt wurde, mussten die Laboratorien weiterhin die verdichteten Daten mit ihren eigenen Ergebnissen überprüfen, um eine korrekte Auswertung sicherzustellen.

II.1.3.6.3. Berechnung potenzieller Endpunkte

Zur Beschreibung der *Zytotoxizität* beim **PMNT** wurde die Anzahl der 1er, 2er, 3-4er und 5-Zellhaufen eingegeben und daraus der Proliferationsindex (PI) berechnet (s. SOP PMNT in Anlage 2), sowie die prozentuale Häufigkeit der aufgefundenen Mitosen (MI) (Mitoseindex) bestimmt. Als Maßzahl für die *Genotoxizität* wurde die Gesamtrate Micronuclei-haltiger Zellen in Prozent (% MN) ermittelt. Dafür wurden die Anzahl Zellen mit 1, 2 oder 3 bis 5 Micronuclei und die Gesamtzahl der untersuchten Zellen eingegeben (s. Spreadsheet in Abb. 56, Anl. 1). Pro wiederholtem Test (Run) wurde der Versuch an jeweils zwei parallelen Zellkulturen pro Kontrollen und Konzentrationspunkt durchgeführt und getrennt ausgewertet. Diese Einzelwerte aus zwei Parallelkulturen wurden zusammengefasst und daraus die Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt.

Im **PCA** wurden zur Beschreibung der *Zytotoxizität* die Anzahl der lebenden und toten Zellen ermittelt (Neubauer Kammer) und eingegeben. Daraus errechneten sich als Maßzahlen die Gesamtzahl lebender Zellen und die Überlebensrate (= viability) (s. Spreadsheet in Abb. 58, Anl. 1). Zur Beschreibung der *Genotoxizität* wurden pro Objektträger für 50 Kometen die Head- und Tail-Length, die Head- und Tail-Intensity, der Tail-Moment, die Total-Area und die Total-Intensity bestimmt und diese Werte aus dem Ermittlungsprogramm ins Spreadsheet übertragen. Dort wurden die Einzeldaten zusammengefasst und mit dem Mittelwert und der Standardabweichung für die Tail_Length (TL), den Tail-Moment (TM) und die Tail-Intensity (TI) weitergearbeitet (s. Spreadsheet in Abb. 57, Anl. 1). Auch hier wurden pro Run zwei Parallelexperimente durchgeführt und die gemittelten Ergebnisse zur weiteren Analyse verwendet.

Nach der Begutachtung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für alle Parameter, erfolgte der Versuch, sie mit Hilfe verdichteter Endpunkte geeignet zu beschreiben. In der Abbildung 1 ist für den PMNT (a) und den PCA (b) anhand typischer Konzentrations-Wirkungs-Kurven exemplarisch dargestellt, wie einige der Parameter ausgewählt wurden. Neben den Absolutwerten wurden für die ermittelten Parameter auch die relativen Werte zur Vehikelkontrolle (% zu VC) bestimmt (s. Tabelle 12 und 13).

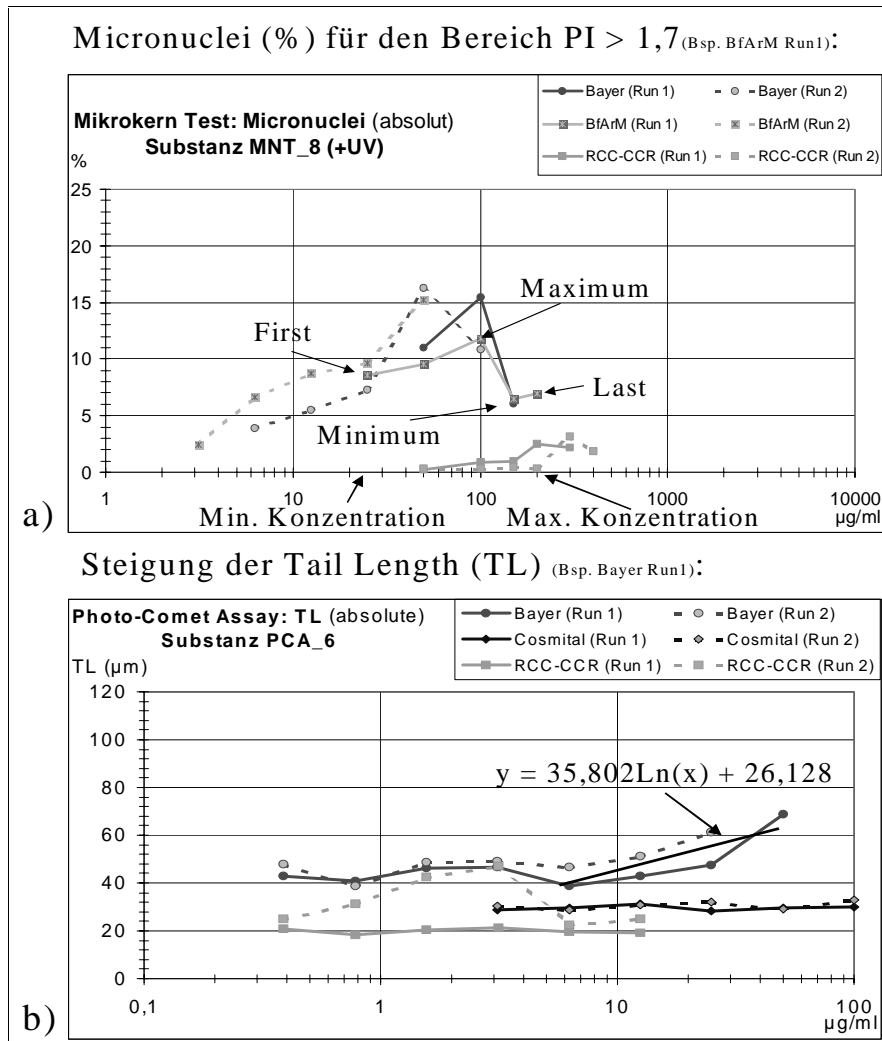


Abb. 1: Typische Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den PMNT (a) und den PCA (b). Beispielhaft wird die Bestimmung einiger verdichteter Endpunkte zu ihrer Beschreibung gezeigt: a) Anzahl MN des ersten und letzten Wertes, sowie Min. und Max. der MN und der Konzentrationen im Akzeptanzbereich; b) Parameter einer Regression (halb-logarithmisch) im Steigungsbereich bei der TL

II. 1.3.6.4. Überprüfung auf Ausreißer und Intra- und Interlaborvergleich

Die Überprüfung der Testergebnisse auf mögliche Ausreißer, sowie die erste Beurteilung der Intra- und Interlaborvarianz erfolgte mit Hilfe des Box-Whisker-Plots. In dieser Darstellung können auf einen Blick ausgewählte Lage und Streuungsmaße unabhängig von der Verteilungsform für verschiedene Gruppen miteinander verglichen werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 2 aufgeführt.

Die „Box“ repräsentiert den Interquartilsbereich (IQR = $q_{75} - q_{25}$), d.h. den Bereich, indem die mittleren 50% der Messwerte liegen. Der Querstrich gibt den Median ($Z = q_{50}$) an, der die Mitte repräsentiert, d.h. 50% der Werte liegen ober- bzw. unterhalb. Die „Whisker“ (= Schnurrhaare) verbinden die äußersten Werte, den kleinsten bzw. größten Wert, mit der 25%- bzw. 75%-Quartile (q_{25} bzw. q_{75}), d.h. die Werte unterhalb derer 25% bzw. 75% der Messwerte liegen. Für eine sinnvolle Interpretation ist aber eine Mindestanzahl an Werten notwendig.

Es gibt verschiedene Varianten dieser Grafik. In dem von SPSS, Version 11.5, ausgegebenen Box-Plot, der hier verwendet wurde, werden alle Werte, deren Entfernung zu den Boxenenden zwischen der 1,5 bis 3fachen Boxlänge betragen, durch einen Kreis

gekennzeichnet und als Ausreißer bezeichnet. Noch weiter außerhalb liegende Werte werden in Form eines Sternes (*) ausgegeben und gelten als Extremwerte. Die Begriffe Ausreißer und Extremwerte werden beschreibend verwendet, eine statistische Absicherung erfolgt nicht.

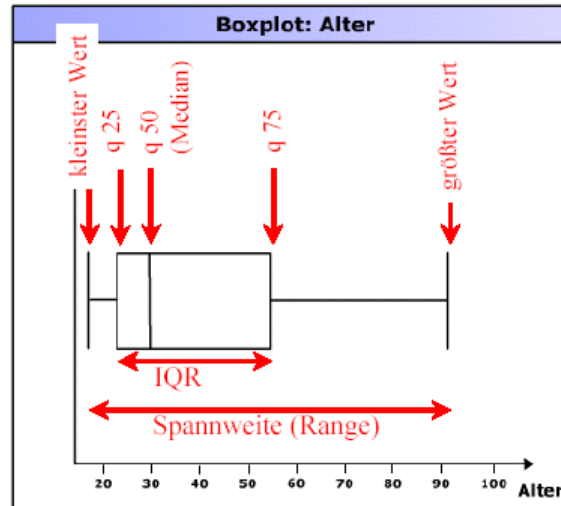


Abb. 2: Beispiel für einen Box-Whisker-Plot.

In den Abbildungen 49 und 50 (PMNT) sowie 51 (PCA) (Anlage 1) wird für die Kontrollwerte, d.h. der unbestrahlten und bestrahlten Vehikelkontrolle (C(-UV), C(+UV)) und einzelner Konzentrationen der Positivkontrolle (PC), exemplarisch für den jeweils wichtigsten Parameter der beiden Testsysteme die Streuungen innerhalb und zwischen den Laboratorien dargestellt. Nur in diesen Fällen ist die Anzahl vorhandener Werte (meist) ausreichend. Die Gruppierung erfolgt dabei einmal nach Laboratorien und einmal nach Behandlungen.

Beim Vergleich der Kontrollwerte ist sowohl beim PMNT (Abb. 49) als auch beim PCA (Abb. 51) zu sehen, dass die Verteilungen (Intralaborvarianzen) in den einzelnen Labors sehr unterschiedlich ist. Für den PMNT ist klar zu erkennen, dass in allen Kontrollstufen die Anzahl der MN im Labor 3 sehr niedrig war, in den Laboratorien 2 und 4 auf dem gleichen, hohen Niveau und in Labor 1 dazwischen lagen. Die Streuung ist für alle Laboratorien am geringsten bei der unbestrahlten Variante (C(-UV)). Sie steigt bei der bestrahlten Kontrolle (C(+UV)) und ist am höchsten bei den bestrahlten Positivkontrollen (PC x). Beim PCA zeigen sich auch Interlaborunterschiede, doch lässt sich kein einheitliches Bild erkennen. Zwar steigt bei der Tail Length (TL) auch der Level mit der Behandlung, doch vermengen sich die Unterschiede innerhalb und zwischen den Laboratorien. Die in diesen Darstellungen für beide Tests gefundenen Lageunterschiede zeigen auf, dass sich das Arbeitslevel zwischen den Laboratorien unterscheidet, Interlaborvarianzen sind gegeben.

Eine varianzanalytische Auswertung, die homogene Varianzen voraussetzt, zur Bewertung der Intra- und Interlaborvarianz ist problematisch. Auch eine statistische Absicherung der Ausreißer ist wegen dieser Inhomogenitäten und einer häufig unzureichenden Anzahl an Werten nicht sinnvoll und aussagefähig.

Eine rechnerische Abschätzung der Intra- und Interlaborvarianz erfolgte nach Din-ISO 5725-2 (1991) mit Hilfe des Variationskoeffizienten $s_r\%$ für die Intra- und $s_L\%$ für die Interlaborstreuung (s. Tab. 11).

Tab. 11: Maßzahlen der Intra- und Interlaborvarianzen für ausgesuchte Parameter des PMNT (a) und PCA (b).

a) PMNT						
	MN			PI		
	Mean	% s _r	% s _L	Mean	% s _r	% s _L
C (-UV)	0,52	42,9	57,3	3,00	5,0	10,4
C (+UV)	1,52	45,3	65,8	2,83	5,2	8,6
PC 0,3	6,06	32,4	59,9	2,38	7,6	7,9
PC 0,6	6,99	29,1	64,4	2,09	10,6	9,2

b) PCA						
	TL			rel. viab.		
	Mean	% s _r	% s _L	Mean	% s _r	% s _L
C (-UV)	18,92	19,3	35,5	100,00	-	-
C (+UV)	26,35	20,2	31,6	100,00	-	-
PC 0,75	72,21	14,9	84,1	89,99	34,7	18,7
PC 1,5	55,05	20,2	45,6	101,93	26,0	8,6
PC 3	62,27	17,1	23,0	103,80	20,7	13,4
PC 6	67,47	13,4	22,6	84,09	22,7	18,5

Für die Konzentrationswirkungskurven kann nur eine – sehr grobe – Beurteilung der Intra- und Interlaborunterschiede anhand der Übersichten in den Abbildungen 52 und 53 (Anlage 1) erfolgen. Die Kurvenverläufe zeigen für die MN (PMNT) (etwas) größere Unterschiede innerhalb und zwischen den Laboratorien während sie bei der TL (PCA) insgesamt übereinstimmender verlaufen.

II.1.3.6.5. Berechnung von Prädiktionsmodellen

Ein Prädiktionsmodell (PM) soll anhand der Ergebnisse eines in vitro Tests das toxische oder, wie in diesem Fall, mutagene Potential einer Prüfsubstanzen vorhersagen können. Als erster Schritt zur Entwicklung solcher Modelle wurden bei beiden Testverfahren für alle dreizehn Testchemikalien Konzentrations-Wirkungs-Kurven aller aufgenommenen Parameter erstellt, um typische Kurvenverläufe zu unterscheiden und potentielle Endpunkte zu identifizieren. Im Rahmen der regelmäßigen Treffen wurde dann diskutiert, wie die Ergebnisse zu beurteilen und wie Bewertungskriterien festzulegen sind, um das photomutagene Potential richtig zu klassifizieren.

Es wurden auf zwei verschiedenen Wegen versucht, geeignete PM's zu entwickeln:

Empirische Prädiktionsmodelle

Jedes Labor entwickelte auf Basis seiner vorliegenden Ergebnisse und Erfahrungen für beide Tests spezifische Prädiktionsmodelle. Diese sind in Tabelle 5 für den PMNT in Tabelle 9 für den PCA mit ihren Regeln aufgeführt. Damit eine Chemikalie als photogenotoxisch (+) eingestuft wird, müssen jeweils alle aufgestellten Kriterien erfüllt sein („und“-Verknüpfung). Für den PMNT wurde die Anzahl Micronuclei (MN) als Grundlage dieser PM's gewählt. Beim PCA wurden die TL und die relative viability (rel. viab.) herangezogen. Für den TM und die TI hatte sich gezeigt, dass sie stark von der verwendeten Messeinrichtung abhängig waren, und sie erschienen daher für die Vergleiche weniger geeignet.

Biometrische Prädiktionsmodelle

Die Entwicklung eines allgemeingültigen PM wurde mit Hilfe statistischer Verfahren angegangen. Hier war die Diskriminanzanalyse die Methode der Wahl, da mit ihr eine Unterscheidung in Klassen – hier: photogenotoxisch (+) und nicht photogenotoxisch (-) - unter gleichzeitiger Berücksichtigung mehrerer Endpunkte möglich ist.

Um eine möglichst vollständige Trennung bzw. gute Qualität der Vorhersage zu erzielen, wurden alle verdichteten Endpunkte in die Analyse einbezogen. Diese sind in den Tabelle 12 (PMNT) und 13 (PCA) für die beiden Testsysteme aufgeführt. In einem schrittweisen Verfahren wurden dann die Endpunkte mit der höchsten Trennkraft identifiziert. Die erste ausgewählte Variable ist die, die allein die höchste signifikante Trennung erreicht. Die Analyse wird dann solange fortgesetzt und neue Variablen werden integriert, bis das Gesamtmodell optimiert ist und die bestmögliche Vorhersage erzielt wurde.

Tab. 12: Verdichtete Endpunkte zur Beschreibung der Ergebnisse des PMNT

mn_vc	Micronuclei (MN) (%) der Kontrolle (VC)
mi_vc	Mitoseindex (MI) (%) der Kontrolle (VC)
pi_vc	Proliferationsindex (PI) der Kontrolle (VC)
min_conc	Minimale Konzentration
lgmincon	Log10 der minimalen Konzentration
pi15_co	Konzentration ab der der PI unter den Wert 1,5 abfällt
lgcon_15	Log10 der Konzentration ab der der PI unter den Wert 1,5 abfällt
maxmn_15	Maximum der Micronuclei für den Bereich mit PI > 1,5
r_max_15	Maximum der Micronuclei (für PI > 1,5) % zu VC
minmn_15	Minimum der Micronuclei für den Bereich mit PI > 1,5
r_min_15	Minimum der Micronuclei (für PI > 1,5) % zu VC
fstmn_15	Erster Wert der MN für den Bereich PI > 1,5
anz_15	Anzahl Werte im Bereich PI > 1,5
lstmn_15	Letzter Wert der MN für den Bereich PI > 1,5
pi17_co	Konzentration ab der der PI unter den Wert 1,7 abfällt
lgcon_17	Log10 der Konzentration ab der der PI unter den Wert 1,7 abfällt
maxmn_17	Maximum der Micronuclei für den Bereich mit PI > 1,7
r_max_17	Maximum der Micronuclei (für PI > 1,7) % zu VC
minmn_17	Minimum der Micronuclei für den Bereich mit PI > 1,7
r_min_17	Minimum der Micronuclei (für PI > 1,7) % zu VC
fstmn_17	Erster Wert der MN für den Bereich PI > 1,7
anz_17	Anzahl Werte im Bereich PI > 1,7
lstmn_17	Letzter Wert der MN für den Bereich PI > 1,7
pi2_con	Konzentration ab der der PI unter den Wert 2 abfällt
lgcon_2	Log10 der Konzentration ab der der PI unter den Wert 2 abfällt
maxmn_2	Maximum der Micronuclei für den Bereich mit PI > 2
r_max_2	Maximum der Micronuclei (für PI > 2) % zu VC
minmn_2	Minimum der Micronuclei für den Bereich mit PI > 2
r_min_2	Minimum der Micronuclei (für PI > 2) % zu VC
fstmn_2	Erster Wert der MN für den Bereich PI > 2
anz_2	Anzahl Werte im Bereich PI > 2
lstmn_2	Letzter Wert der MN für den Bereich PI > 2
max_conc	Maximale Konzentration
lgmaxcon	Log10 der maximalen Konzentration
mutagen	0 = nicht photogenotoxisch, 1 = photogenotoxisch
mw_mn_vc	Mittelwert der Micronuclei der Kontrollen des Hauptversuchs („hist. MW“)
r_15_mw	Maximum der Micronuclei (PI > 1,5) % zur „hist. MW“
mw_mi_vc	Mittelwert des Mitoseindex der Kontrollen des Hauptversuchs („hist. MW“)
mw_pi_vc	Mittelwert des Proliferationsindex der Kontrollen des Hauptversuchs („hist. MW“)
labbeurt	Beurteilung der Photogenotoxizität durch die Laboratorien (0, 1)
min1_200	
pi2_mn1	PI > 2 und MN > 1 => 1 (= photogenotoxisch)
pi2_mn4	PI > 2 und MN > 4 => 1 (= photogenotoxisch)
pi2_mn5	PI > 2 und MN > 5 => 1 (= photogenotoxisch)
pi15_mn1	PI > 1,5 und MN > 1 => 1 (= photogenotoxisch)
pi15_mn4	PI > 1,5 und MN > 4 => 1 (= photogenotoxisch)
pi15_mn5	PI > 1,5 und MN > 5 => 1 (= photogenotoxisch)

Tab. 13: Verdichtete Endpunkte zur Beschreibung der Ergebnisse des PCA

ausw_125	Auswahl 1 (TL um Faktor 1,25 gg. VC erhöht, rel. Via> 60%)
ausw_140	Auswahl 2 (TL um Faktor 1,4 gg. VC erhöht, rel. Via> 60%)
ausw_150	Auswahl 3 (TL um Faktor 1,5 gg. VC erhöht, rel. Via> 60%)
ausw_200	Auswahl 4 (TL um Faktor 2 gg. VC erhöht, rel. Via> 60%)
min_conc	Minimale Konzentration
lgmincon	Log10 der minimalen Konzentration
max_conc	Maximale Konzentration
lgmaxcon	Log10 der maximalen Konzentration
vc_tl	Tail Length (TL) der Kontrolle (VC)
tl_max	Maximum der TL
r_tlmax	Maximum der TL % zu VC
tl_min	Minimum der TL
r_tlmin	Minimum der TL % zu VC
vc_ti	Tail Intensity (TI) der Kontrolle (VC)
ti_max	Maximum der TI
r_timax	Maximum der TI % zu VC
ti_min	Minimum der TI
r_timin	Minimum der TI % zu VC
vc_tm	Tail Moment (TM) der Kontrolle (VC)
tm_max	Maximum der TM
r_tmmax	Maximum der TM % zu VC
tm_min	Minimum der TM
r_tmmin	Minimum der TM % zu VC
vc_vc	Viable cells (vc) der Kontrolle (VC)
vc_first	Viable cells (vc) der niedrigsten gültigen Konzentration
vc_last	Viable cells (vc) der höchsten gültigen Konzentration
vc_via	Viability der Kontrolle (VC)
via_fst	Viability der niedrigsten gültigen Konzentration
via_lst	Viability der höchsten gültigen Konzentration
r_via_fs	Rel.Viability der niedrigsten gültigen Konzentration
r_via_ls	Rel.Viability der höchsten gültigen Konzentration
mw_vv_tl	mittlere Tail Length der Kontrollen der Vorversuche („hist. MW“)
mw_vc_tl	mittlere Tail Length der Kontrollen des Hauptversuchs („hist. MW“)
r_mw_tl	Maximum der TL % hist. MW (= VC des Hauptversuchs)
np_stei	Anzahl Punkte die in der Bestimmung der Steigung berücksichtigt wurden
ges_punk	Gesamtzahl (gültiger) Meßpunkte
b_abs	Steigung der Absolutwerte (e-Funktion)
b0_abs	Achsenabschnitt der Absolutwerte (e-Funktion)
b_pro	Steigung der relativen Werte (e-Funktion)
b0_pro	Achsenabschnitt der relativen Werte (e-Funktion)

Die Modellbestimmung erfolgte für jedes Testverfahren einmal mit einem Wert pro Testchemikalie, d.h. dem Mittelwert über alle Wiederholungen und Laboratorien, sodass dreizehn Werte beim PMNT und zwölf beim PCA (8-MOP, als Cross-Linker für Fehlklassifikationen bekannt, wurde ausgeschlossen) in die Analyse einbezogen wurden. Das andere Mal wurde je Labor und Substanz die Wiederholungen gemittelt und es ergaben sich 38 Werte für den PMNT und 32 für den PCA (wieder ohne 8-MOP).

Anschließend wurde bei den ermittelten Modellen die ausgewählte(n) Trennvariable(n) auf ihre fachlichen Relevanz und die Bedeutung ihrer Kombination überprüft. In einigen Fällen wurden daraufhin einzelne Variablen ausgeschlossen und die Analyse wiederholt. Vergleiche hierzu Tabelle x4, in der alle errechneten Modelle mit ihren Besonderheiten und Statistiken aufgeführt sind. Werden zu viele Trennvariablen in ein Modell einbezogen, so ist dies auch als ungünstig zu bewerten (s. PMNT 4).

Die statistischen Parameter Eigenwert, Signifikanz und Akkuranz der Klassifikation bieten einen Eindruck über die Qualität der Modelle. Der Eigenwert gibt dabei das Verhältnis der erklärten Streuung zur nicht erklärte Streuung an, d.h. bei Werten unter 1 ist die nicht

erklärte Streuung höher als die erklärte. Für ein akzeptables Modell sollte der Eigenwert möglichst groß sein, ein Eigenwert von 2 entspricht im vorliegenden Zwei-Klassen-Fall einem Bestimmtheitsmaß von 66,6% (Backhaus et al., 1996). Für die Akkuranz zur Beurteilung der Klassifikation aller Testwiederholungen ist neben ihrer Höhe auch noch ihre Bedeutung aufgeführt.

Insgesamt entspricht keines der ermittelten allgemeinen Modelle den Anforderungen an ein geeignetes Prädiktionsmodell. Folgende Ursachen lassen sich dafür aufzeigen: Zum einen ist die vorliegende Datenmenge (13 Testchemikalien) sehr gering, zumal – bekannte - Fehlklassifikationen auftreten. Zudem stellte sich heraus, dass bei einigen dieser Chemikalien die vorgegebenen Klassifikationen nicht eindeutig abgesichert sind. Auch die unterschiedlichen Arbeitslevel (Interlaborvariationen) wirkten hinderlich.

Die fachlich sinnvollsten Prädiktionsmodelle (PMNT 3 und PCA 2) werden beispielhaft evaluiert und die Ergebnisse im Anhang x, Seite ? dargestellt. Beim PMNT3 wurde als beste Trennvariable der *maximalen Wert der Micronuclei (im Bereich mit einem Proliferationsindex von über 1,5)* ermittelt. Mit einem Bestimmtheitsmaß von 56 % ist dieses Modell auch vom Erklärungsanteil akzeptabel. Im Modell PCA 3 werden zwei Trennvariablen, das *Maximum des Tail Moments* und die *Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Werte in % zur Vehikelkontrolle)* herausgefiltert. Hier liegt das Bestimmtheitsmaß bei 65%, doch erweist sich eine korrekte Zuordnung (Akkuranz) als problematisch.

Modell (Anzahl Werte; Besonderheiten)	Trennvariablen	Signifikanz	Eigenwert	% Akkuranz der Modellwerte	% Akkuranz aller Run's
PMNT 1 (ein Wert je Sub =>13; alle Endpunkte)	1.Min. MN für PI>2	0,03	1,366	92,3	63,8 ***
PMNT 2 (ein Wert je Sub =>13; Min. MN für PI>2 ausgeschlossen)	1.Max. MN für PI>1,5 2.Max. MN für PI>2; % zu VC	0,02	2,647	100	70,4 ***
PMNT 3 (ein Wert je Sub =>13; Min. MN für PI>2 und Max. MN für PI>2; % zu VC ausgeschlossen)	1.Max. MN für PI>1,5	0,03	1,287	100	72,6 ***
PMNT 4 (ein Wert je Sub und Lab => 38)	1.Max. MN für PI>1,5 2.Max. MN für PI>1,5; % hist. MW 3.Max. MN für PI>2; % zu VC 4.Min. MN für PI>2	0,000	1,759	89,5	79,3 ***
PCA 1 (ein Wert je Sub; ohne 8-MOP =>12)	1.Min. TL	0,012	0,933	83,3	58,6 n.s.
PCA 2 (ein Wert je Sub; ohne 8-MOP =>12; Min. TL ausgeschlossen)	1.Max. TM 2.Steigung der rel. Werte	0,008	1,893	91,7	58,1 n.s.
PCA 3 (ein Wert je Sub und Lab; ohne 8-MOP =>32)	1.Gesamtzahl Meßpunkte 2.Max. TL; % hist. MW	0,04	0,472	76,2	74,7 ***
PCA 4 (ein Wert je Sub und Lab; ohne 8-MOP =>32; Ges.zahl Meßpunkte ausgeschlossen)	1.Max. TM	0,13	0,234	66,7	73,4 ***

Tab 14: Zusammenstellung ausgegebener Modelle für den PMNT und PCA nach Diskriminanzanalyse; Grundlage ihrer Auswahl, sowie ausgewählte Trennvariablen und zugehörige Statistiken (* = hoch signifikant; n.s. = nicht signifikant).**

II.1.3.6.6. Evaluation der Prädiktionsmodelle

Liegt eine Bewertung der Ergebnisse anhand eines oder mehrerer Prädiktionsmodelle vor, ist die Beurteilung der Prädiktivität dieser Modelle notwendig.

Dazu eignet sich eine Kontingenztabelle, die die Beziehung zwischen zwei kategoriellen Variablen aufzeigt. Im vorliegenden Fall gibt die eine Variable die Einstufung der Substanzen, d.h. ihre „wahre“ Photogenotoxizität wieder und die zweite ihre Beurteilung anhand der Ergebnisse. Bei beiden Variablen wurden die zwei Kategorien „photogenotoxisch (+ bzw. 1)“ bzw. „nicht photogenotoxisch (- bzw. 0)“ unterschieden. Es wird die Häufigkeit der 2x2 (= 4) Kombinationen gezählt und diese mit ihren Erwartungswerten verglichen.

In Abbildung 3 ist ein Beispiel aufgeführt und aufgezeigt, wie aus den ermittelten Werten toxikologische Maßzahlen berechnet werden:

- Die **Sensitivität** gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine photogenotoxische Substanz richtig als positiv erkannt wird.
- Die **Spezifität** ist die Wahrscheinlichkeit, nicht photogenotoxische Stoffe richtig als negativ einzustufen.
- Die positive- und negative **Prädiktivität** gibt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Zuordnung der Positiv- bzw. Negativsubstanzen an.
- Mit der **Prävalenz** wird angegeben, wie unterschiedlich die Anteile der photogenotoxischen und nicht photogenotoxischen Substanzen in der Gesamtgruppe der Testsubstanzen waren. Idealerweise hat sie in der Testphase einen Wert nahe eins, d.h. die Verteilung ist ausgeglichen (ca. 1:1). Dies erhöht die Aussagekraft der Ergebnisse und erleichtert die Entwicklung eines allgemeinen Prädiktionsmodelles.

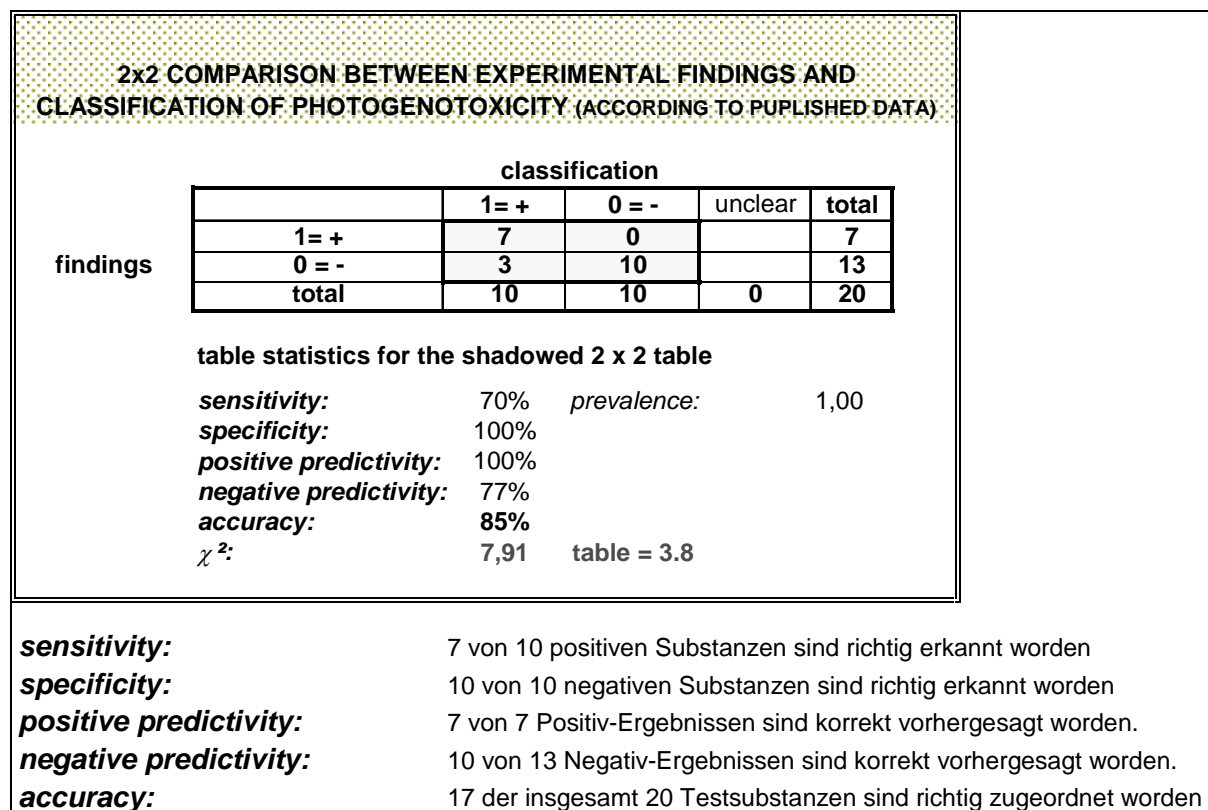


Abb. 3: Beispiel für eine 2x2 Kreuztabelle zur Evaluation eines PMs.

Über die Bedeutung der berechneten Werte gibt der Chi-Quadrat-Test Auskunft. Er überprüft die Homogenität der Verteilung für die vier Felder. Ist der χ^2 -Wert größer als der Tabellenwert 3,8, sind Unterschiede in der Verteilung signifikant ($\alpha = 5\%$) und damit die toxikologischen Maßzahlen sinnvoll interpretierbar.

Für die empirischen Prädiktionsmodelle sind die Ergebnisse der Evaluation in Abbildung 54 (Anlage 1) dargestellt. Als Beispiele für die biometrisch entwickelten Prädiktionsmodelle sind in der Abbildung 55 (Anl. 1) die Ergebnisse der Modelle PMNT 3 und PCA 2 aufgeführt. Beim PMNT sind die toxikologischen Maßzahlen Sensitivität und Spezifität für das Modell PMNT 2 im Vergleich zum empirischen Modell ausgeglichener, doch dafür ist die Akkuranz und Prädiktivität geringer (Abb. 54 und 55). Beim PCA lässt sich die Klassifikation der einzelnen Testwiederholungen durch das biometrische Modell PCA 2 nicht statistisch absichern, im Gegensatz zum empirischen Modell, dort erscheinen alle Maßzahlen relativ ausgewogen (Abb. 54 und 55).

Bei der Beurteilung ist zu beachten, dass die PM's auf den Daten der Lernstichprobe basieren und sie optimal auf diese Lernstichprobe angepasst wurden. Wenn neue Chemikalien getestet werden, ist davon auszugehen, dass die Güte der Vorhersage geringer ausfallen wird. Aus diesem Grund muss jedes neu entwickelte PM mit einem neuen Datensatz evaluiert werden. Erst dann kann eine abschließende Bewertung der in-vitro Tests und ihrer Prädiktionsmodelle erfolgen und Stärken und Schwächen herausgearbeitet werden.

Für die biometrische Auswertung verwendete Literatur:

Backhaus K., Erichson B., Plinke W. & Weiber R. Multivariate Analysemethoden. 8. Auflage, Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York London. 591 pp, 1996.

Bortz J. Statistik. 6. Auflage, Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York; 882 pp, 2005.

DIN ISO 5725-2 (1991): Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen; Teil 2: Ein grundlegendes Verfahren für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichspräzision von festgelegten Messverfahren; Entwurf. Beuth Verlag GmbH, Berlin.

Norušis M.J. SPSS Professional Statistics 6.1. Chicago, Illinois: SPSS Inc, 1994.

II.2. Voraussichtliche Nutzen

Die Ergebnisse des vorliegenden Verbundvorhabens und daraus abgeleitete Erkenntnisse sind geeignet, einen Beitrag zur Validierung der zwei untersuchten In-vitro-Modelle zur Photogenotoxizitätsprüfung zu leisten.

Das European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) hat kürzlich die Möglichkeit eines modularen Ansatzes für Testvalidierungen vorgeschlagen, um so eine höhere Flexibilität im komplexen Ablauf des Validierungsprozesses zu erreichen (Hartung et al. 2004). Demnach kann der Prozess der Testvalidierung in Einzelschritte (Module) unterteilt werden, deren Bearbeitung und Erreichung individuell erfolgen und evaluiert werden können. Für die Gesamtvalidierung sind folgende Module definiert:

- Test definition
- Within-laboratory variability
- Transferability
- Between-laboratory variability
- Predictive capacity
- Application domain
- Performance standards

Im Rahmen dieser Einteilung liefern die Ergebnisse des Vorhabens vor allem für die vier erstgenannten Module nützliche Informationen, und stünden einem Reviewprozess durch eine unabhängige Validation Management Group zur Verfügung. Umgekehrt könnten die fortgeschrittenen Erfahrungen bei der gegenwärtig unter der Leitung von ECVAM durchgeführten Aktivitäten zur retrospektiven Validierung des In-vitro-Mikrokerntestes für die Beurteilung der hier untersuchten „Photo-Variante“ des selben Testmodells von Nutzen sein.

Die kritische Bedeutung geeigneter (positiver und vor allem negativer) Referenzsubstanzen zur Etablierung und Überprüfung eines Prädiktionsmodelles ist in dem Vorhaben deutlich geworden. In Hinblick auf eine Fortführung der Validierungsbemühungen im Sinne der kompletten Bearbeitung der o.g. Module ist dieser Aspekt mit besonderer Dringlichkeit zu

prüfen. Nach Kenntnis des ZE sind die vorhandenen Literaturdaten nicht geeignet, ein adequates Set an Prüfsubstanzen zusammen zustellen, insbesondere wenn als Referenzstandard Ergebnisse aus In-vivo-Photokanzeogenitätsstudien heranzuziehen sind. Zugang zu unveröffentlichten Industriedaten (z.B. Kosmetikindustrie) könnten hier möglicherweise nützlich sein.

II.3. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

In Bezug auf die in diesem Projekt untersuchten In-vitro-Testmodelle sind uns während der Durchführung des Vorhabens keine Fortschritte bei anderen Stellen bekannt geworden.

II.4. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die Ergebnisse des Vorhabens wurden bzw. werden auf den folgenden internationalen Tagungen vorgestellt:

- Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society (EEMS), Kos, Greece, 02. – 07. Juli 2005:

P. Kasper et al.: Photo comet assay and photo micronucleus test in vitro: Contributions to the validation in a collaborative study.

- 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Berlin, 21. – 25. August 2005:

P. Kasper et al.: Assessment of the performance of in vitro photogenotoxicity assays: Results of a collaborative study with 13 coded test chemicals.

E. Schmidt et al.: A prevalidation of in vitro photo genotoxicity tests and the effort to find a useful statistical prediction model.

- 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, USA, 03. – 08. September 2005:

P. Kasper et al.: Photochemical genotoxicity testing in vitro: A European collaborative study on the comet assay and the micronucleus test.

Publikationen der Daten in einer Fachzeitschrift (Mutation Research) sind in Vorbereitung.

Literatur

- Brendler-Schwaab S.Y., Czich A., Epe B., Gocke E., Kaina B., Müller L., Pollet D. and Utesch D., Photochemical Genotoxicity: Principles and Test Methods. Report of a GUM task force. Reviews in Mutation Research, Mutation Res. 566, 65-91, 2004
- Bulera S.J., Theiss J.C., Festerling T.A., de la Iglesia F.A., In vitro photogenotoxic activity of ciprofloxacin: A paradigm predicting photocarcinogenicity, Toxicol Appl Pharmacol 156, 222-30, 1999.
- Chételat A.A., Albertini S., Dresch J.H., Strobel R., Gocke E., Photomutagenesis test development: I. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in bacterial and yeast assays, Mutat Res 292, 241-250, 1993a.
- Chételat A.A., Dresch J.H., Gocke E., Photomutagenesis test development: II. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in chromosomal aberration assays using CHO cells, Mutat Res 292, 251-258, 1993b.
- Chételat A.A., Albertini S., Gocke E., The photomutagenicity of fluoroquinolones in tests for gene mutation, chromosomal aberration, gene conversion and DNA breakage (Comet assay), Mutagenesis 11, 497-504, 1996.

- Dean S.W., Lande M., Dunmore R.H., Ruddock S.P., et al., Development of assays for the detection of photomutagenicity of chemicals during exposure to UV light. I. Assay development, *Mutagenesis* 6, 335-341, 1991.
- Galloway S.M., Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ Molec Mutagen* 35, 191-201, 2000.
- Gocke E., Albertini S., Chételat A.A., Kirchner S., et al., The photomutagenicity of fluoroquinolones and other drugs, *Toxicol Lett* 102-103, 375-381, 1998.
- Gocke E., Müller L., Guzzie P.J., Brendler-Schwaab S., Bulera S., Chignell C.F., Henderson L.M., Jacobs A., Murli H., Snyder R.D., Tanaka N., Considerations on photochemical genotoxicity: Report of the IWGTP working group, *Environ Molec Mutagen* 35, 173-184, 2000.
- Hartung, T., Bremer, S. Casati, S. et al., A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *ATLA* 32, 1-6, 2004.
- Kersten B., Zhang J., Brendler-Schwaab S.Y., Kasper P., Müller L., The application of the in vitro micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutat Res* 445, 55-71, 1999.
- Kersten B., Kasper P., Brendler-Schwaab S.Y., Müller L., Use of the photo-micronucleus assay in Chinese hamster V79 cells to study photochemical genotoxicity. *Mutat. Res.* 519, 49-66, 2002.
- Kirkland D., Müller, L., Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutat Res* 464, 137-148, 2000.
- OECD Guideline for testing of chemicals 432: "In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test".
- Snyder R.D. and Cooper C.S., Photogenotoxicity of fluoroquinolones in Chinese hamster V79 cells: dependency on active topoisomerase II., *Photochem Photobiol* 69, 288-293, 1999.
- Spielmann H., Brand M., Döring B., Holzhütter H.G., et al., EEC COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro* 8, 793-796, 1994.
- Spielmann H., Balls M., Dupuis J., Pape W.J., et al., The International EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: Results of phase II (blind trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test, *Toxicology in Vitro* 12, 305-327, 1998.
- Spielmann H., Müller L., Averbeck D. et al., The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. *ATLA* 28, 777-814, 2000.

ANLAGE 1: Abbildungen

- Abb. 1 - 2 : Photo-Mikrokerntest mit Chlorpromazin & Chlorhexidin (unkodiert)**
- Abb. 3 - 4 : Photo-Cometassay mit Chlorpromazin & Chlorhexidin (unkodiert)**
- Abb. 5 - 11 : Proliferationstest +/- UV (Rangefinder für Photo-Mikrokerntest)**
- Abb. 12 : Übersicht Gesamtergebnisse Rangefinder**
- Abb. 13 - 19 : Viabilitätsstest +/- UV (Rangefinder für Photo-Cometassay)**
- Abb. 20 - 32 : Photo-Mikrokerntest mit 13 Ringstudien-Substanzen**
- Abb. 33 : Korrelation Mikrokernraten/PIs**
- Abb. 34 : Übersicht Gesamtergebnisse Photo-Mikrokerntest**
- Abb. 35 - 47 : Photo-Cometassay mit 13 Ringstudien-Substanzen**
- Abb. 48 : Übersicht Gesamtergebnisse Photo-Cometassay**
- Abb. 49 - 51 : Box-Whisker-Plots für akkumulierte Kontrollwerte**
- Abb. 52 - 53 : Gesamtvergleich Photo-Mikrokerntest – Photo-Cometassay**
- Abb. 54 - 55 : 2 x 2-Kontingenztafeln – Evaluation d. Prädiktionsmodelle**
- Abb. 56 - 59 : Verwendete Spreadsheet-Formate f. d. Datenerfassung**

Abb. 1: Vorexperimente mit unkodierter Positivkontrolle. Ergebnisse aus fünf Labors mit **Chlorpromazin** im Photo-**Mikrokern**test. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

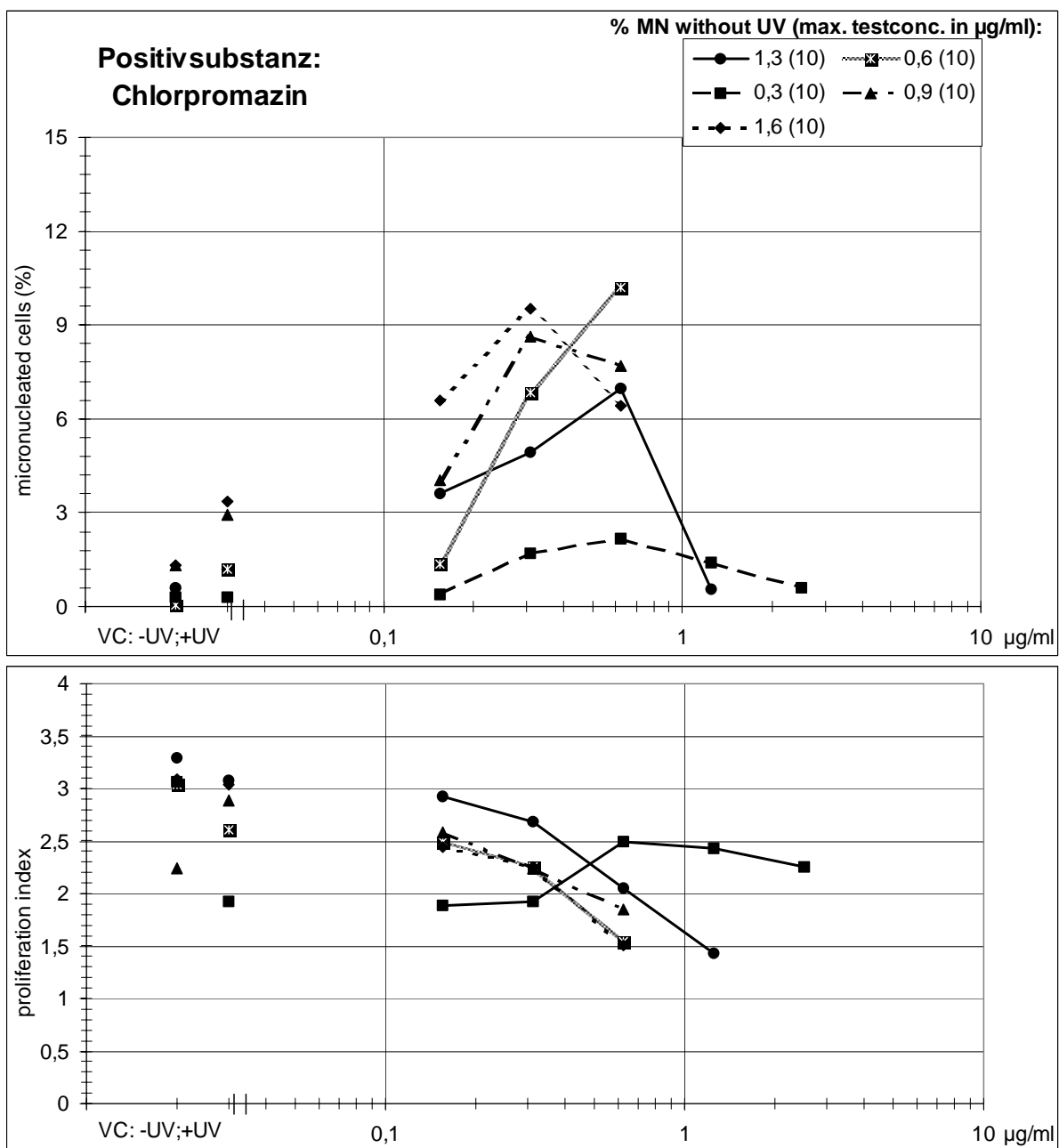


Abb. 2: Vorexperimente mit unkodierter Negativkontrolle. Ergebnisse aus fünf Labors mit **Chlorhexidin** im Photo-**Mikrokern**test. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

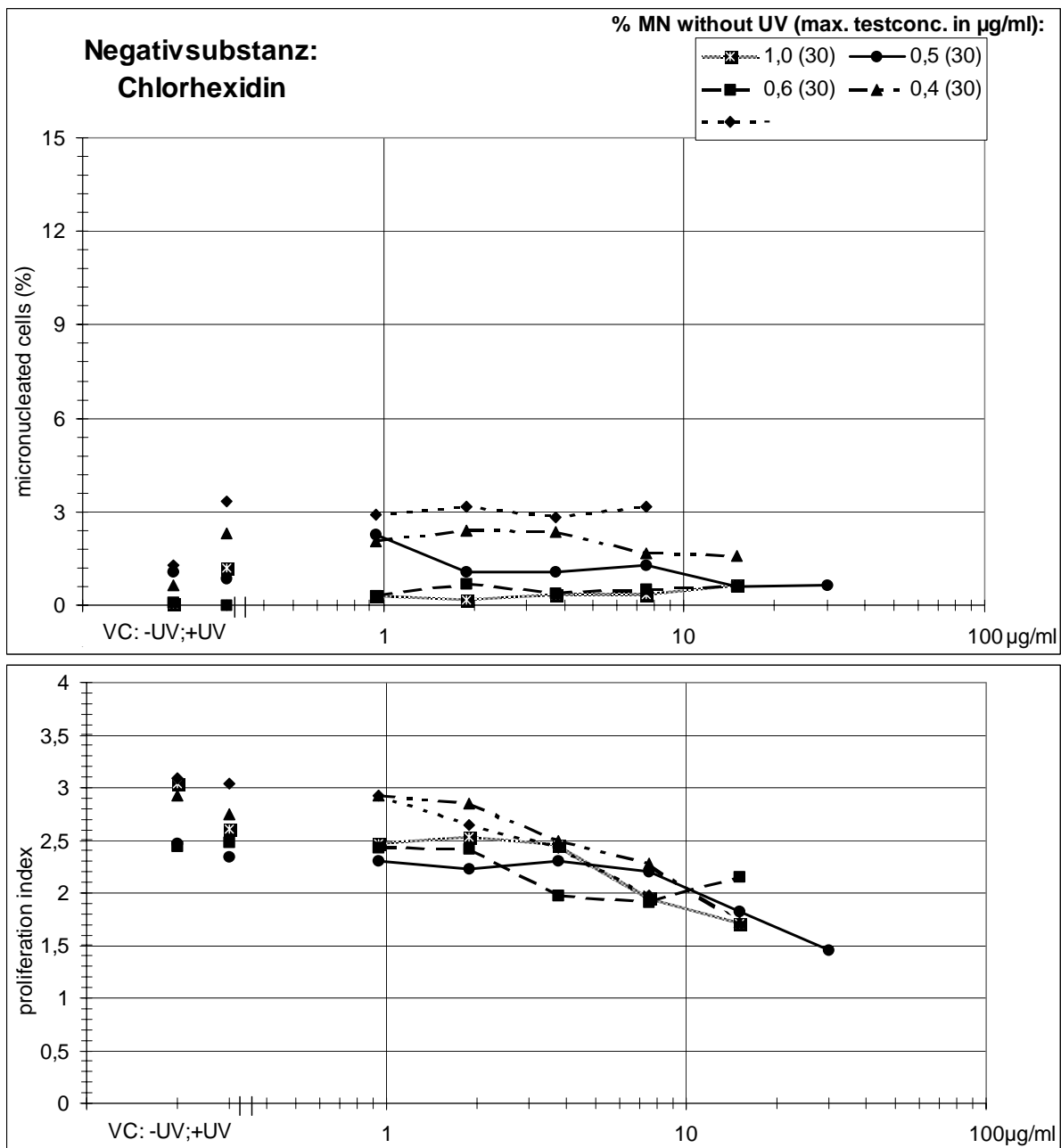


Abb. 3: Vorexperimente mit unkodierter Positivkontrolle. Ergebnisse aus fünf Labors mit **Chlorpromazin** im Photo-Cometassay. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

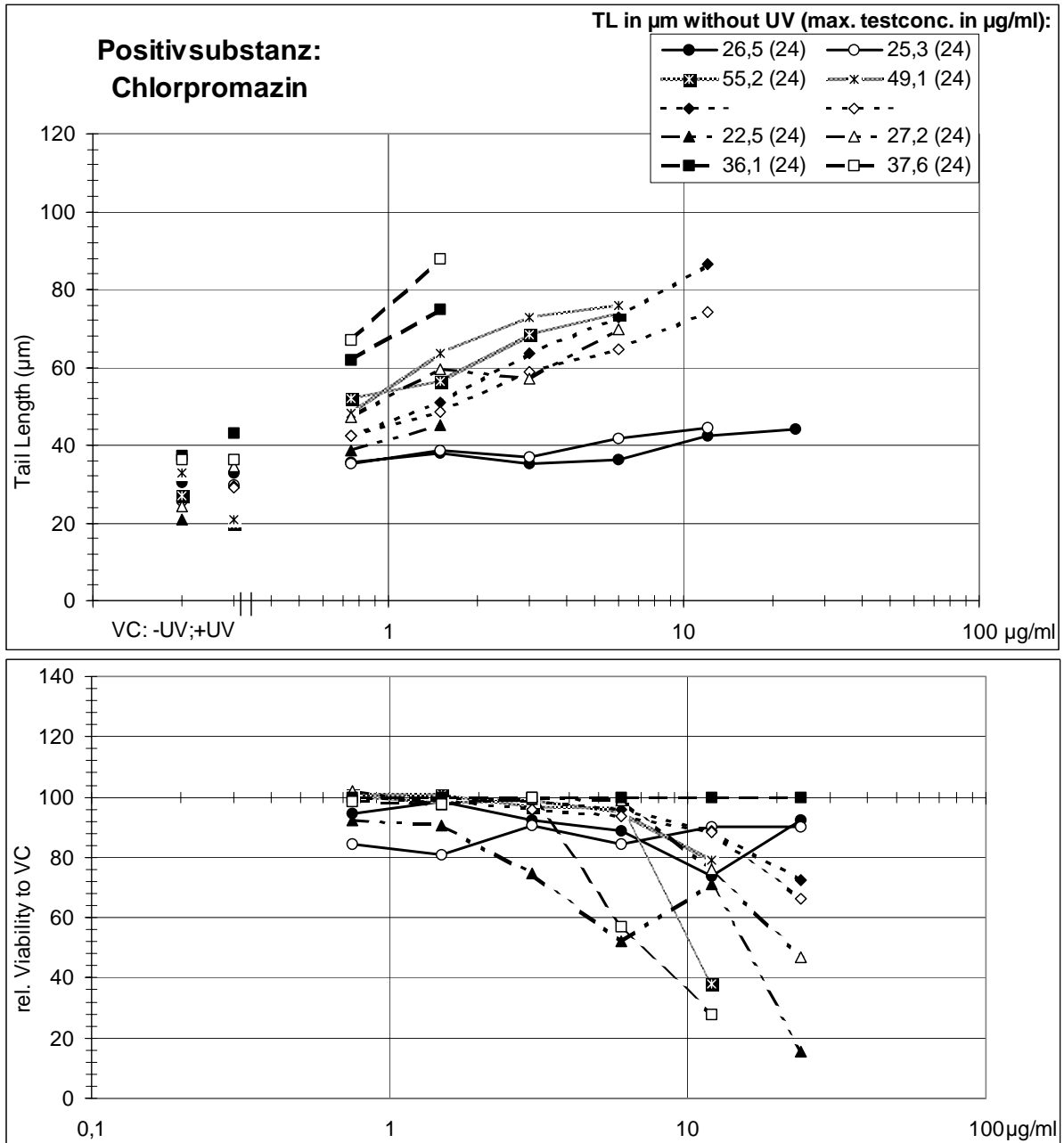


Abb. 4: Vorexperimente mit unkodierter Negativkontrolle. Ergebnisse aus fünf Labors mit **Chlorhexidin** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

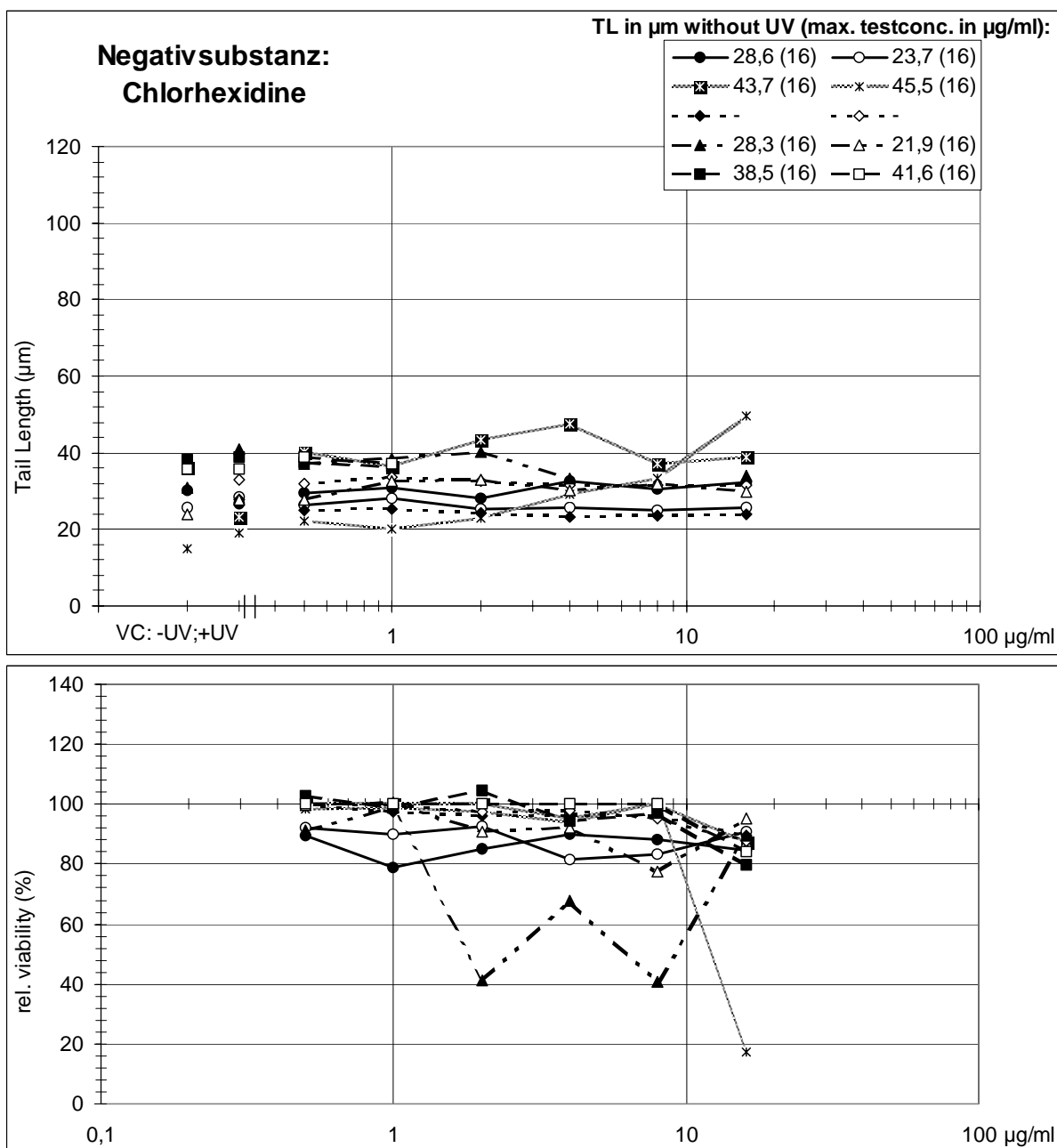


Abb. 5: Ergebnisse aus Untersuchungen im **Proliferationstest** für **8-Methoxypsoralen (8-MOP)** und **Chlorpromazin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Mikrokerntest.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung

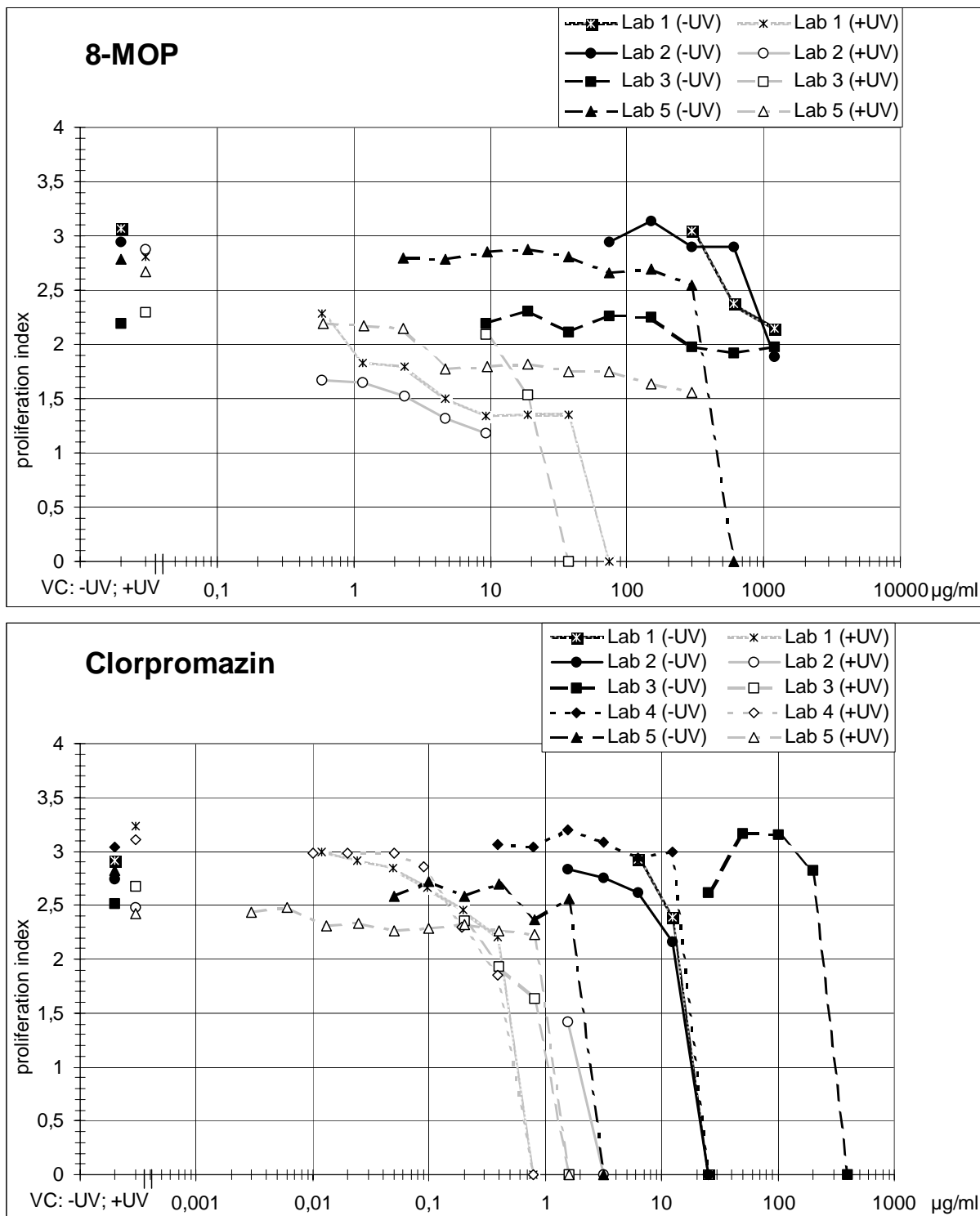


Abb. 6: Ergebnisse aus Untersuchungen im **Proliferationstest** für **Lomefloxazin** und **Ciprofloxazin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Mikrokerntest.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

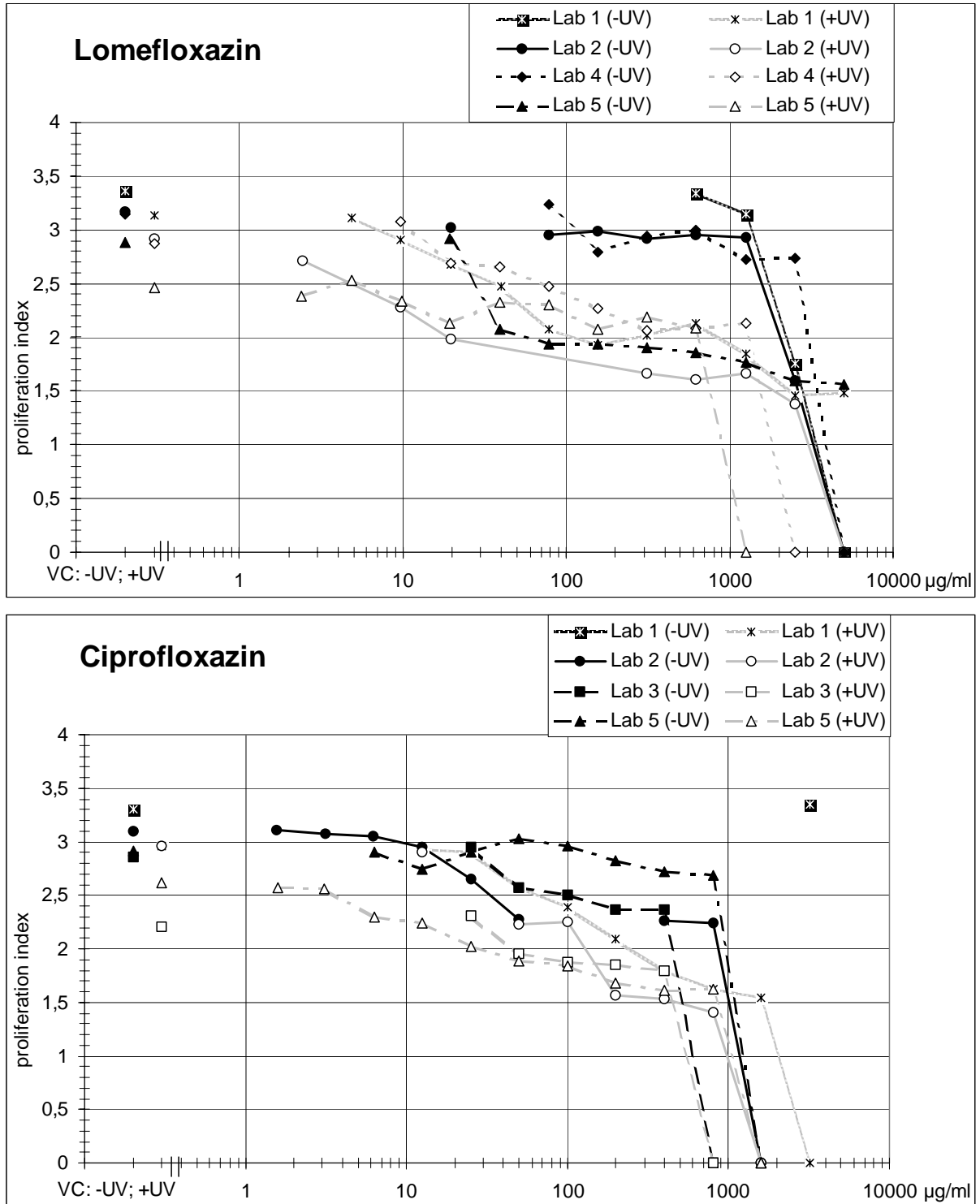


Abb. 7: Ergebnisse aus Untersuchungen im **Proliferationstest** für **Methylen Blau** und **Proflavin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Mikrokerntest.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

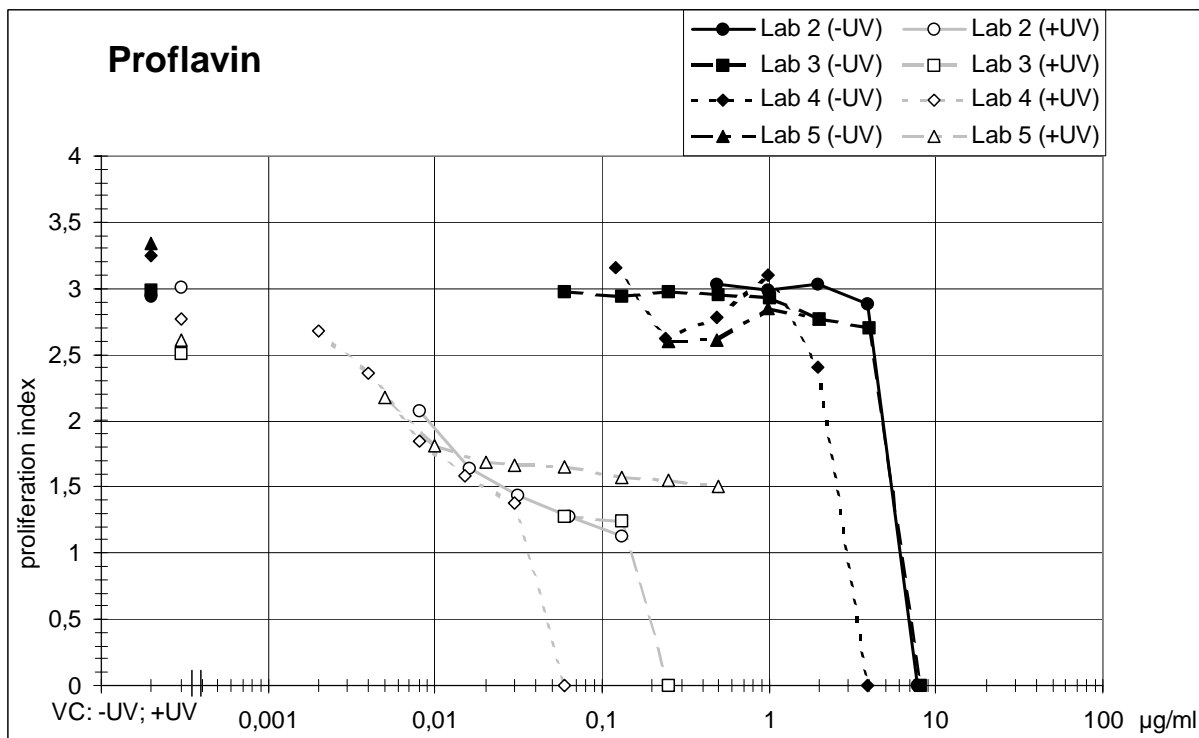
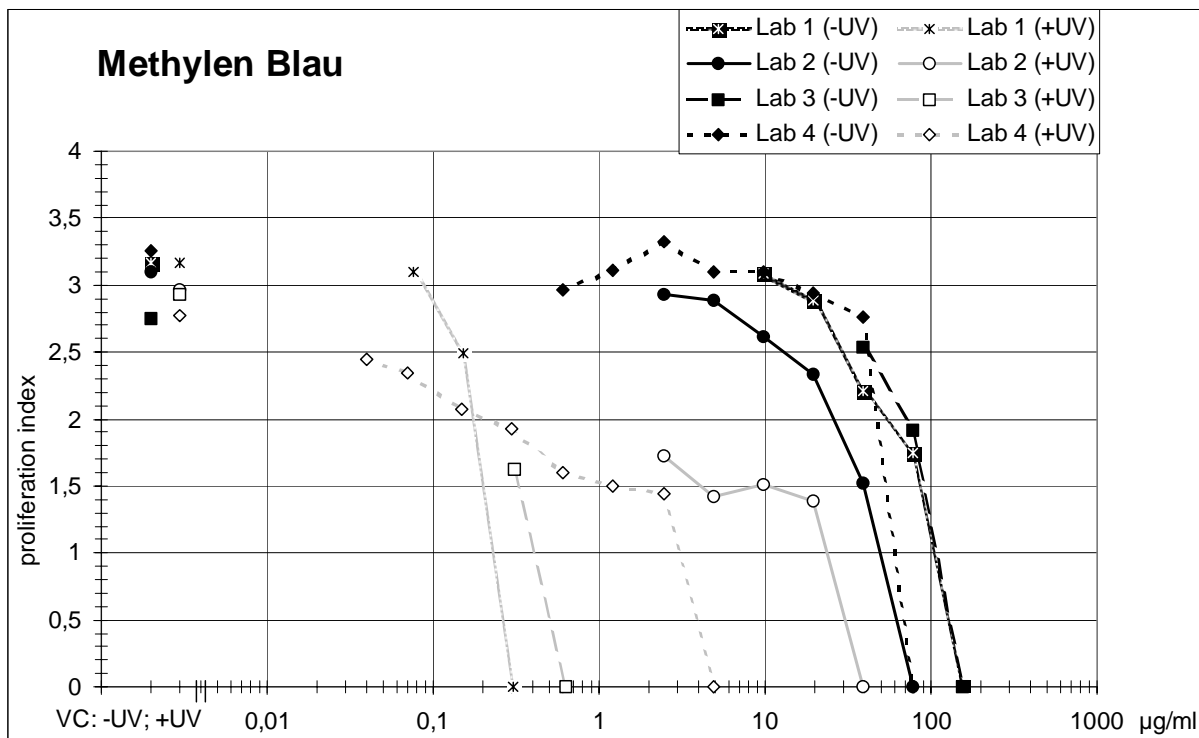


Abb. 8: Ergebnisse aus Untersuchungen im **Proliferationstest** für **Dacarbazin** und **Doxycyclin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Mikrokerntest.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

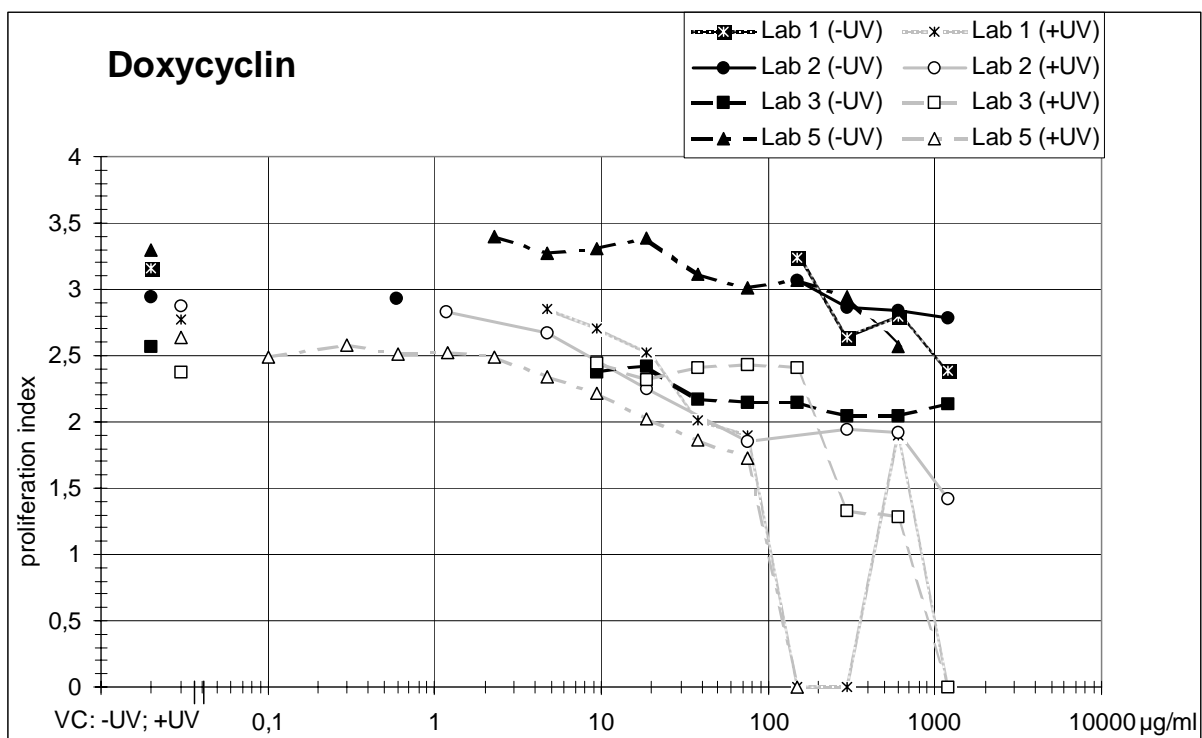
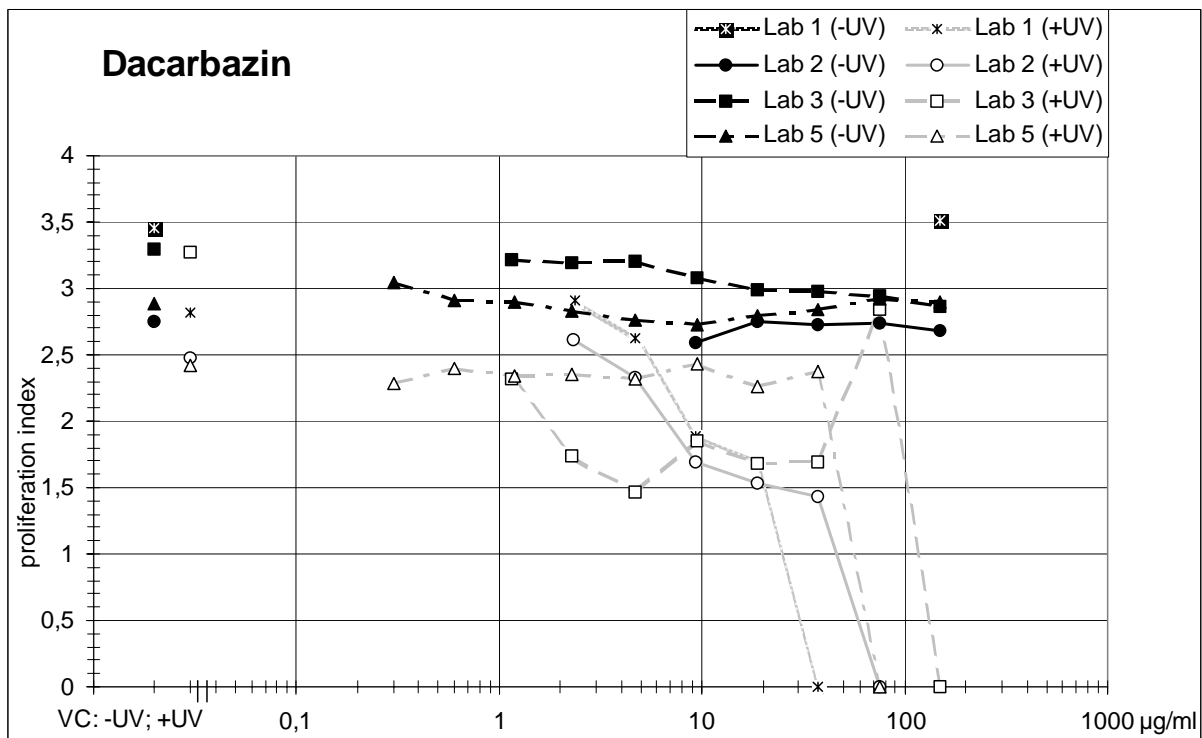


Abb. 9: Ergebnisse aus Untersuchungen im **Proliferationstest** für **Promazin** und **Ketoprofen** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Mikrokerntest.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

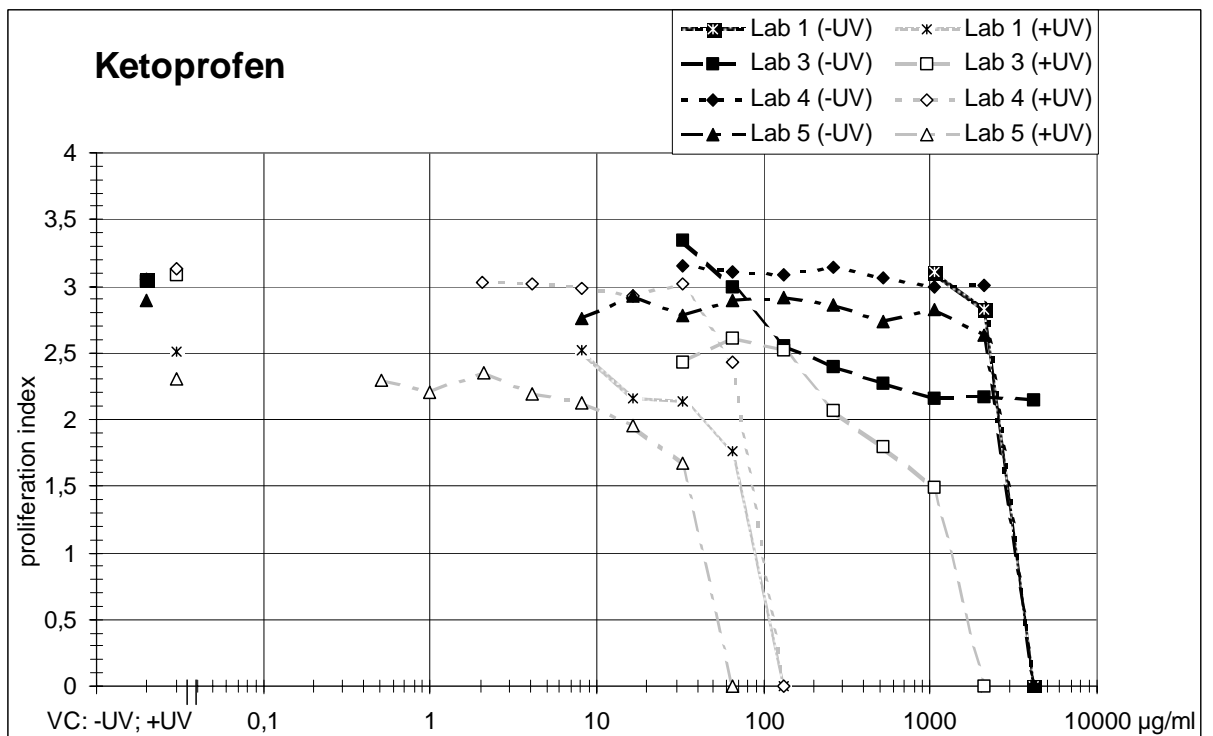
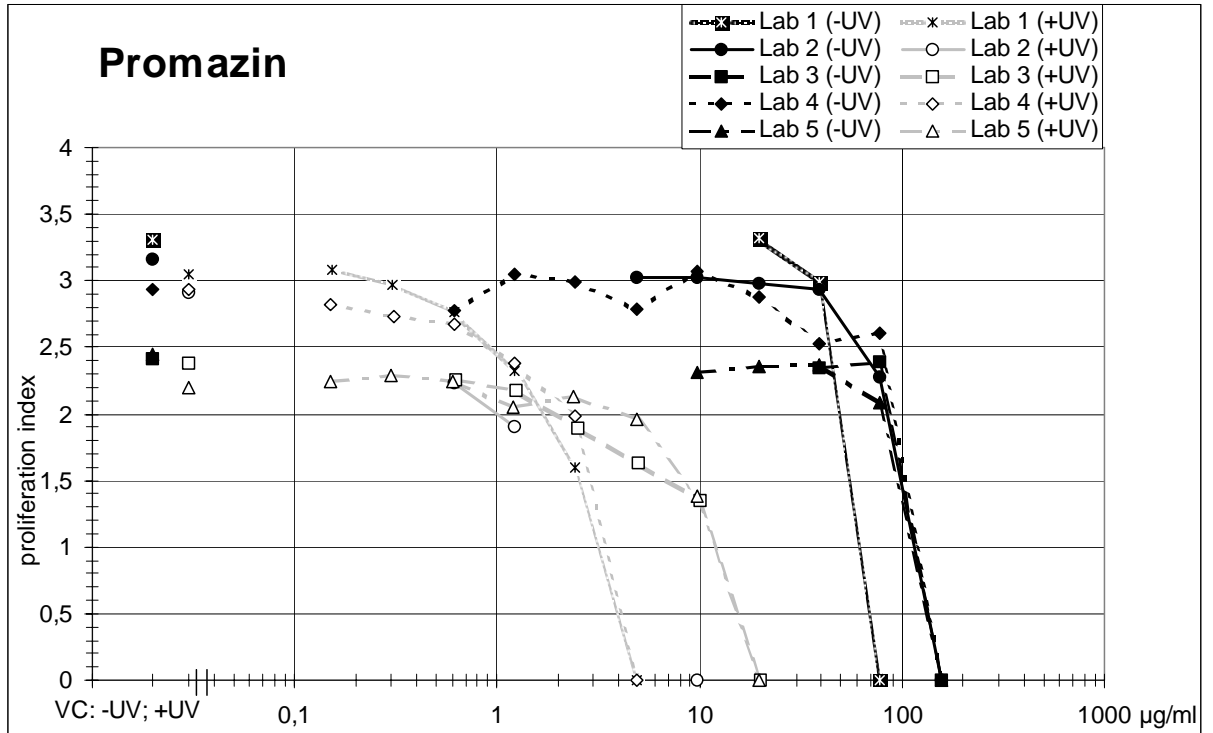


Abb. 10: Ergebnisse aus Untersuchungen im **Proliferationstest** für **Acridin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „**Rangefinder**“ für die Hauptexperimente im Photo-Mikrokerntest.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

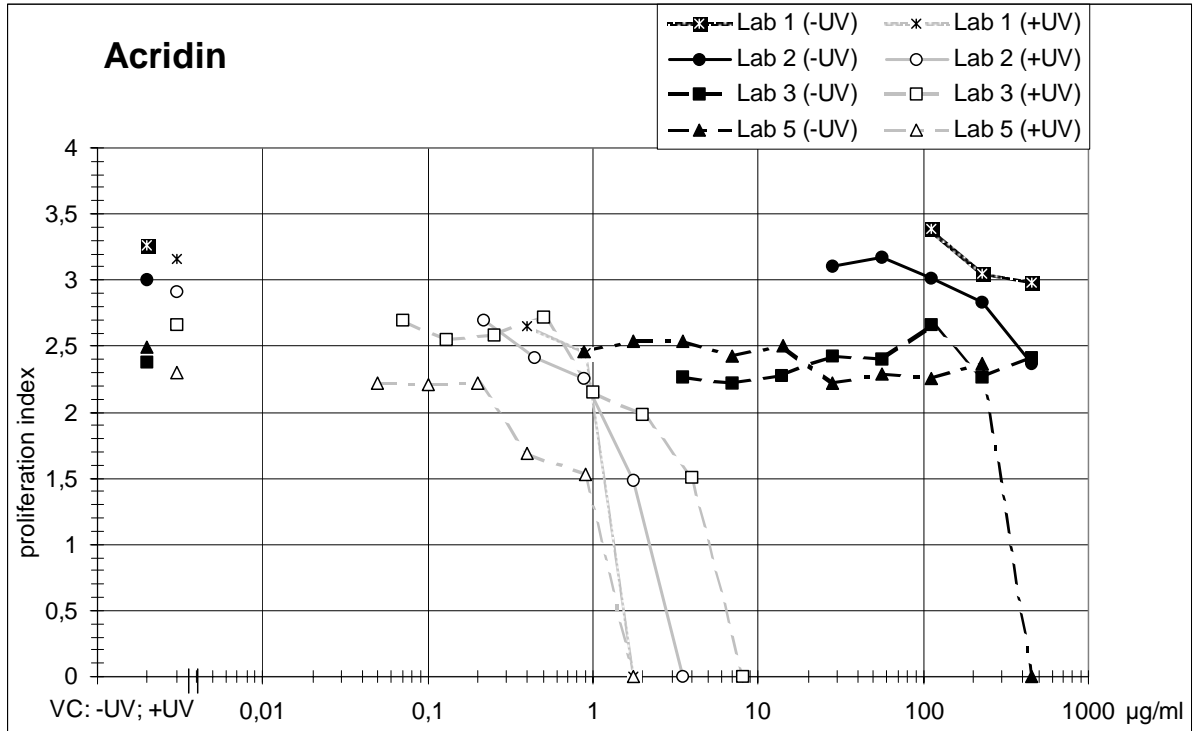


Abb. 11: Ergebnisse aus Untersuchungen im **Proliferationstest** für **Octylmethoxycinnamat** und **Titandioxid** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Mikrokerntest.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

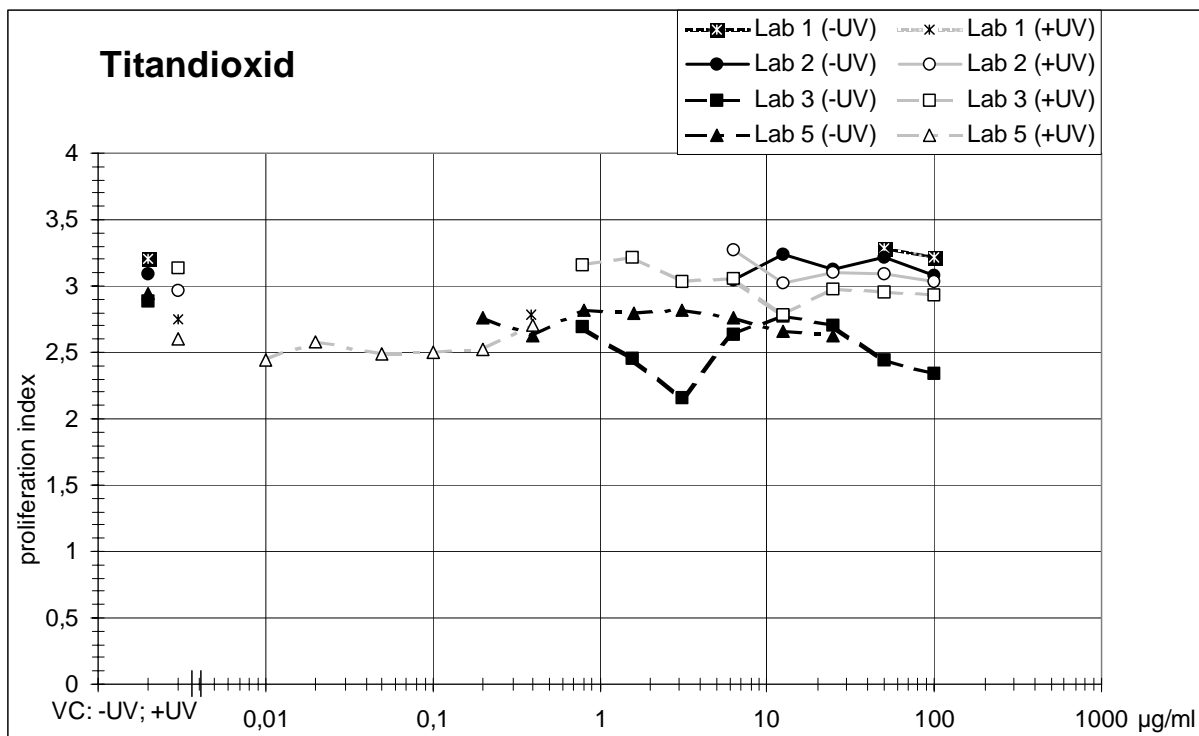
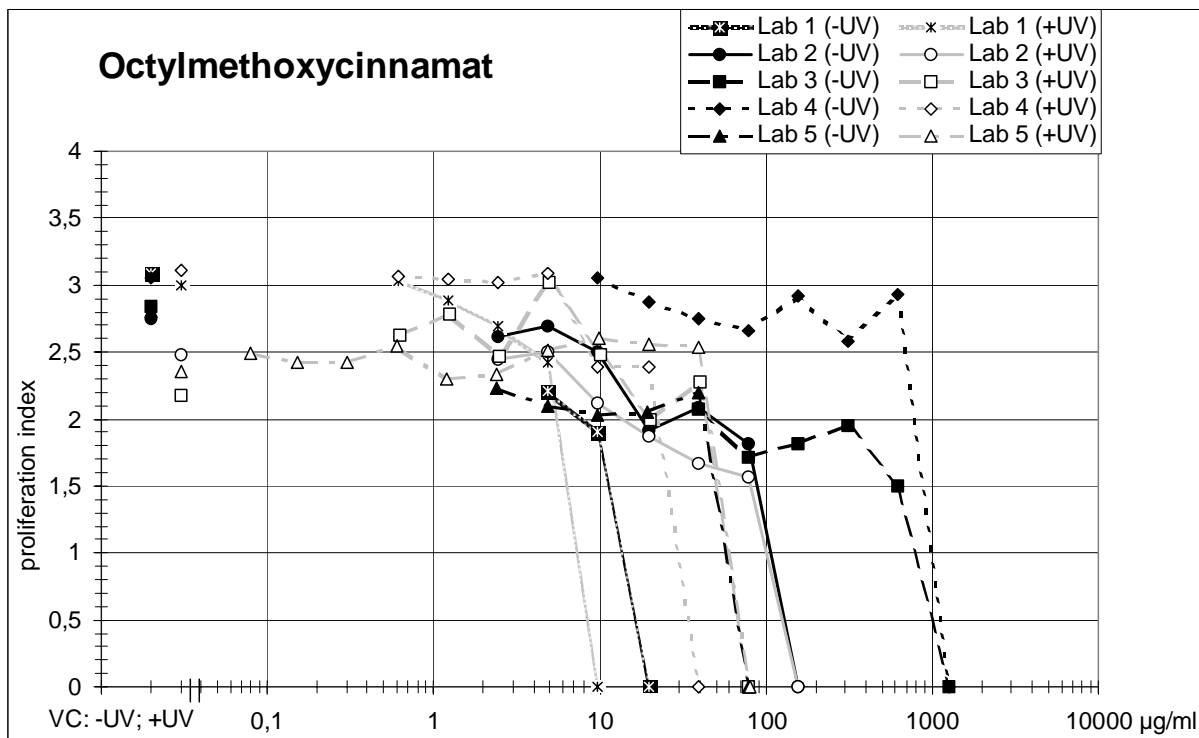


Abb. 12: Rangfinder mit Proliferationstest +/- UV: Übersicht der Gesamtergebnisse mit allen 13 Testsubstanzen der Ringstudie.

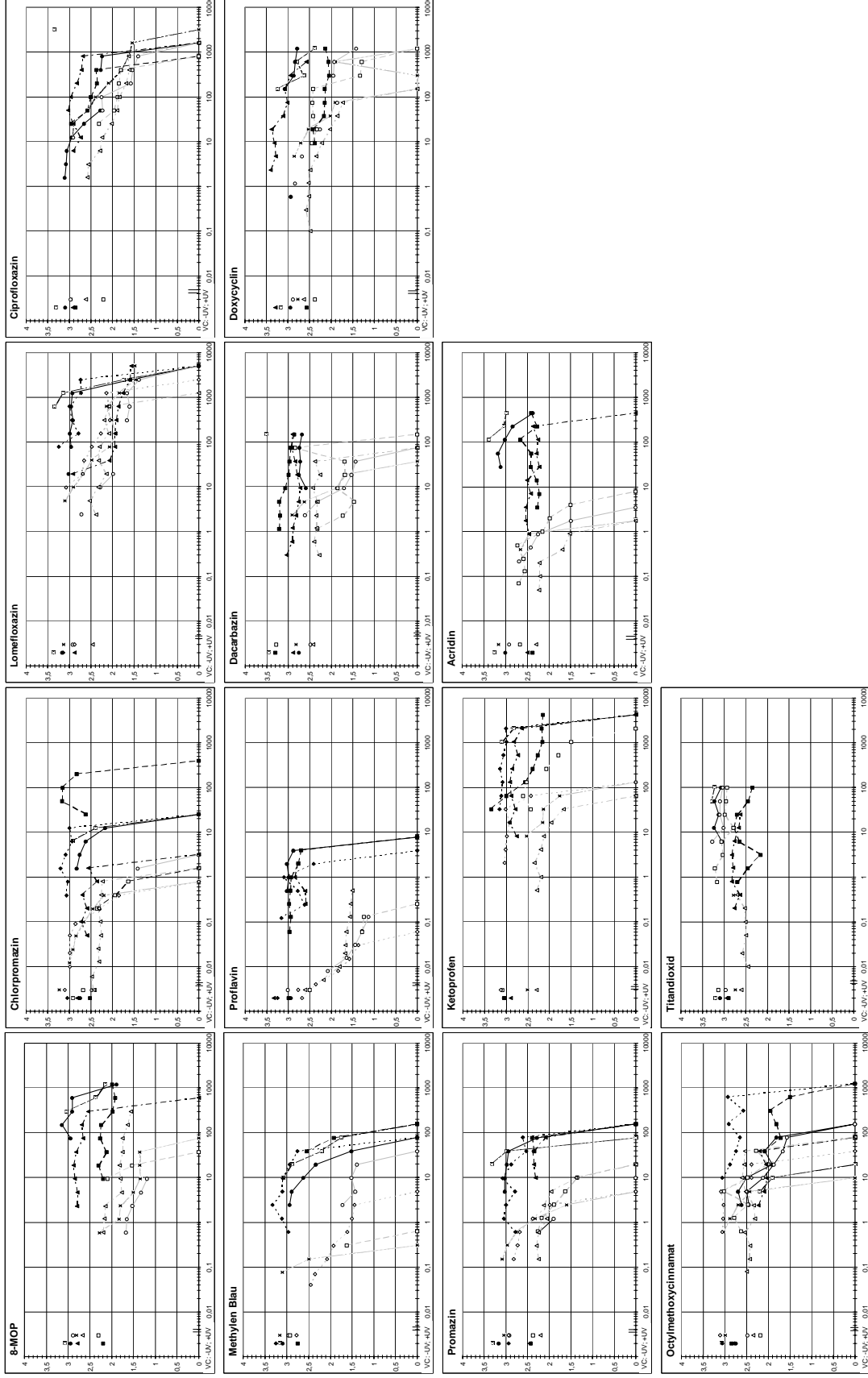


Abb. 13: Ergebnisse aus Untersuchungen zur Bestimmung der **relativen Viabilität** mittels Trypanblau-Methode für **8-Methoxy-psoralen (8-MOP)** und **Chlorpromazin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Cometassay.

VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

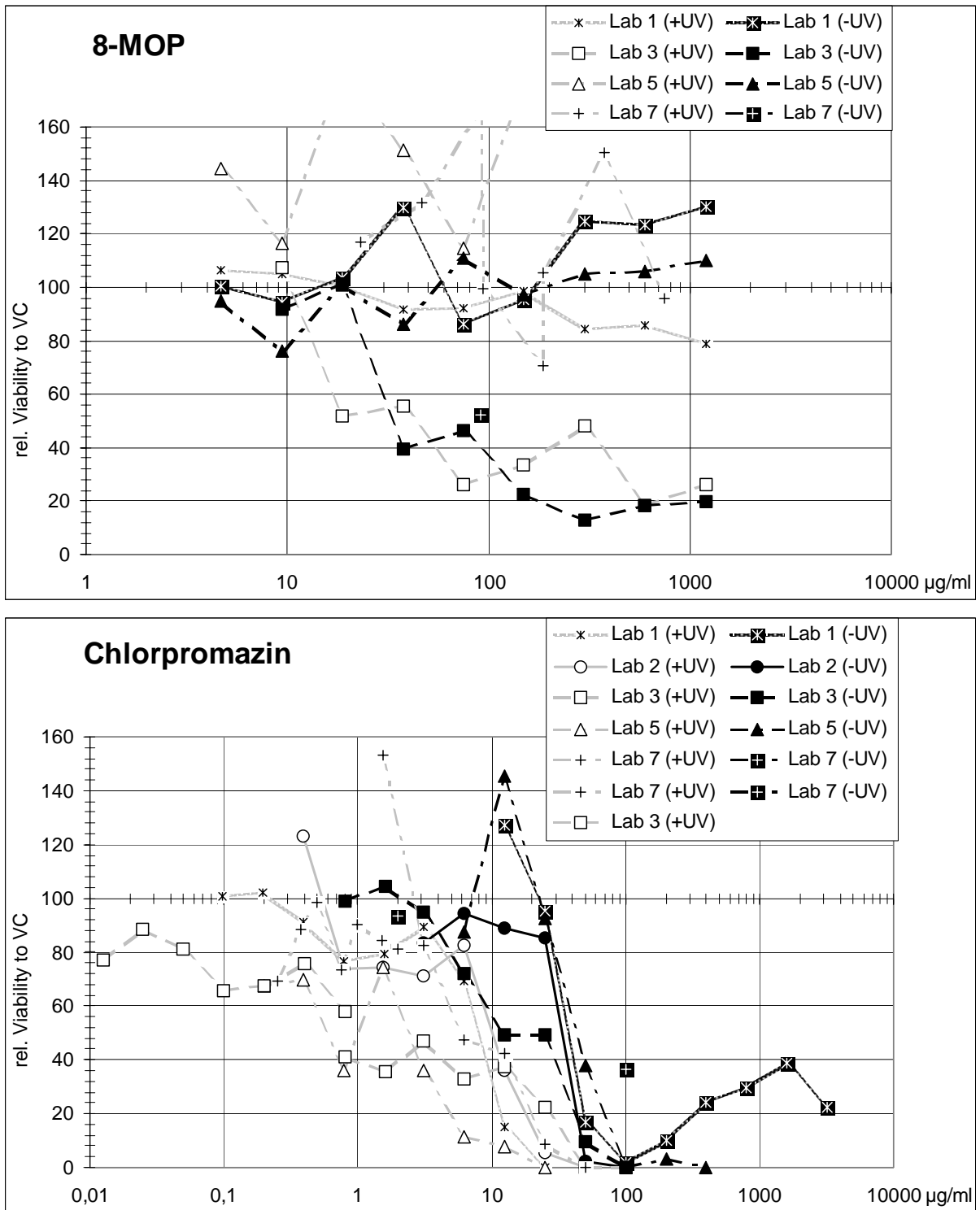


Abb. 14: Ergebnisse aus Untersuchungen zur Bestimmung der **relativen Viabilität** mittels Trypanblau-Methode für **Lomefloxazin** und **Ciprofloxazin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Cometassay. VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

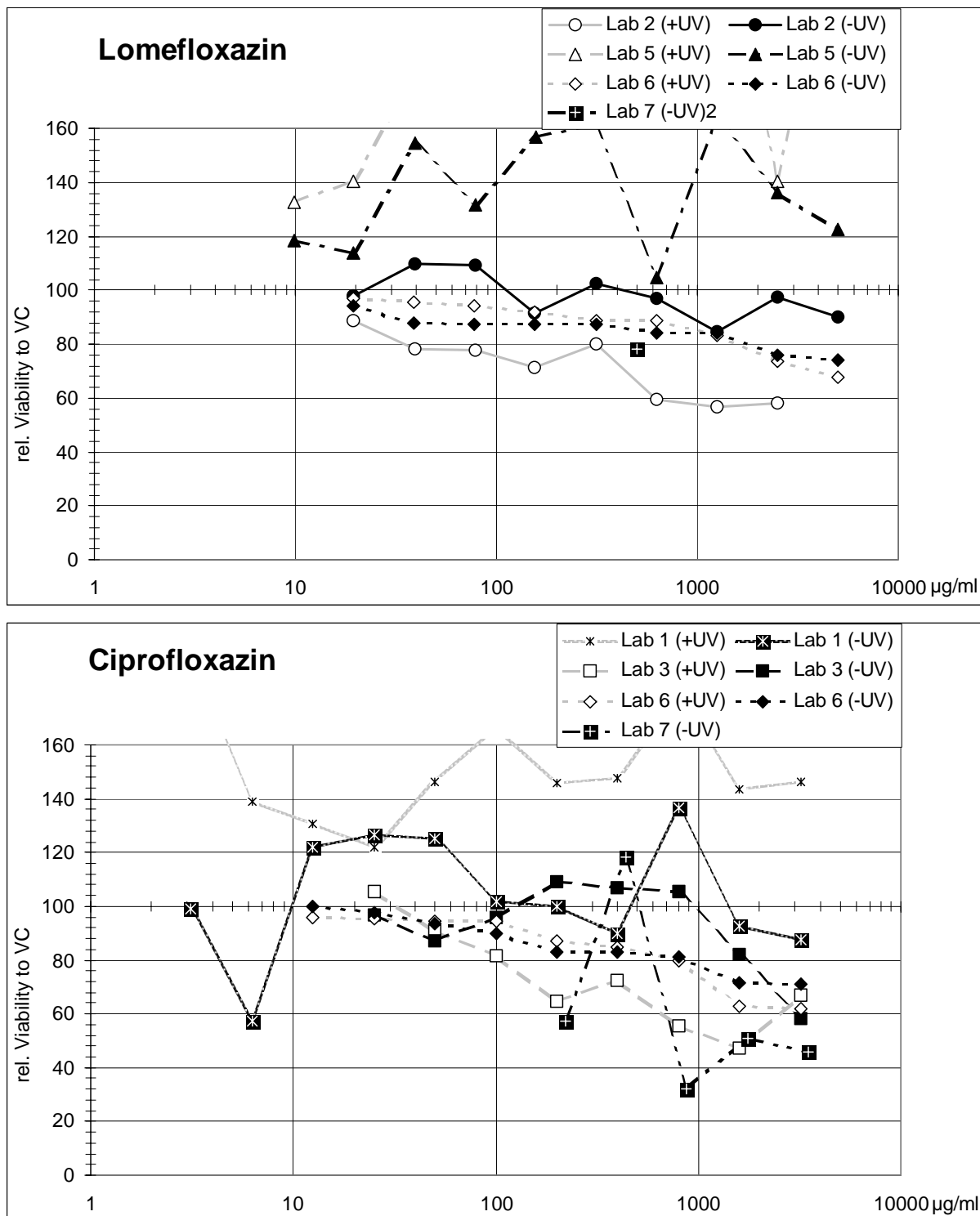


Abb. 15: Ergebnisse aus Untersuchungen zur Bestimmung der **relativen Viabilität** mittels Trypanblau-Methode für **Methylen Blau** und **Proflavin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Cometassay. VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

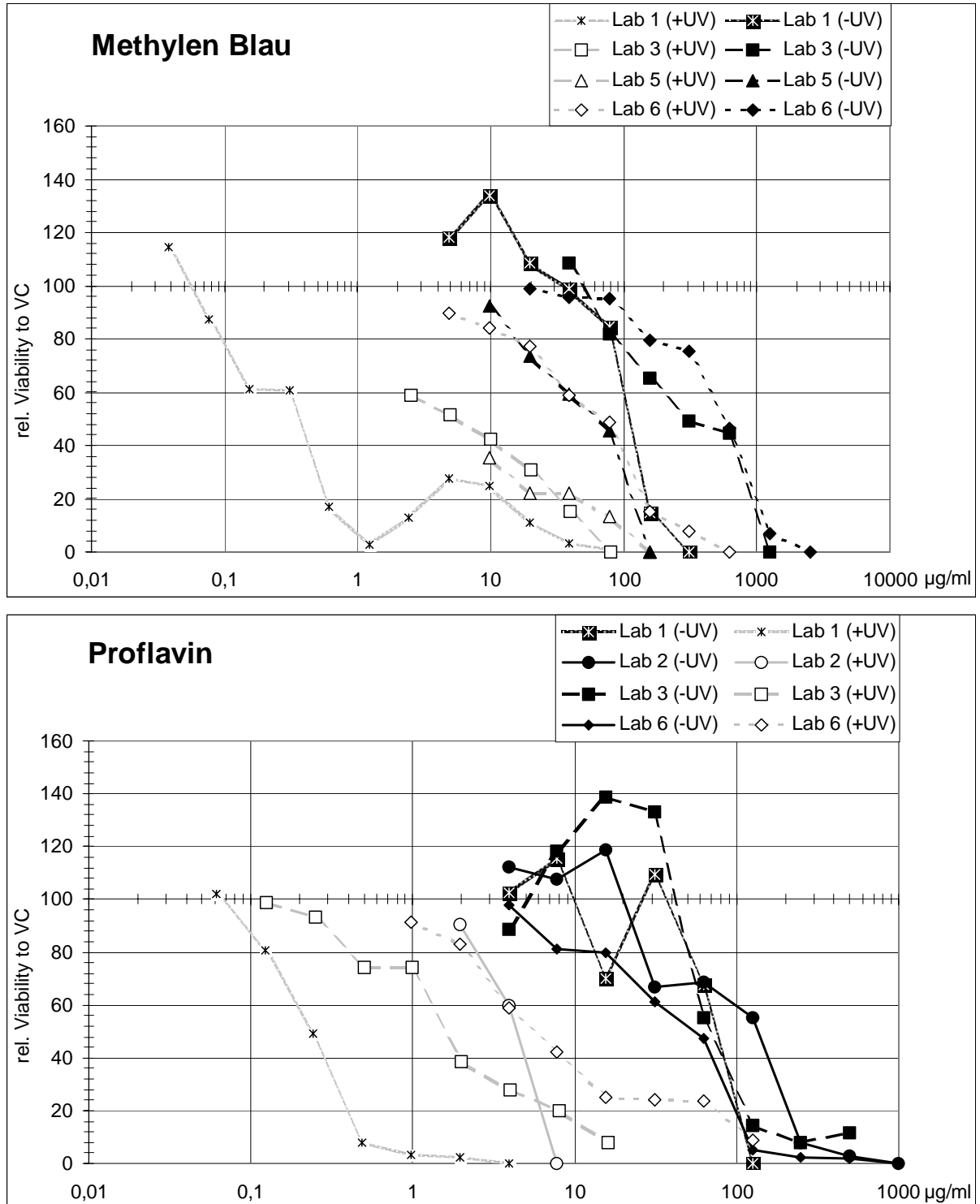


Abb. 16: Ergebnisse aus Untersuchungen zur Bestimmung der **relativen Viabilität** mittels Trypanblau-Methode für **Dacarbazin** und **Doxycyclin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Cometassay.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

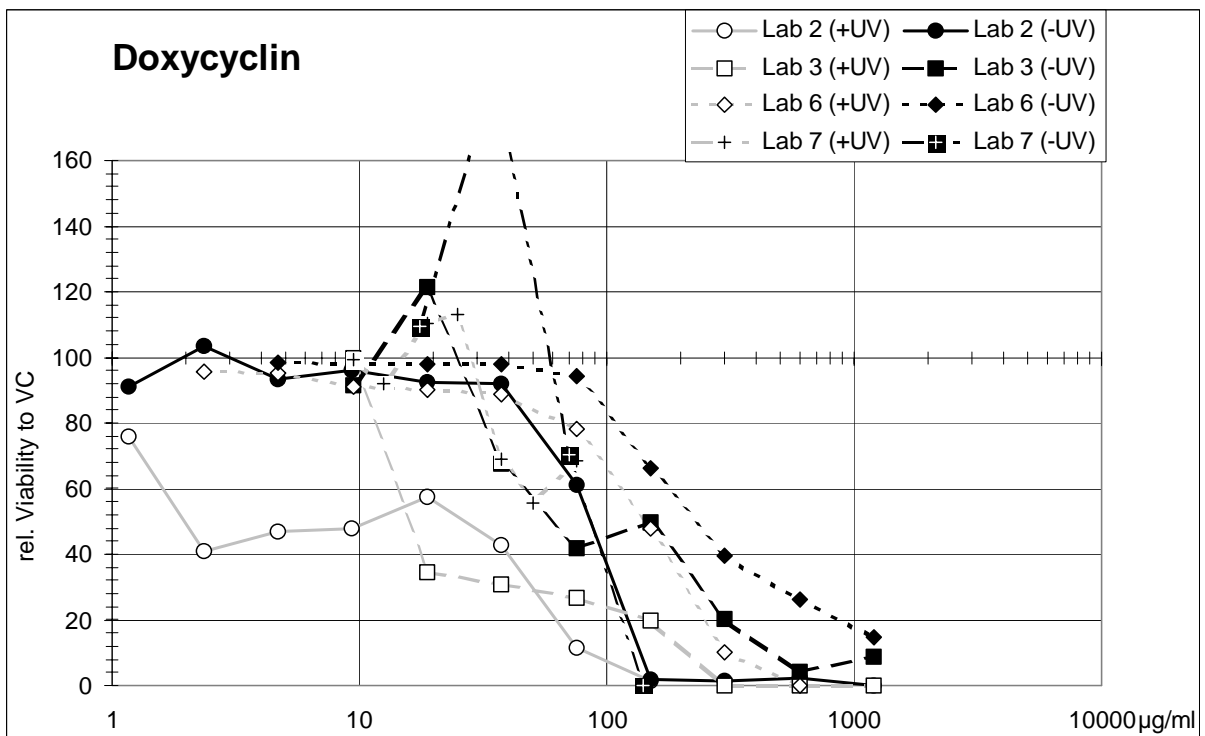
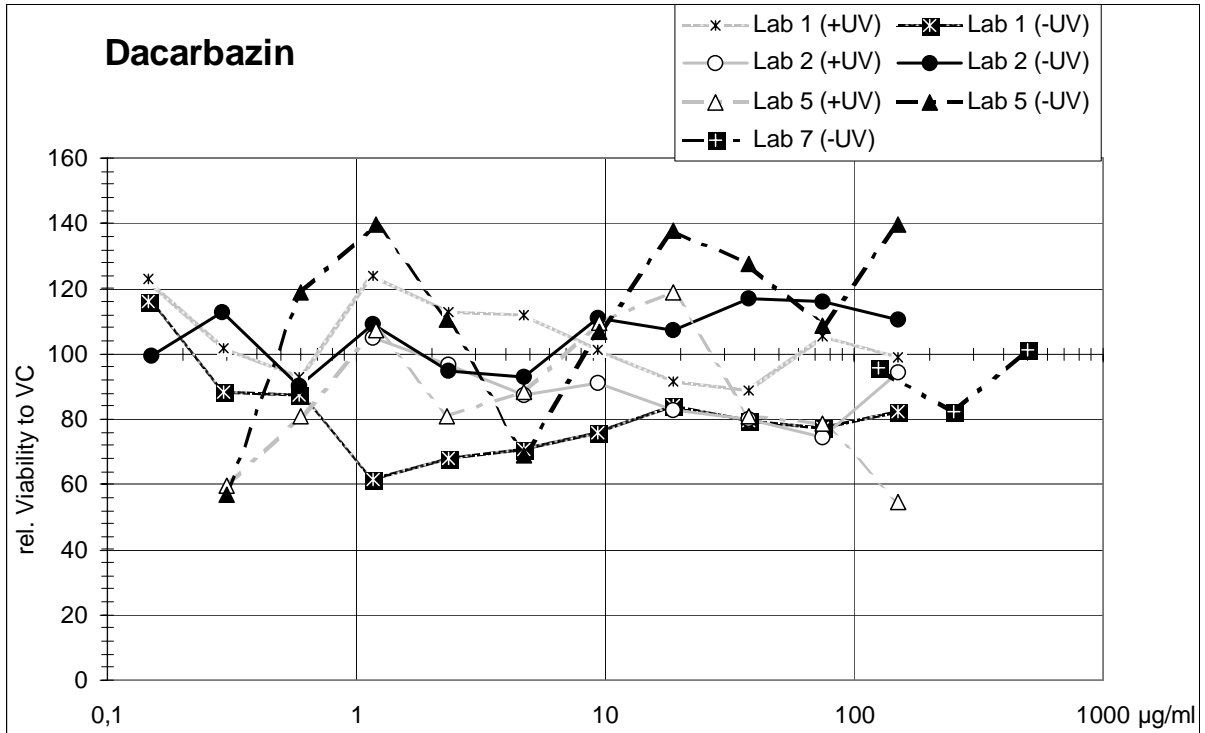


Abb. 17: Ergebnisse aus Untersuchungen zur Bestimmung der **relativen Viabilität** mittels Trypanblau-Methode für **Promazin** und **Ketoprofen** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Cometassay.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

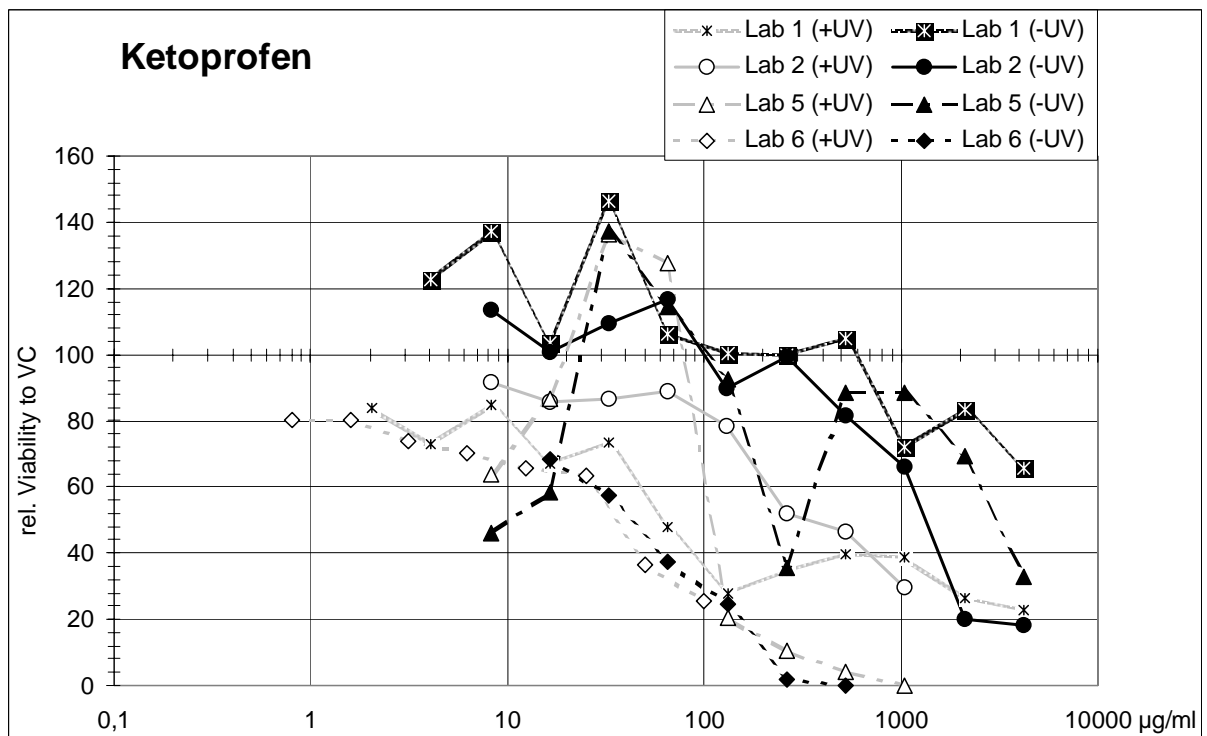
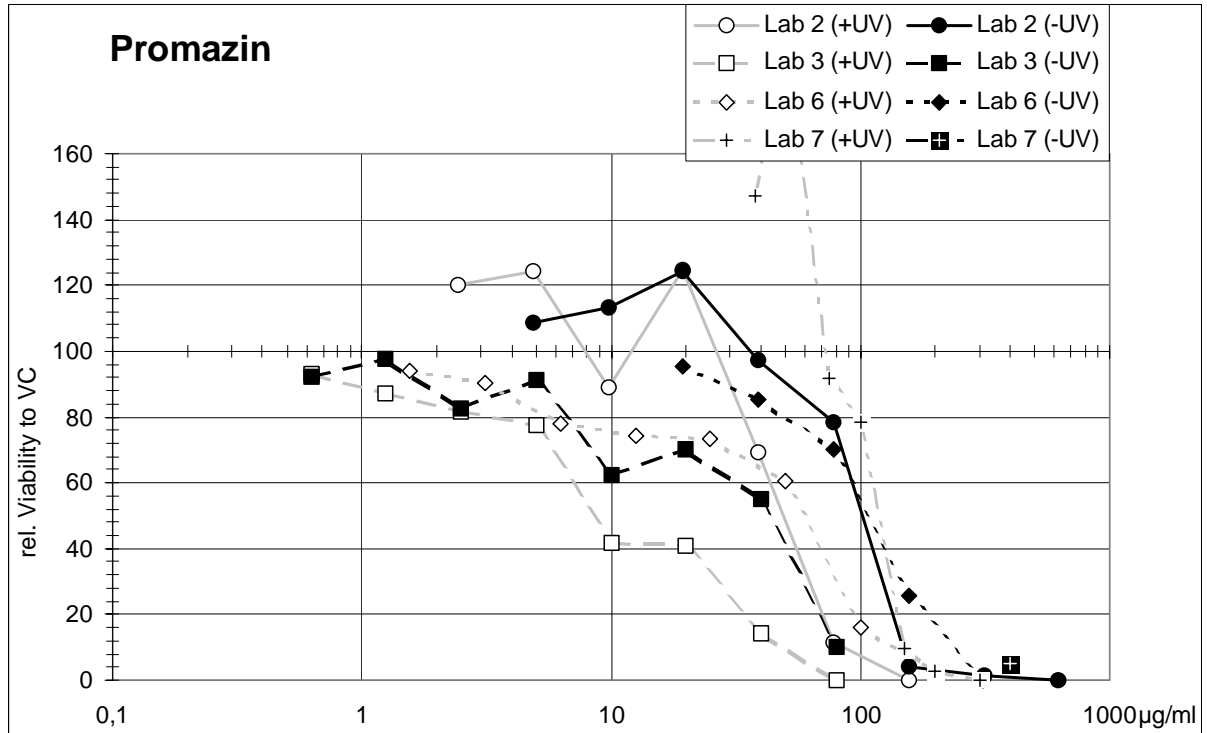


Abb. 18: Ergebnisse aus Untersuchungen zur Bestimmung der **relativen Viabilität** mittels Trypanblau-Methode für **Acridin** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Cometassay.
 VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

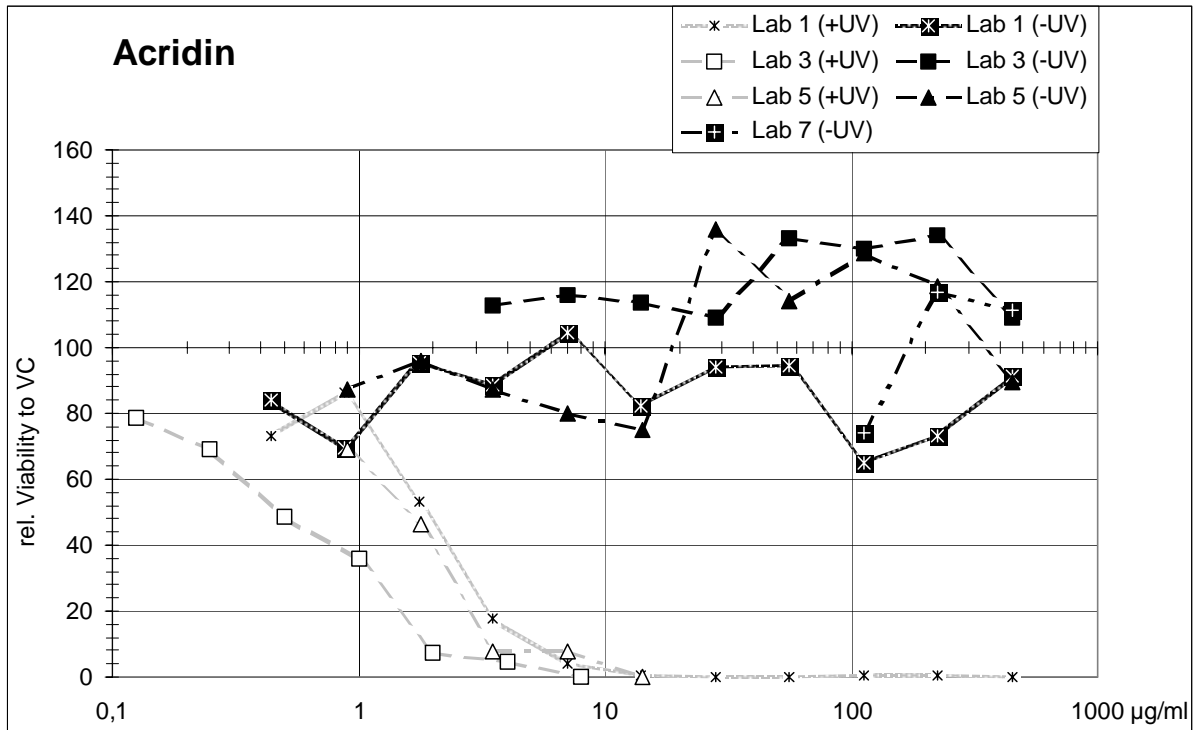


Abb. 19: Ergebnisse aus Untersuchungen zur Bestimmung der **relativen Viabilität** mittels Trypanblau-Methode für **Octylmethoxycinnamat** und **Titandioxid** ohne und mit UV-Bestrahlung als „Rangefinder“ für die Hauptexperimente im Photo-Cometassay. VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung.

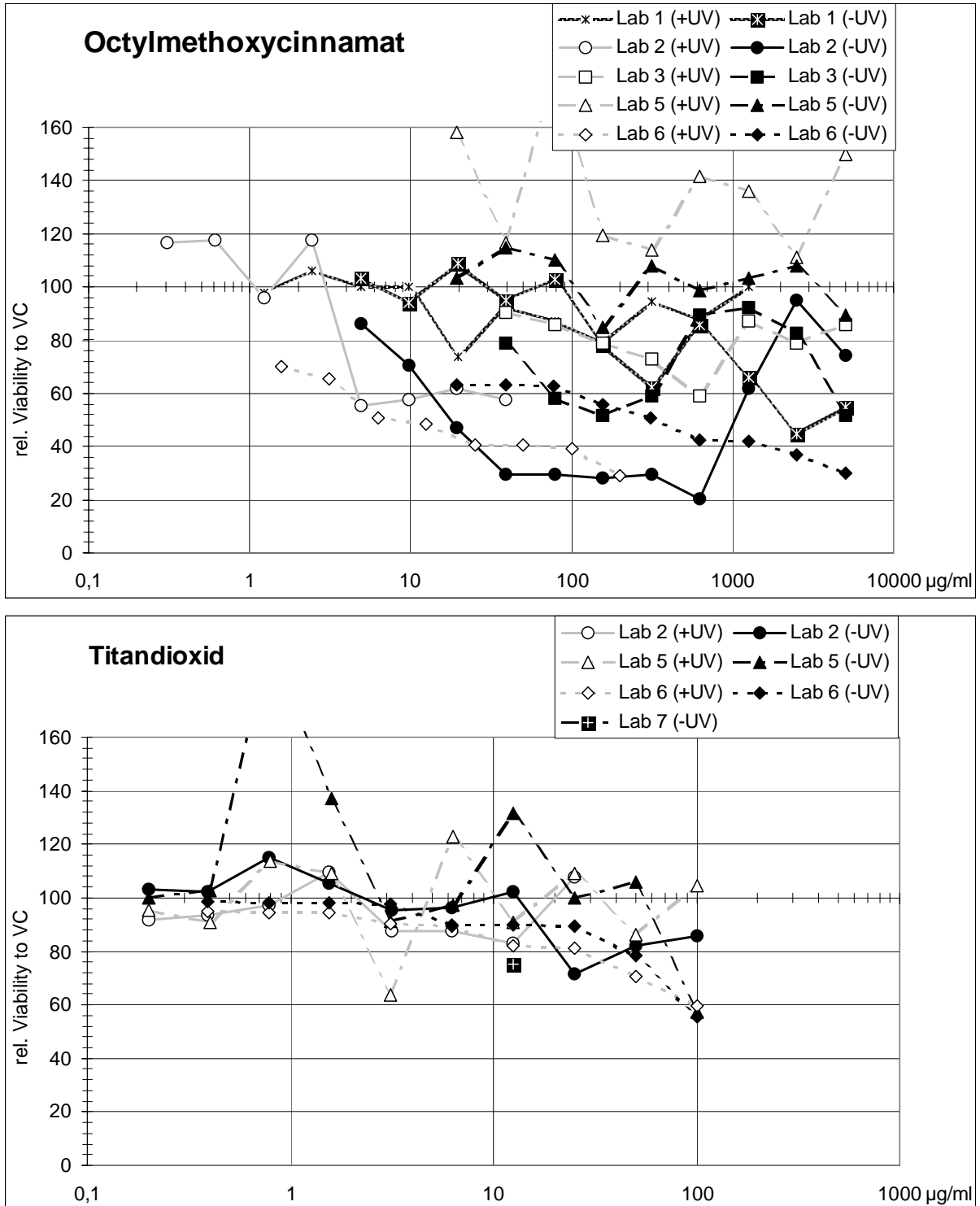


Abb. 20: Ergebnisse aus drei Labors (✕ ✕ Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3) mit **8-Methoxypsoralen (8-MOP)** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

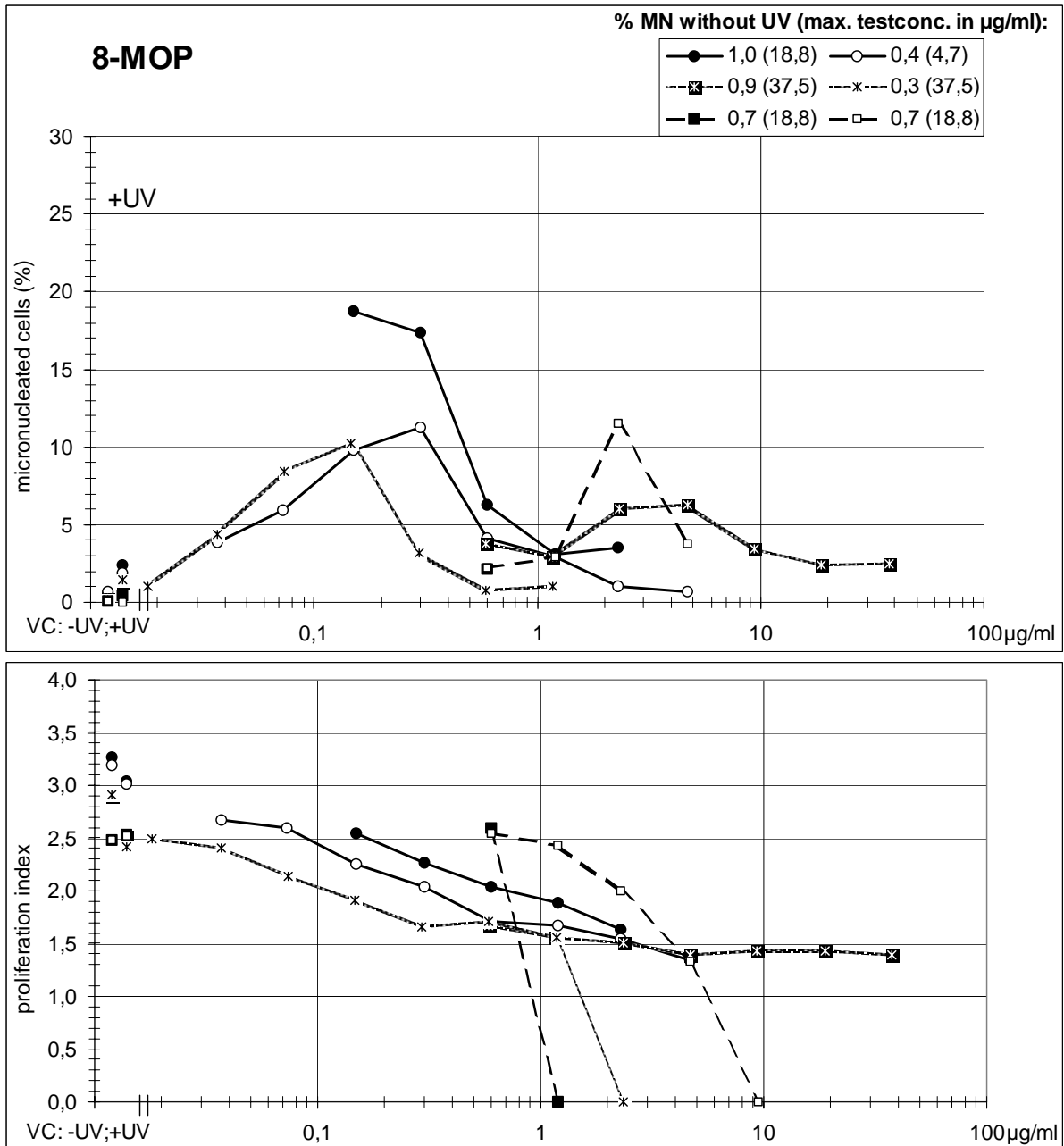


Abb. 21: Ergebnisse aus vier Labors (⊠ * Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 4,) mit **Chlorpromazin** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

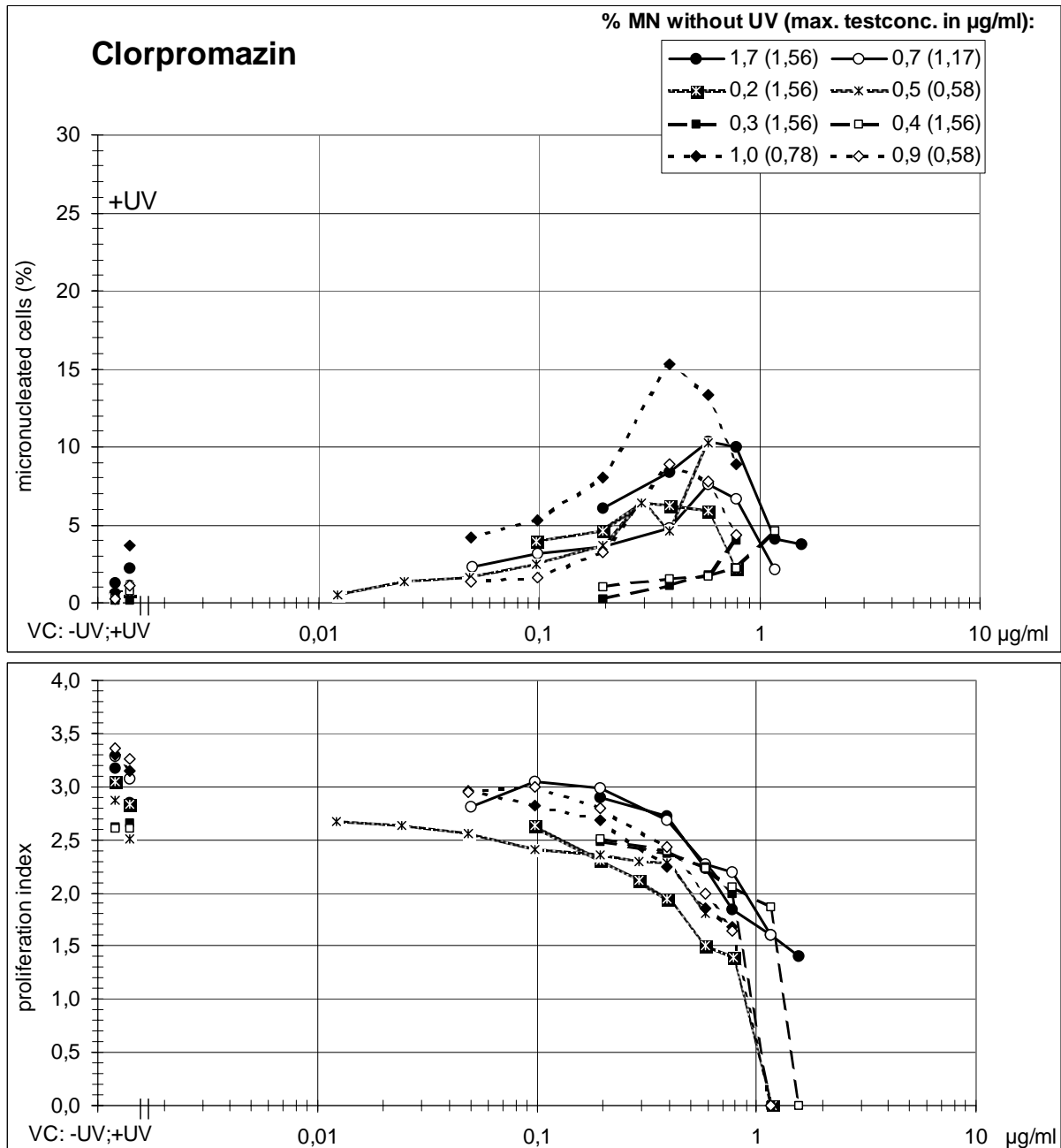


Abb. 22: Ergebnisse aus drei Labors (✱ ✱ Labor 1; ● ○ Labor 2; ◆ ◇ Labor 4) mit **Lomefloxazin** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

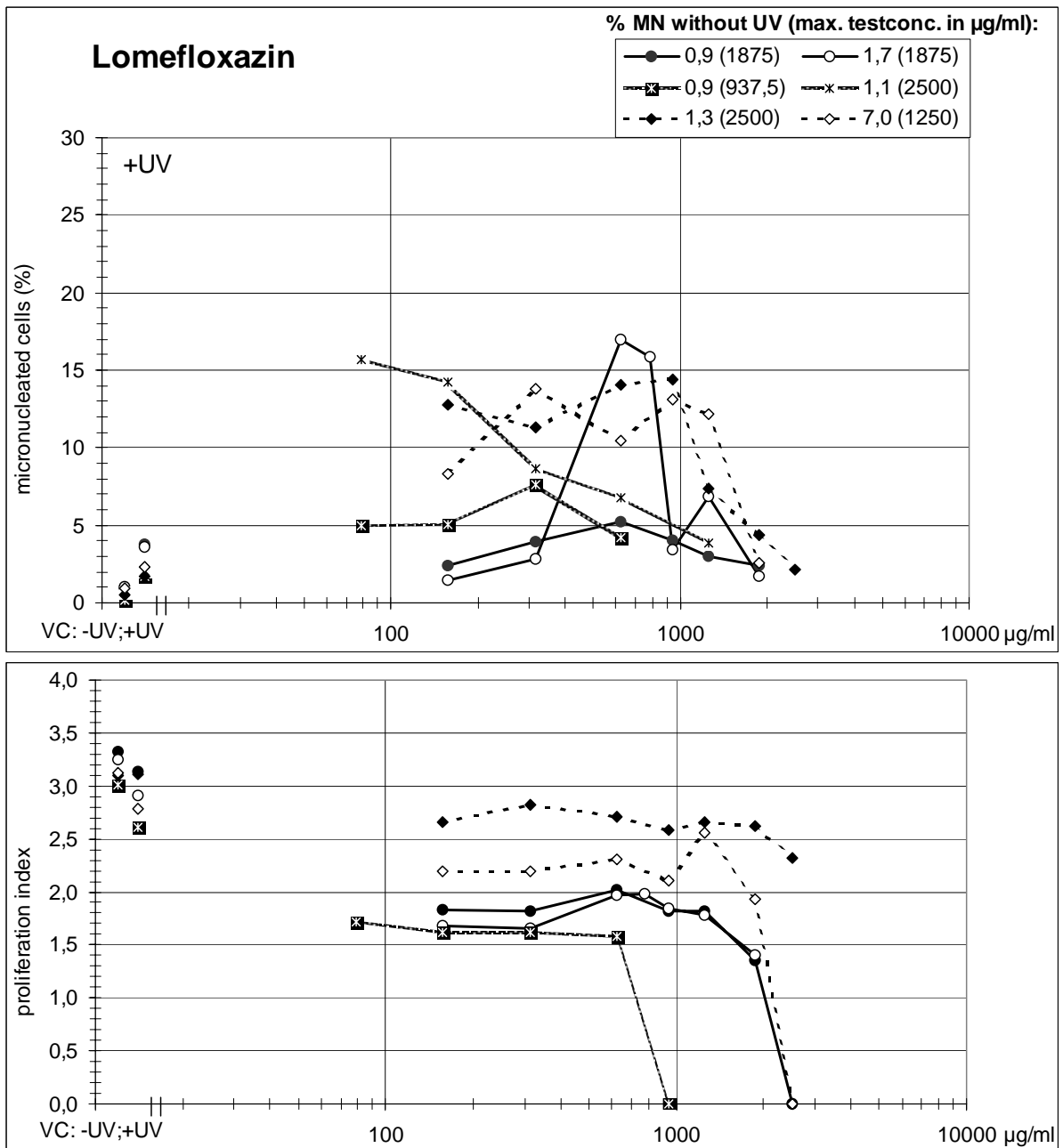


Abb. 23: Ergebnisse aus drei Labors (✱ ✱ Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3) mit **Ciprofloxazin** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

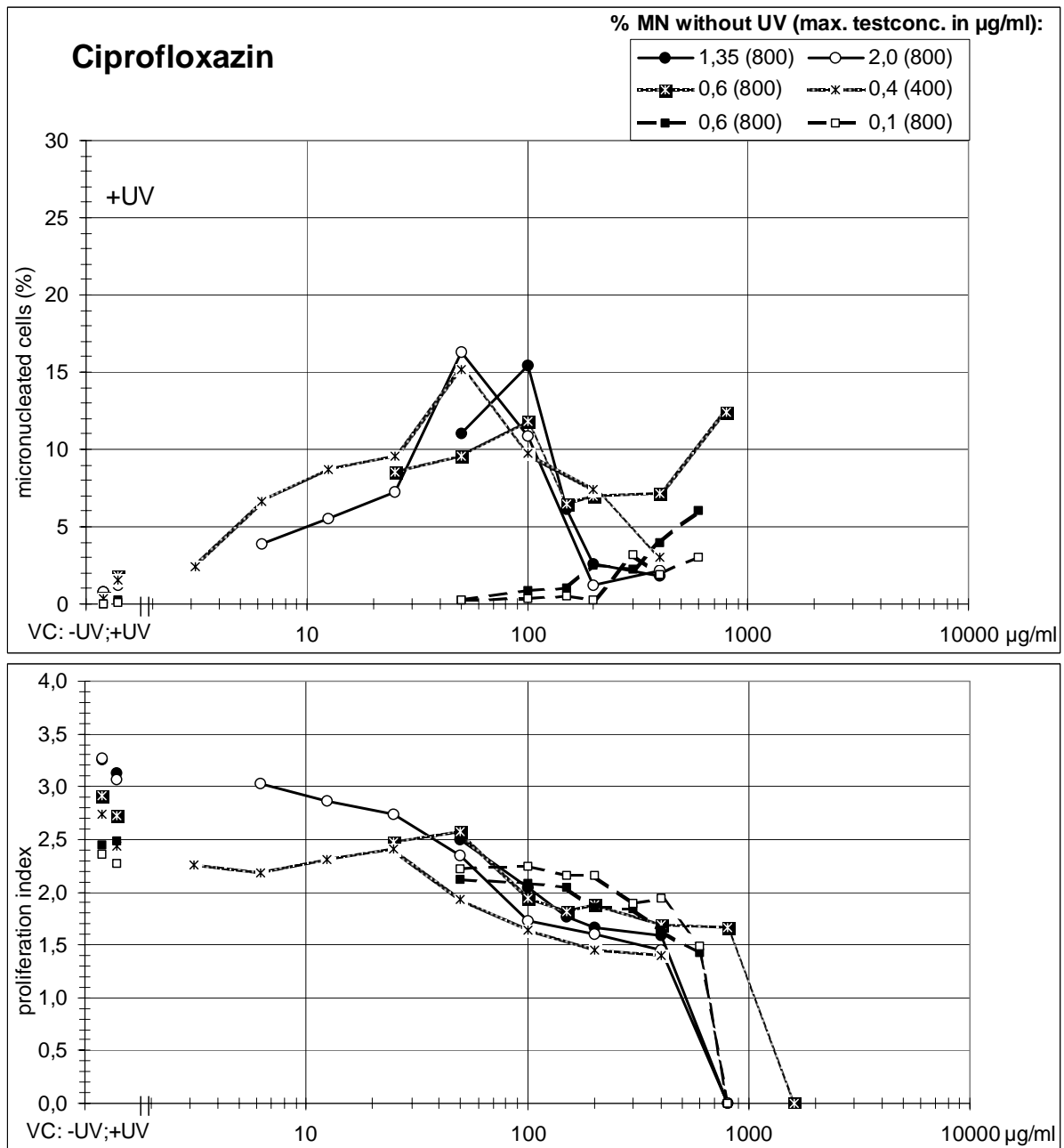


Abb. 24: Ergebnisse aus vier Labors (⊠ ⊗ Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 4) mit **Methylen Blau** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

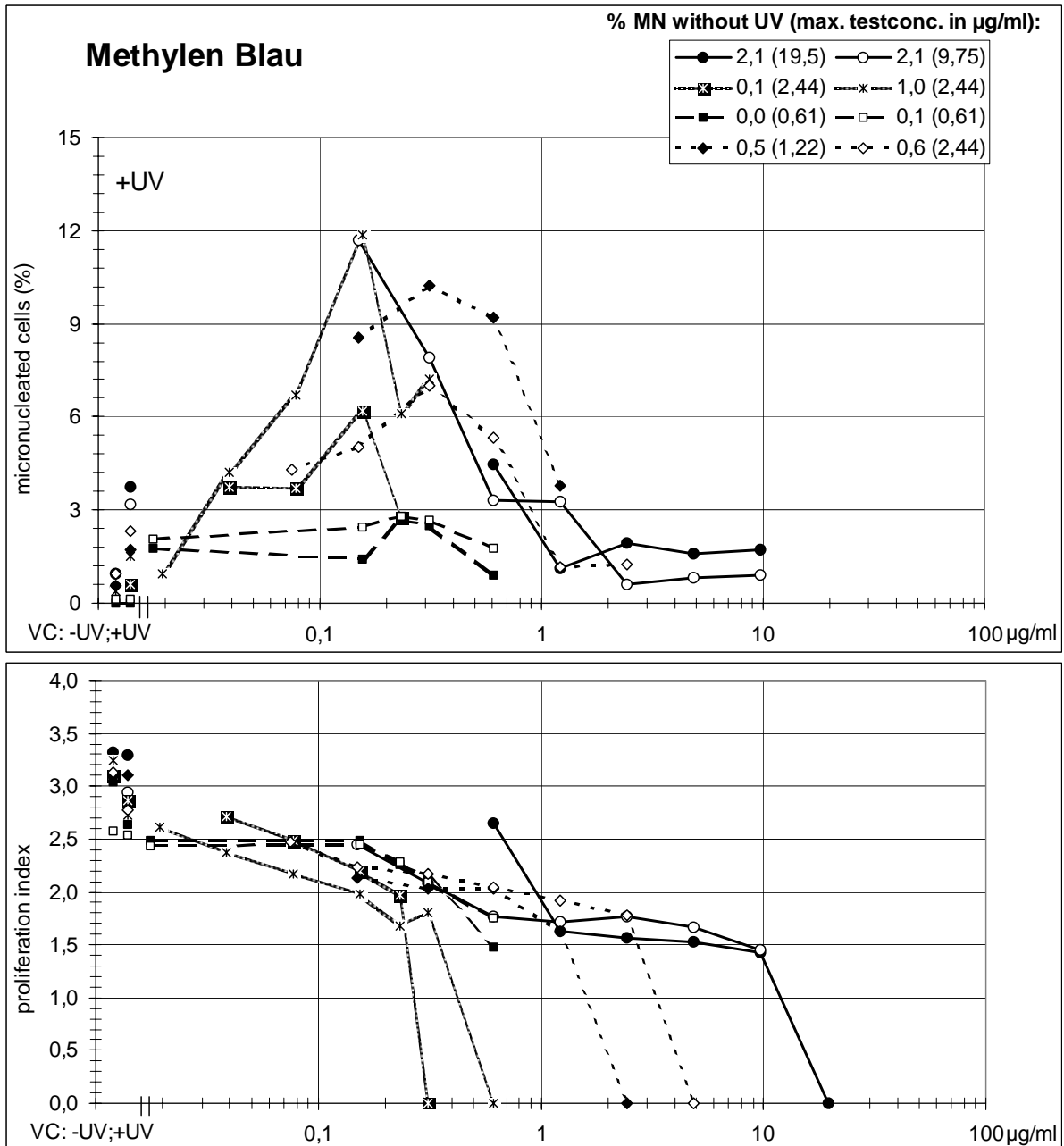


Abb. 25: Ergebnisse aus zwei Labors (■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 4) mit **Proflavin** im Photo-**Mikrokern**test. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

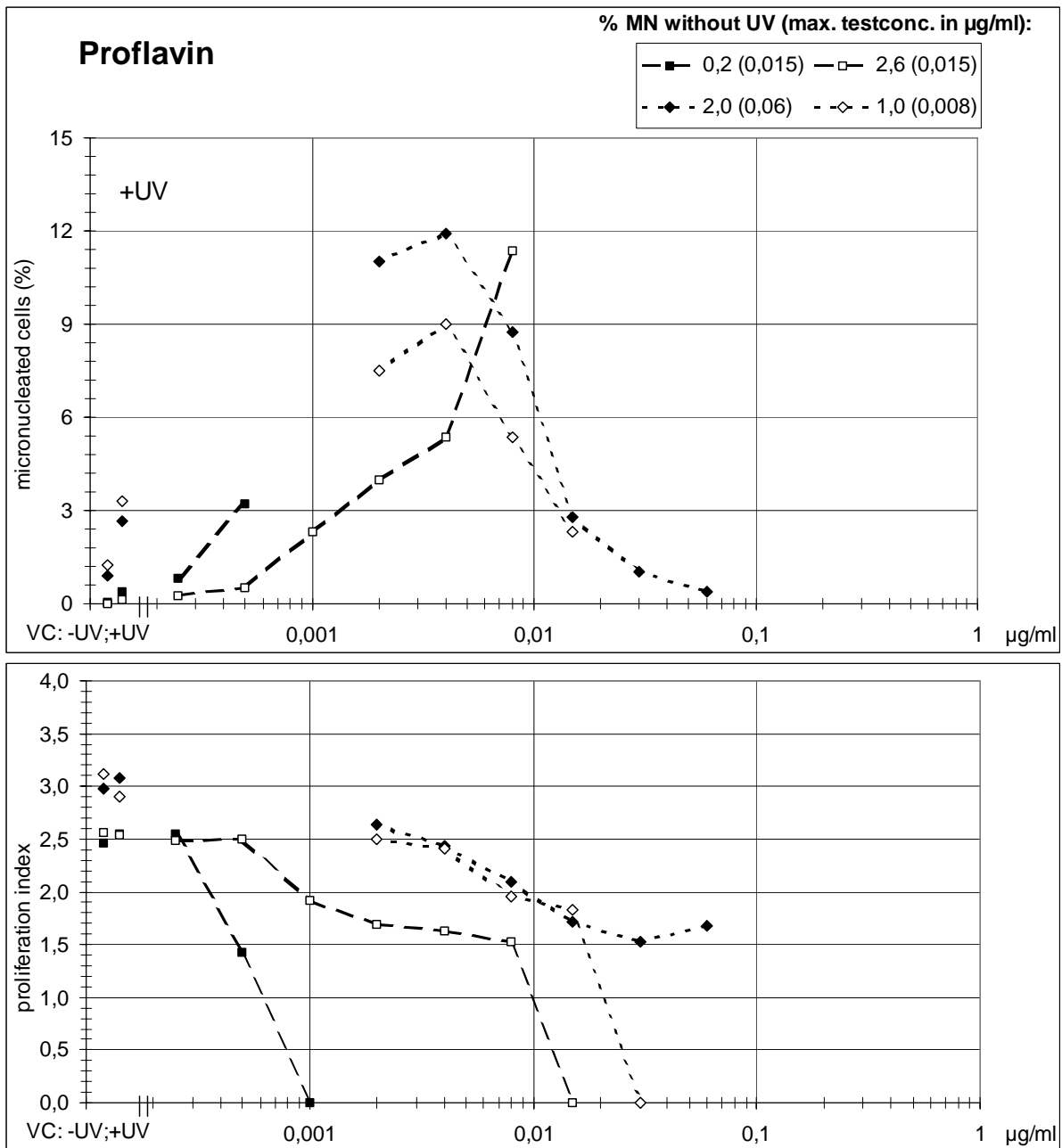


Abb. 26: Ergebnisse aus drei Labors (✱ ✱ Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3) mit **Dacarbazin** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

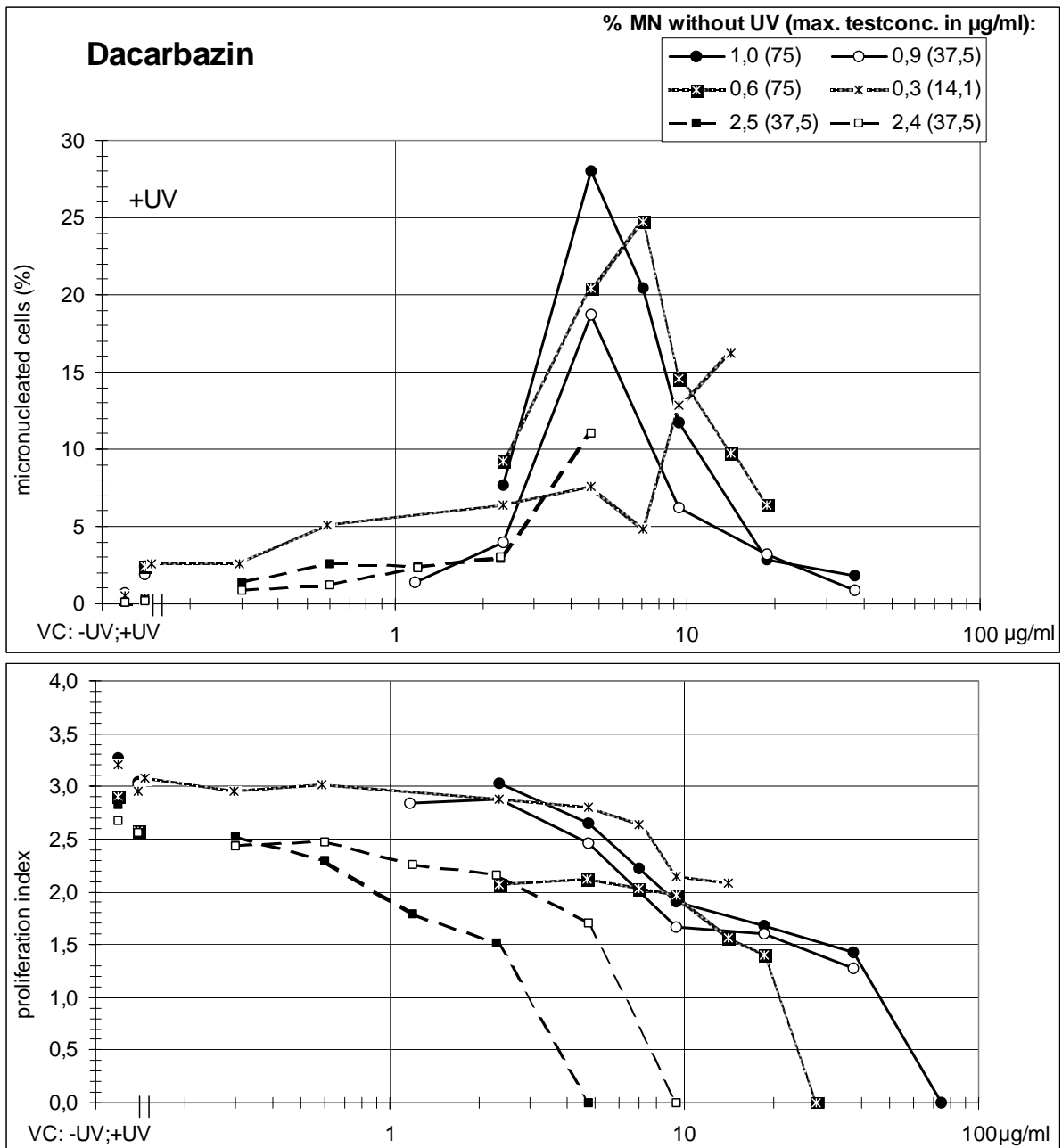


Abb. 27: Ergebnisse aus drei Labors (✕ ✕ Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3) mit **Doxycyclin** im Photo-Mikrokern-test. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

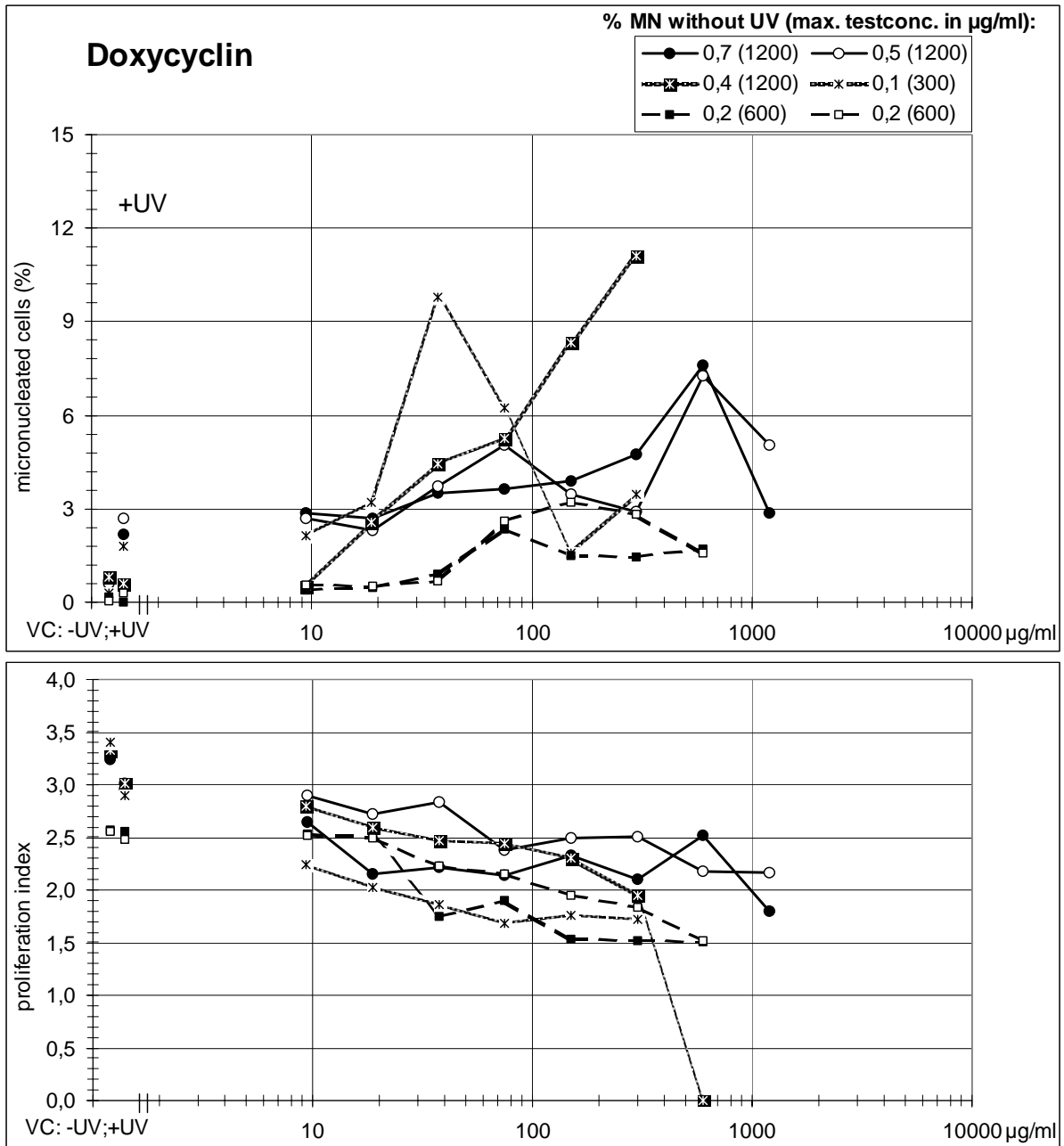


Abb. 28: Ergebnisse aus vier Labors (⊠ * Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 4) mit **Promazin** im Photo-**Mikrokern**test. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

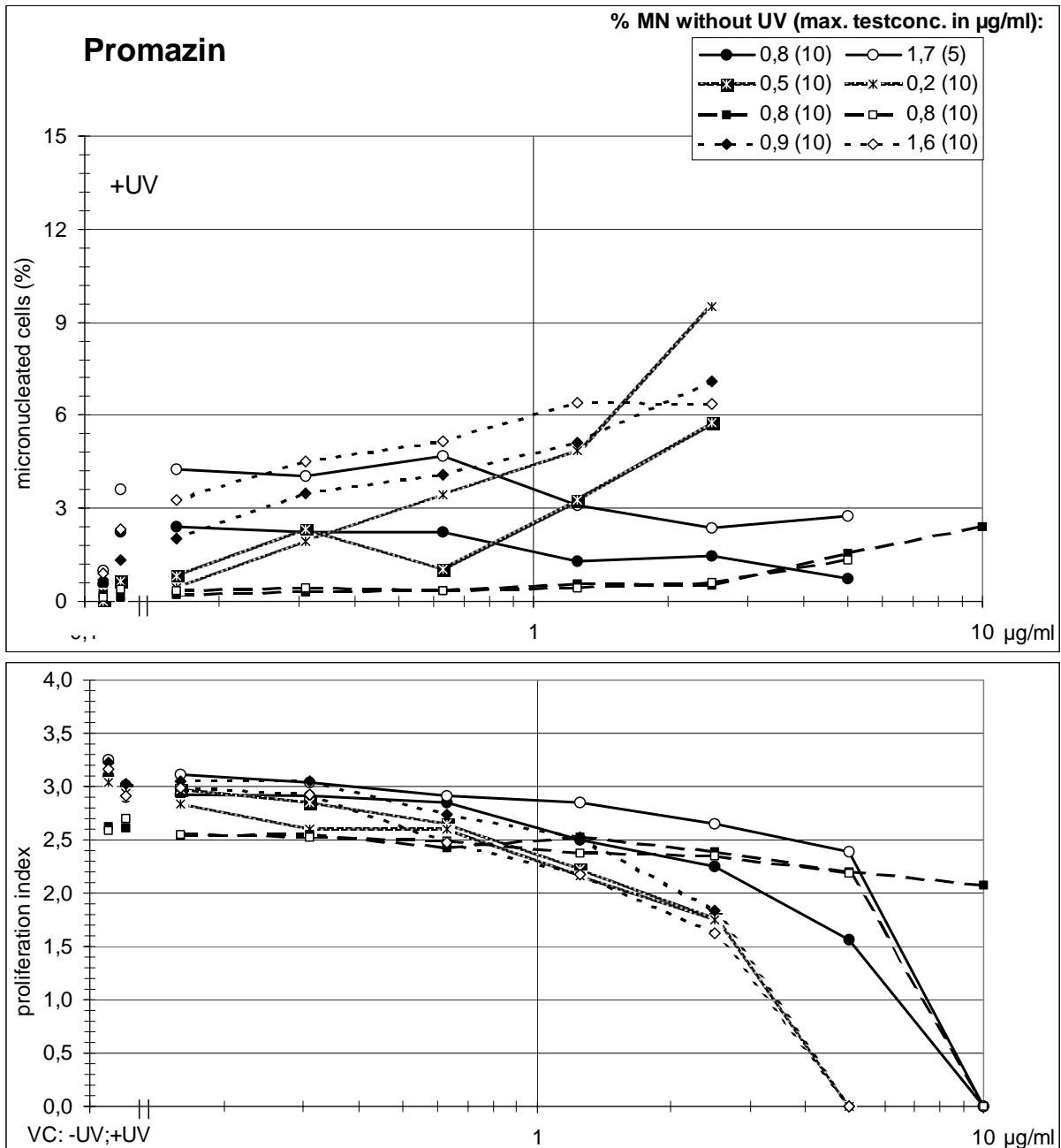


Abb. 29: Ergebnisse aus drei Labors (✕ ✕ Labor 1; ■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 4) mit **Ketoprofen** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

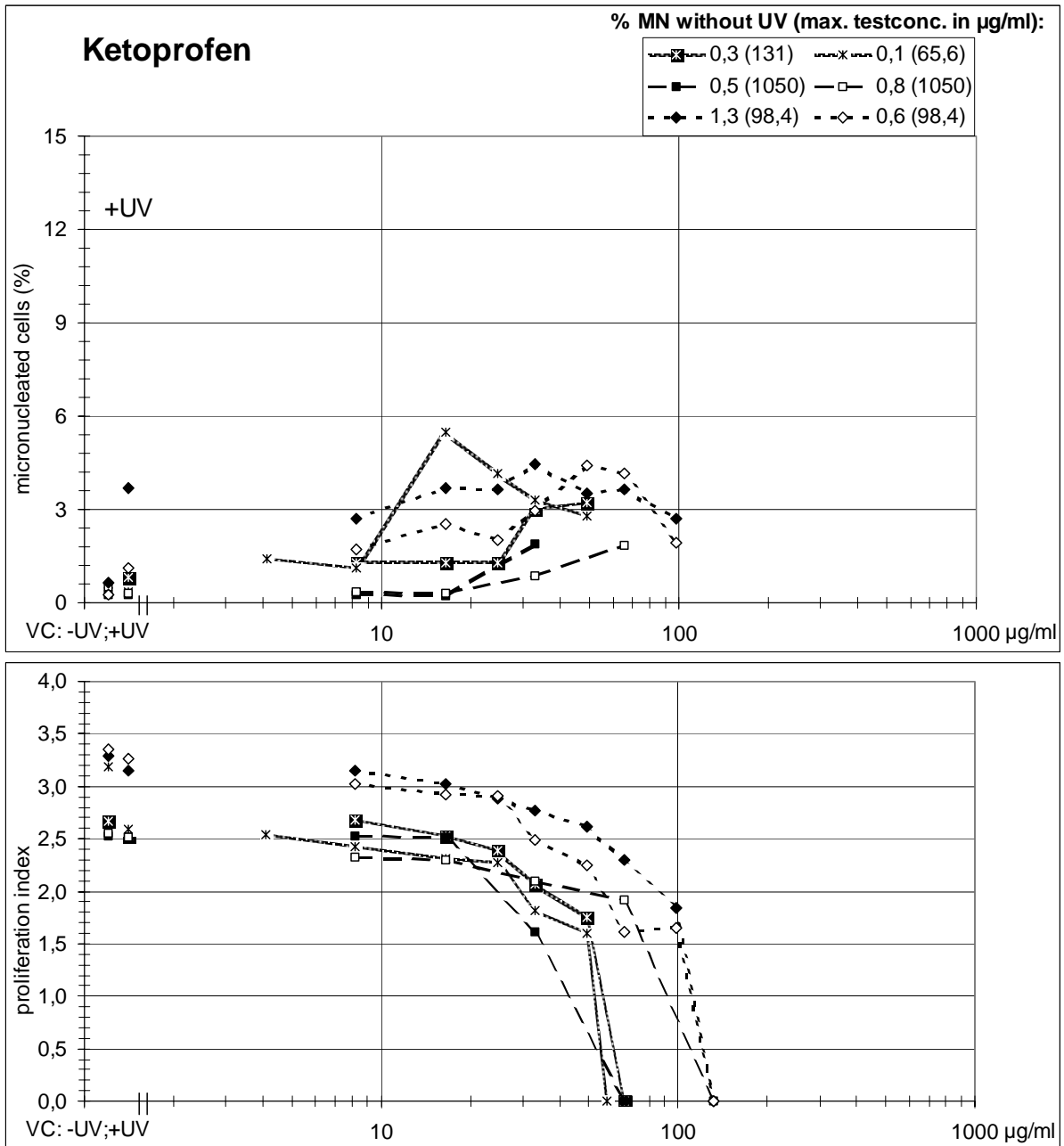


Abb. 30: Ergebnisse aus drei Labors (* Labor 1; • o Labor 2; ■ □ Labor 3) mit **Acridin** im Photo-**Mikrokern**test. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

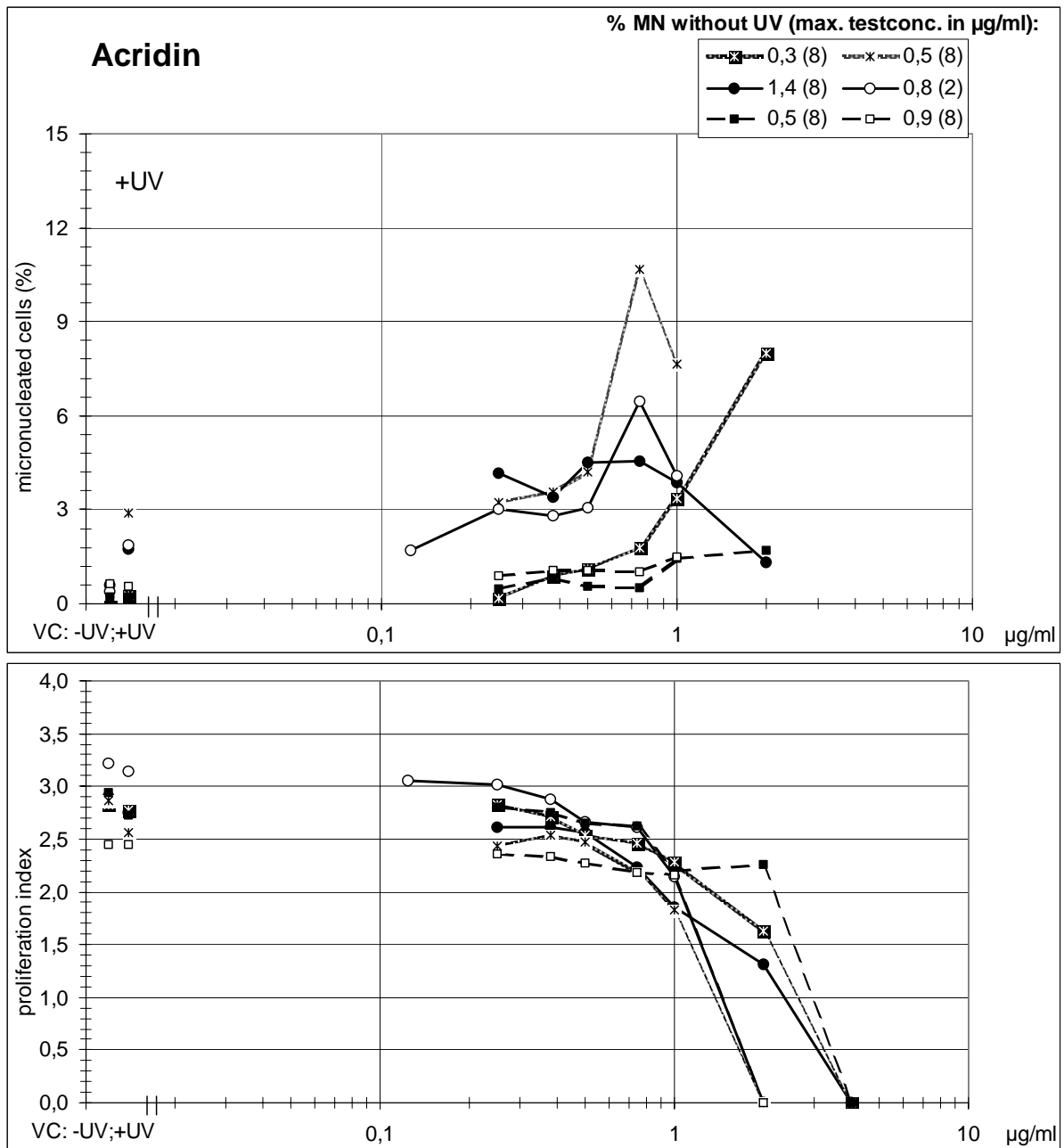


Abb. 31: Ergebnisse aus vier Labors (⊠ ⊠ Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 4) mit **Octylmethoxycinnamat** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

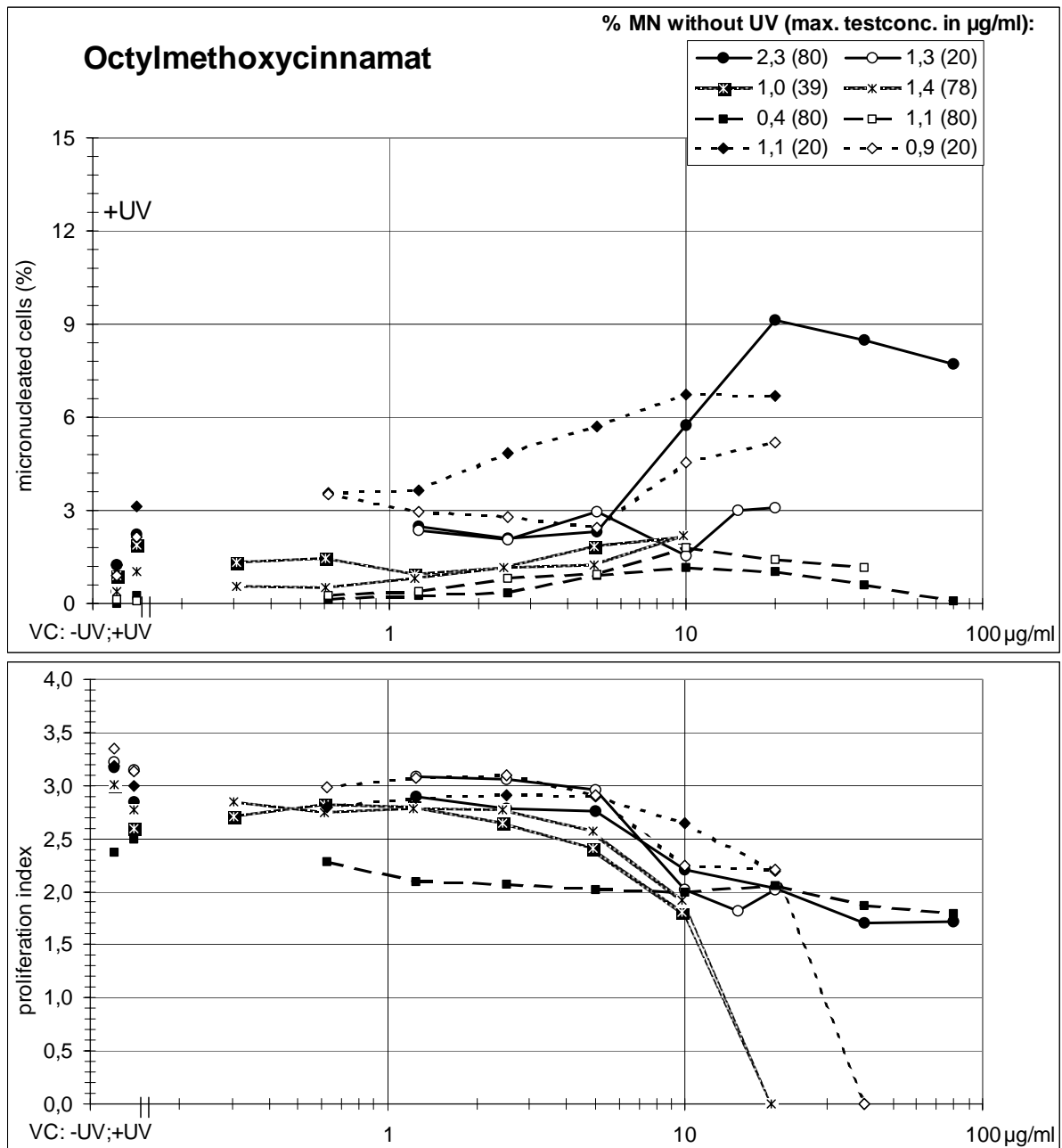


Abb. 32: Ergebnisse aus drei Labors (✱ ✱ Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3) mit **Titandioxid** im Photo-Mikrokerntest. Konzentrations-Wirkungskurven für Mikrokern-haltige Zellen in % in der oberen Grafik, für den Proliferationsindex in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die Mikrokernrate (in %) nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

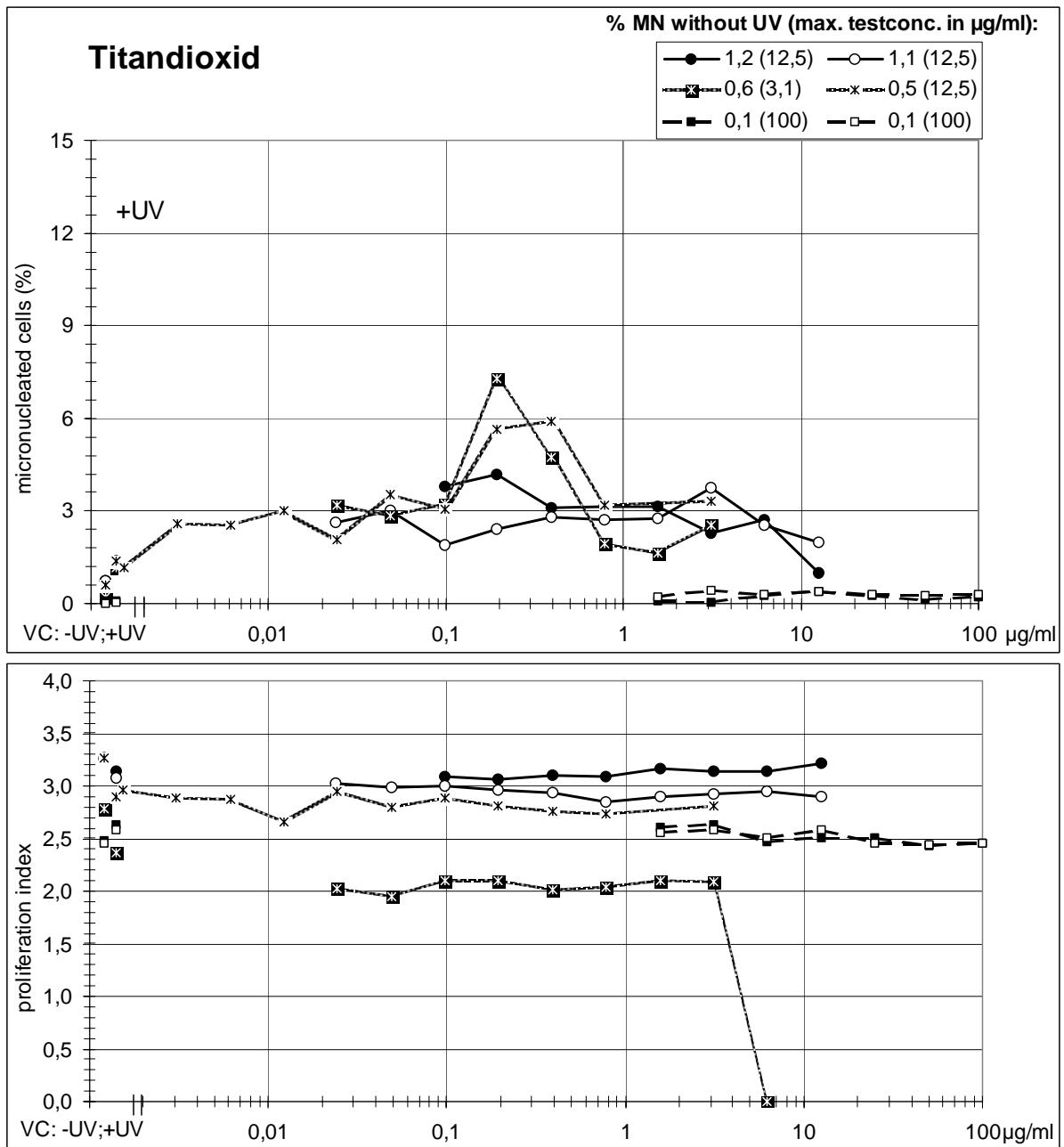


Abb. 33: Korrelation von Mikrokernraten und Proliferationsindices: Übersicht aller Einzelwerte des Photo-Mikrokerntests mit den Positiv-Substanzen (oben) und "Negativ"-Substanzen (unten).

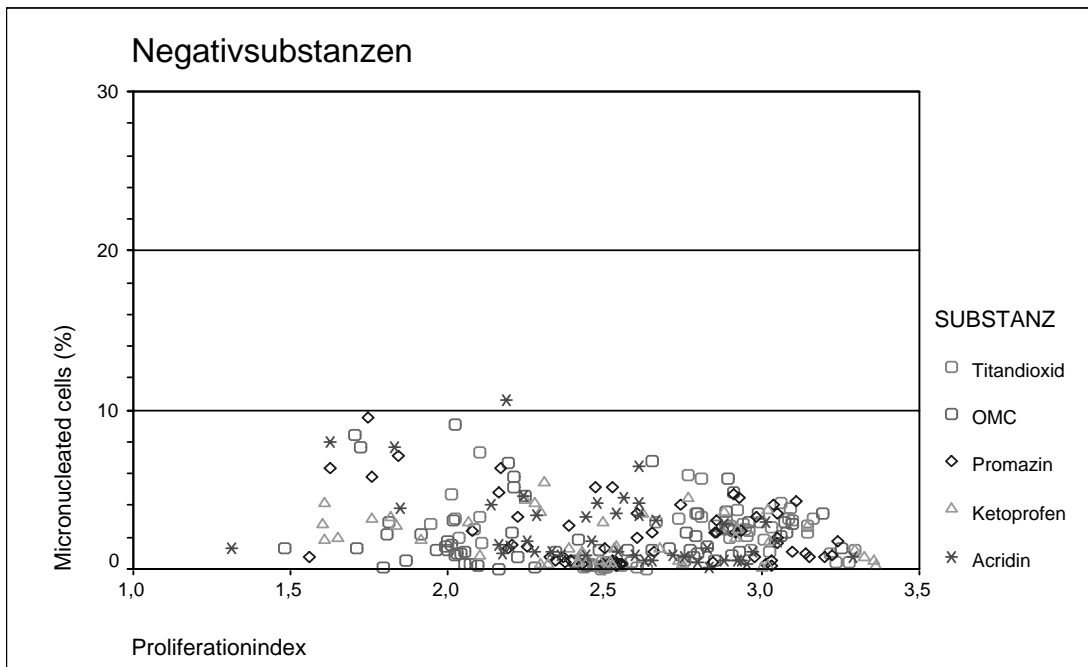
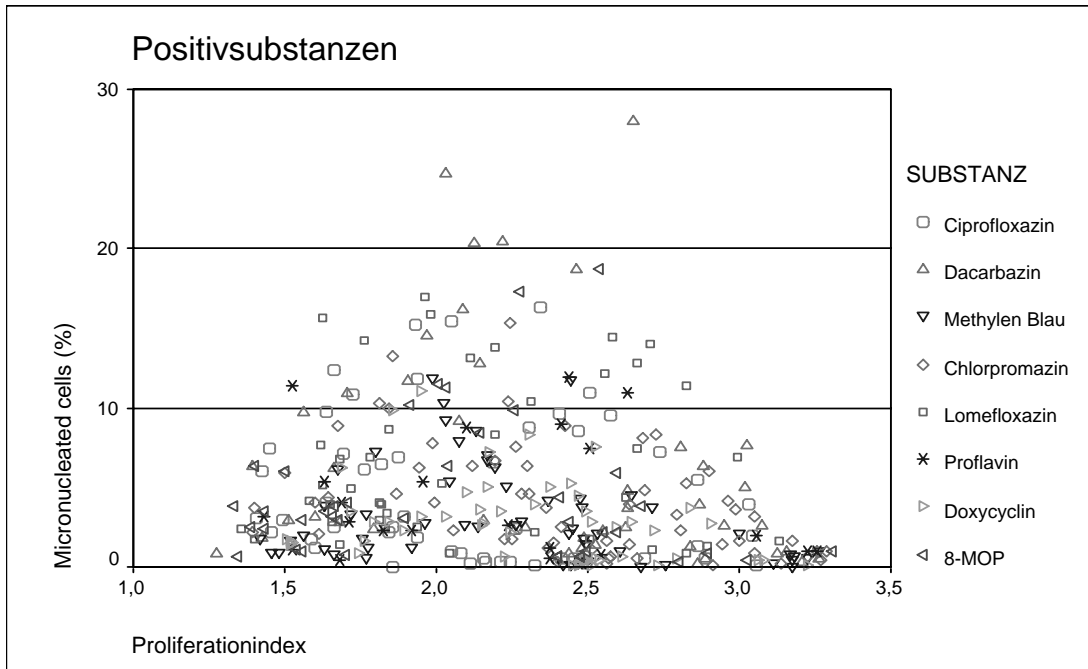


Abb. 34: Photo-Mikroerntest: Übersicht der Gesamtergebnisse mit allen 13 Testsubstanzen der Ringstudie.

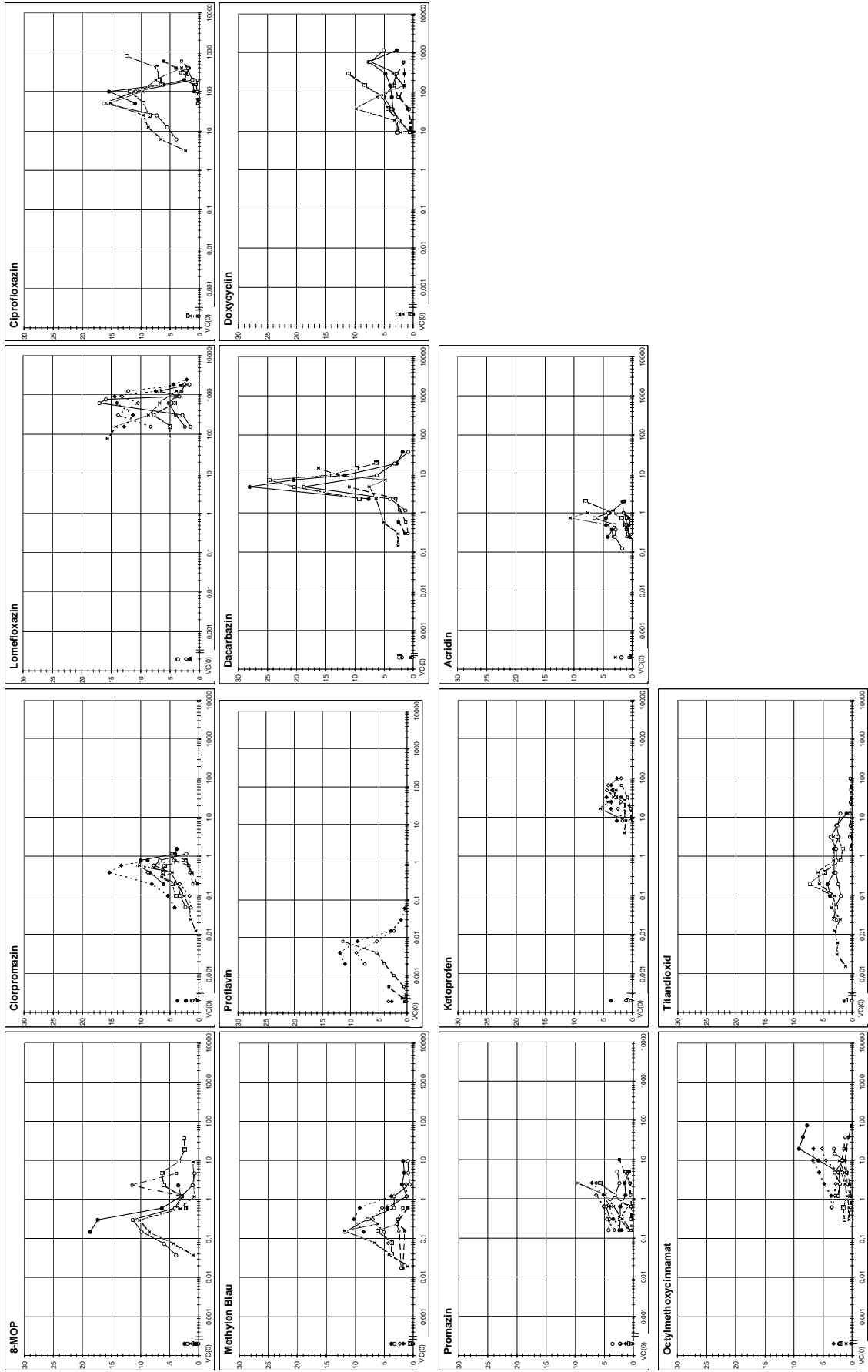


Abb. 35: Ergebnisse aus vier Labors (⊠ * Labor 1; ■ □ Labor 3; ▲ △ Labor 4; ⊕ + Labor 7) mit **8-Methoxypsoralen (8-MOP)** im Photo-Cometassay. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in µm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

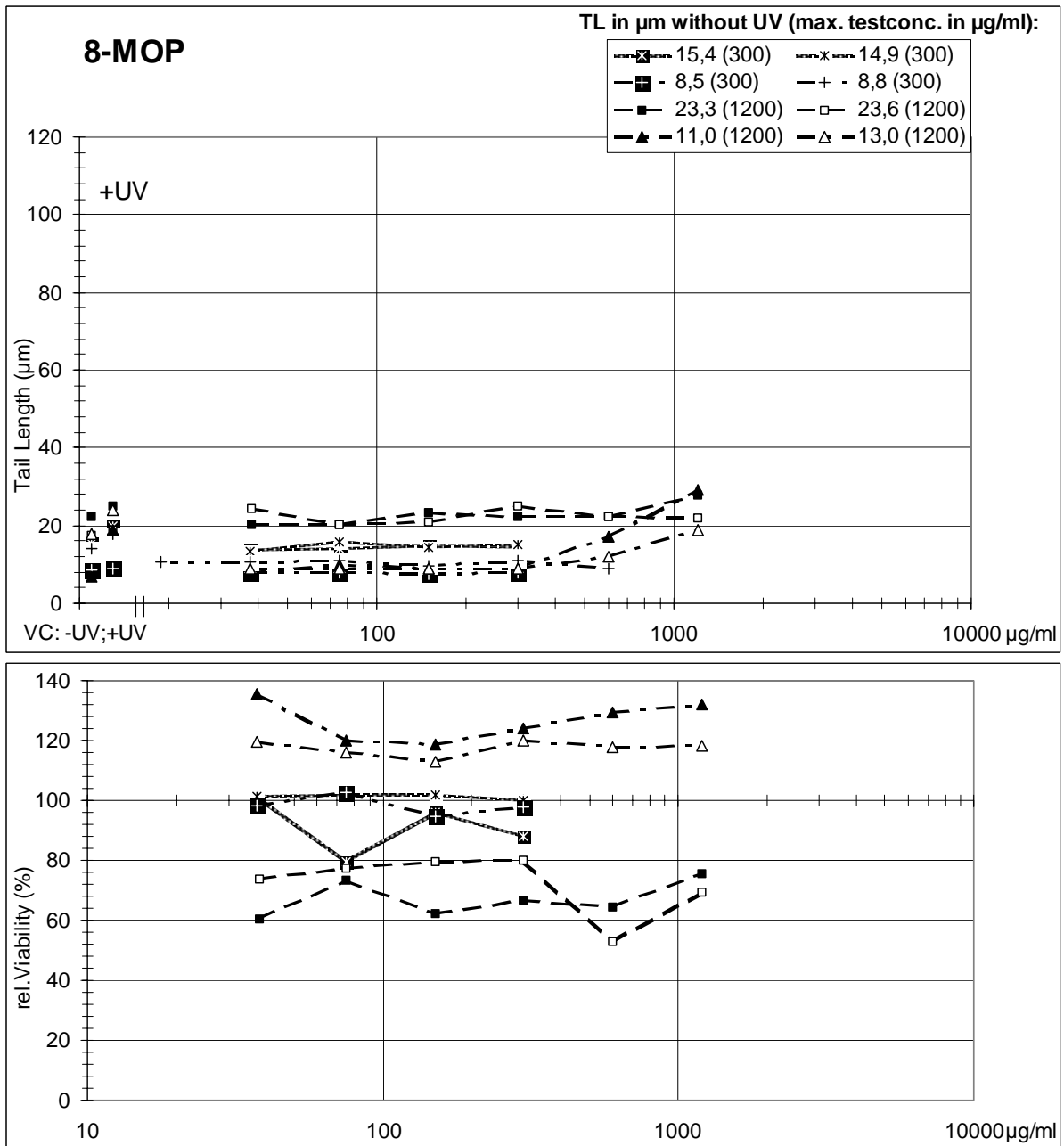


Abb. 36: Ergebnisse aus fünf Labors (⊗ * Labor 1; ● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3; ▲ △ Labor 4; ⊕ + Labor 7) mit **Chlorpromazin** im Photo-Cometassay. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in µm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

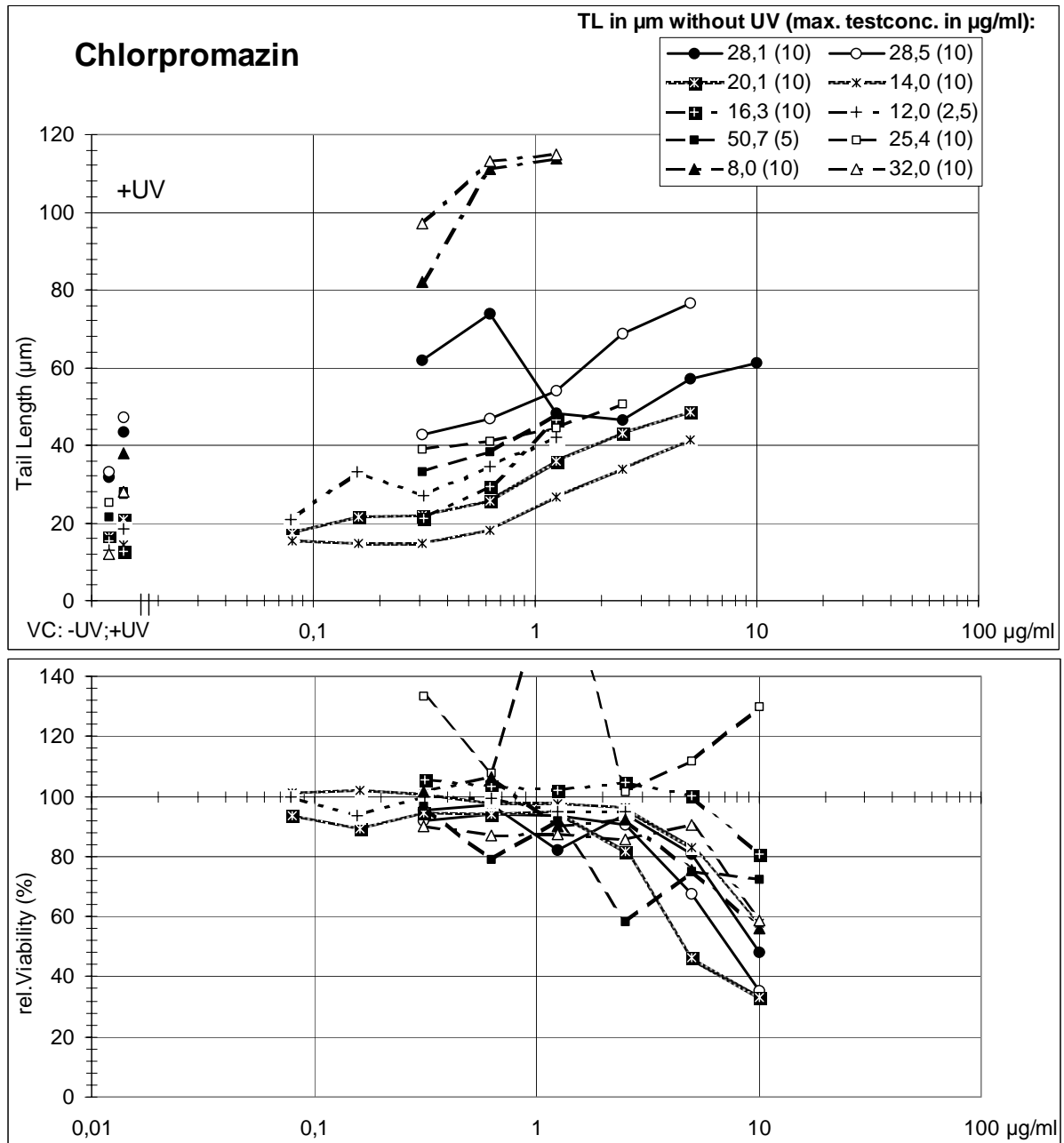


Abb. 37: Ergebnisse aus drei Labors (● ○ Labor 2; ◆ ◇ Labor 6; ■ + Labor 7) mit **Lomefloxazin** im Photo-Cometassay. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail- Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

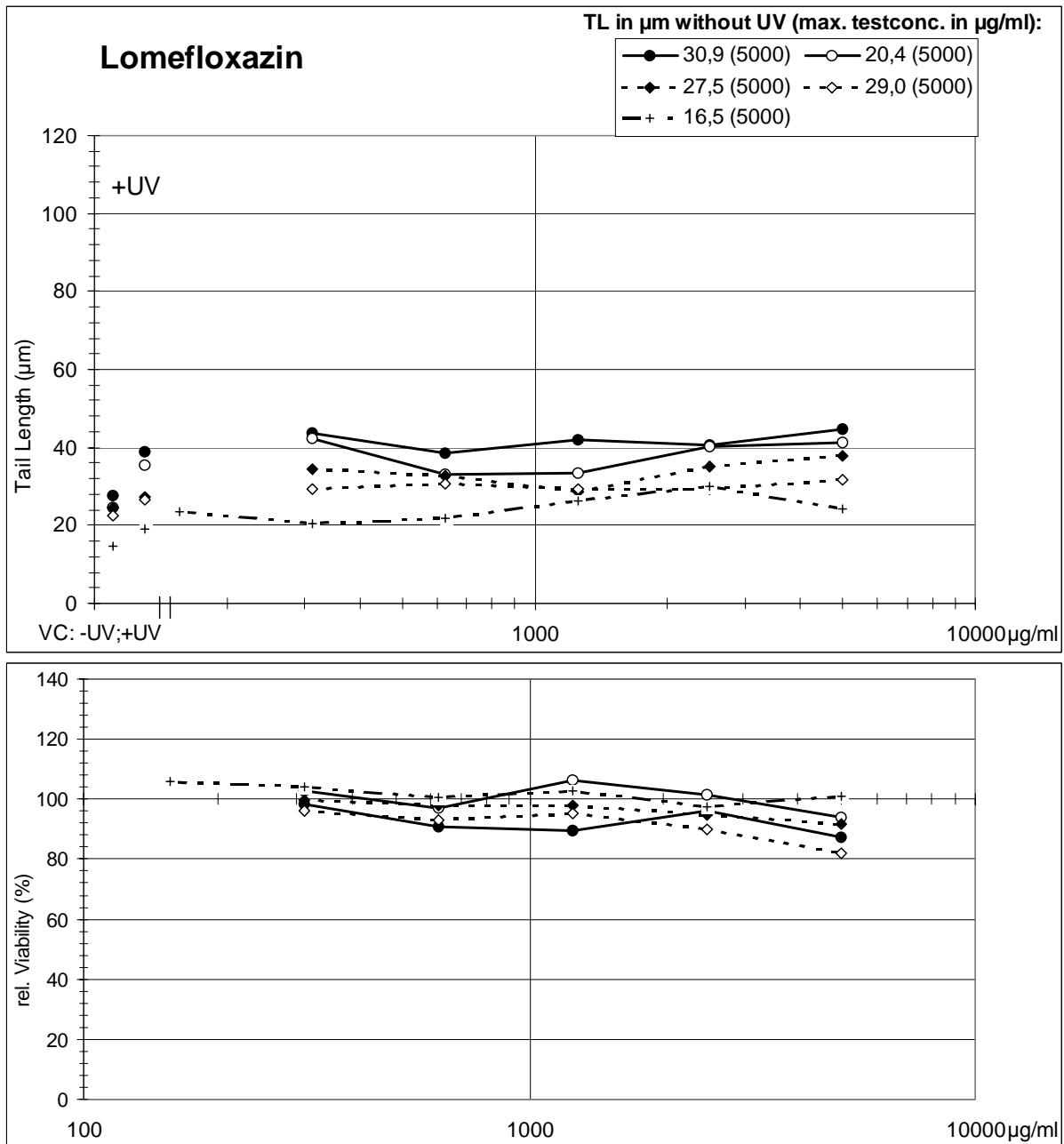


Abb. 38: Ergebnisse aus zwei Labors (☒ * Labor 1; ◆◇ Labor 6) mit **Ciprofloxazin** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in µm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

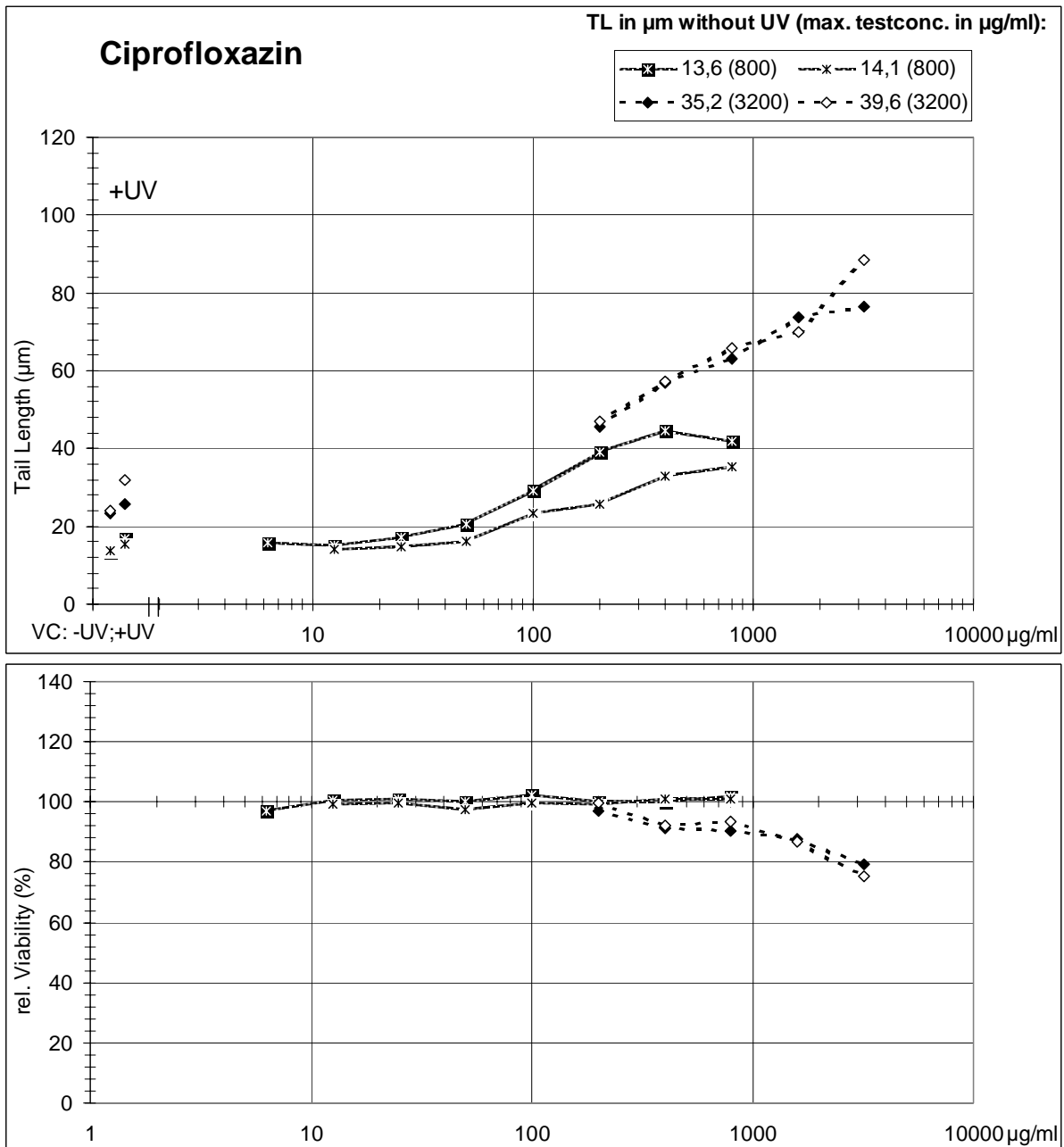


Abb. 39: Ergebnisse aus drei Labors (⊠ * Labor 1; ■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 6) mit **Methylen Blau** im Photo-Cometassay. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in µm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

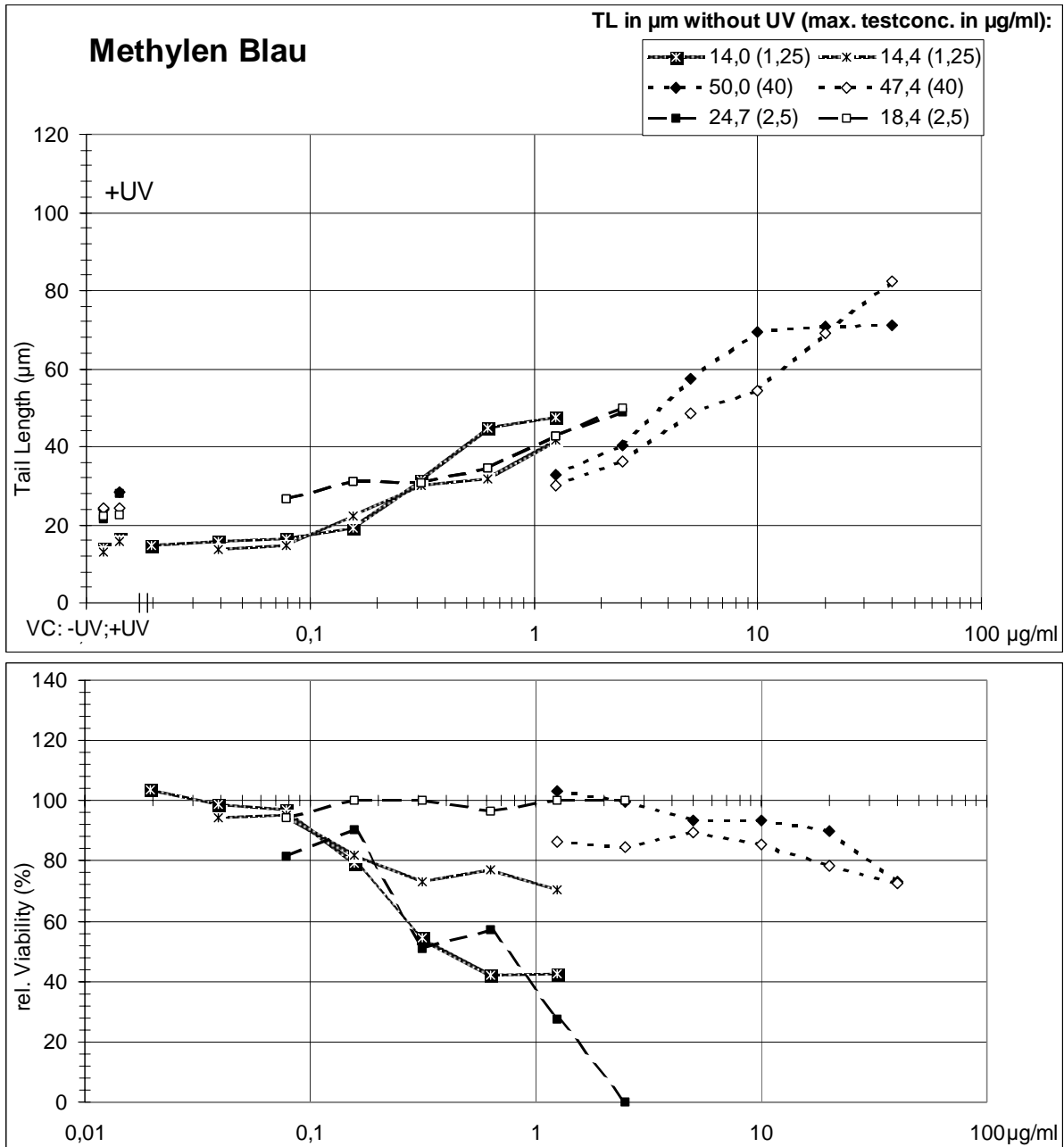


Abb. 40: Ergebnisse aus drei Labors (⊗ * Labor 1; ■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 6) mit **Proflavin** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

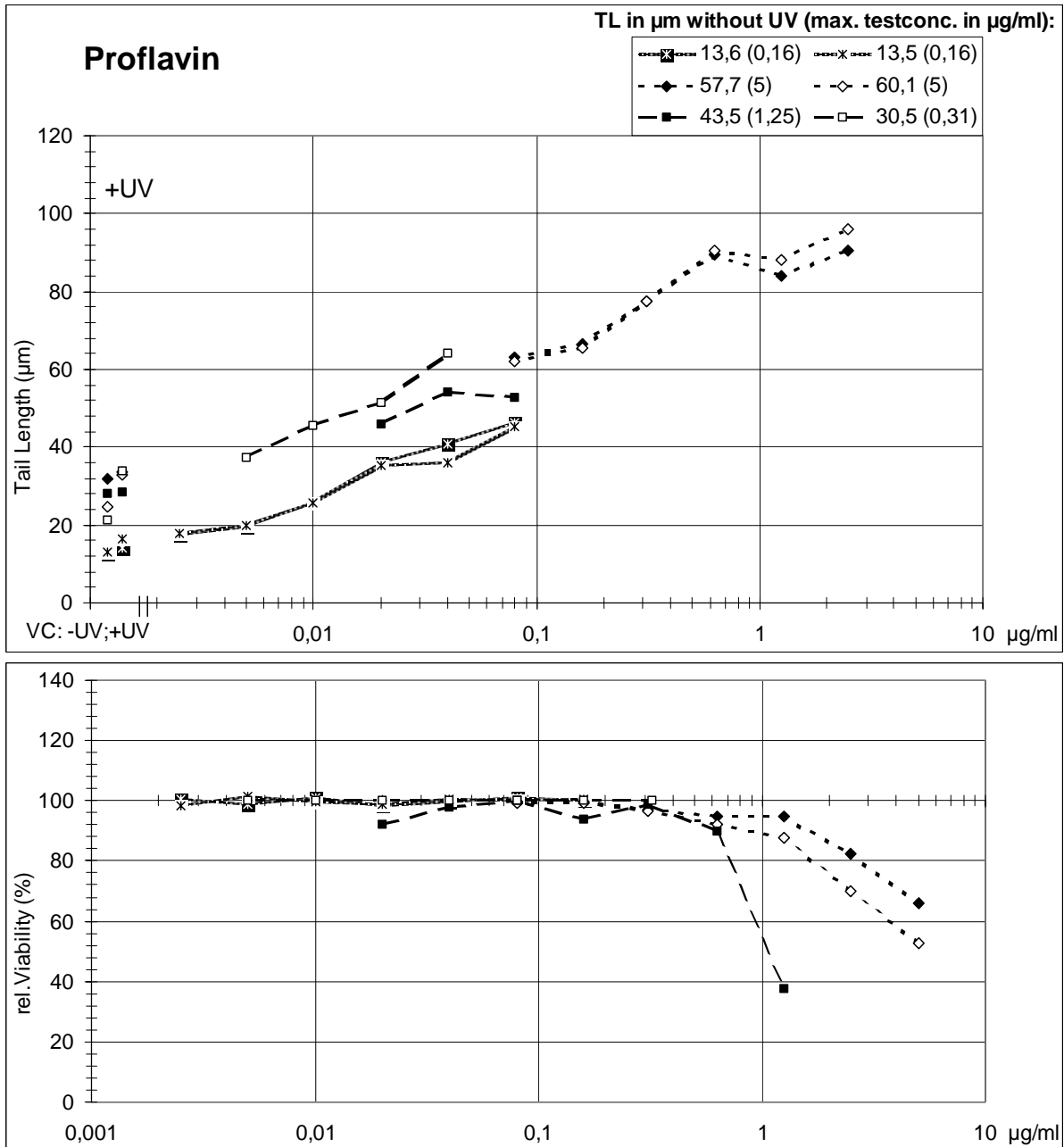


Abb. 41: Ergebnisse aus drei Labors (⊗ * Labor 1; ● ○ Labor 2; ⊕ + Labor 7) mit **Dacarbazin** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

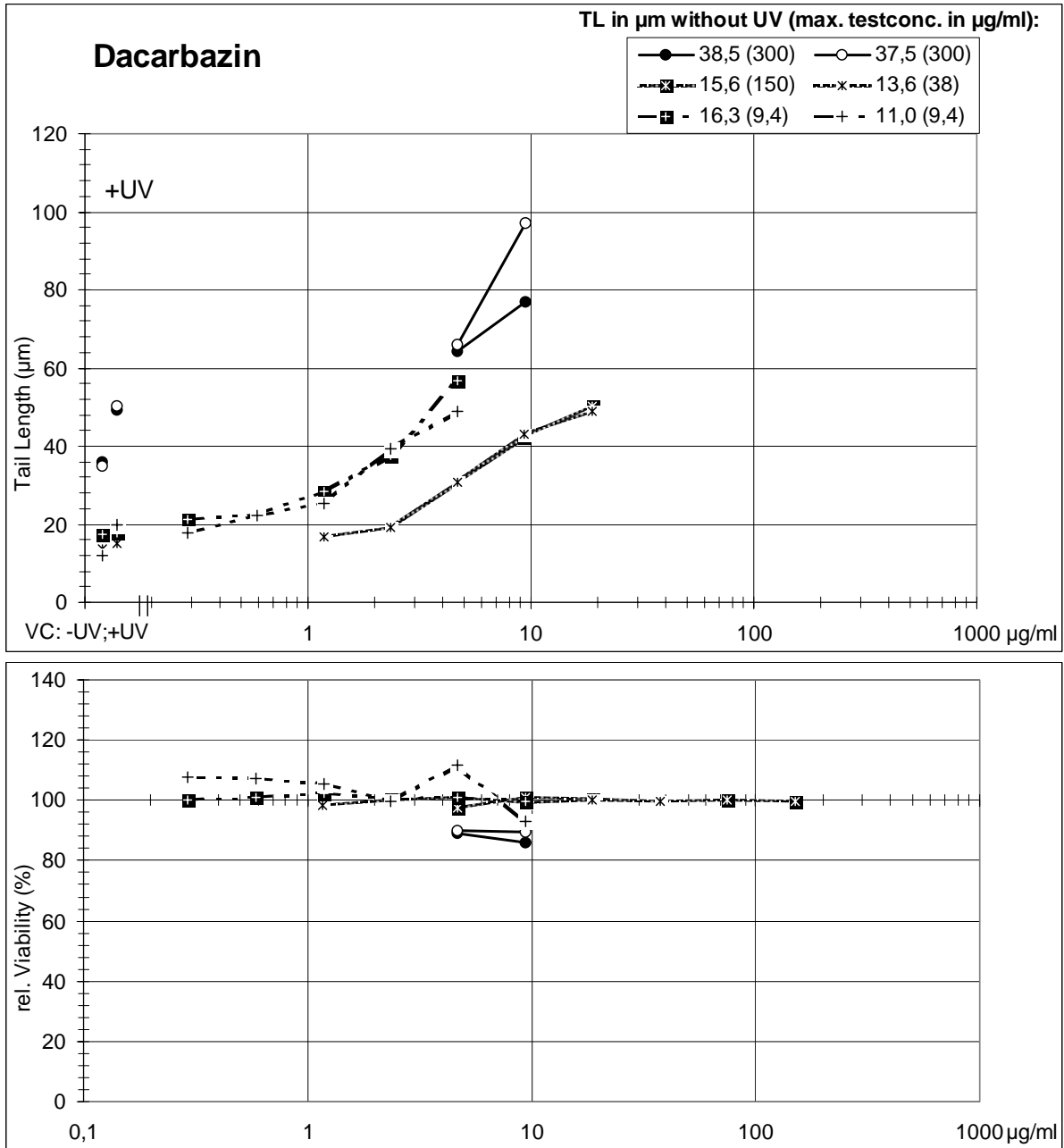


Abb. 42: Ergebnisse aus drei Labors (● ○ Labor 2; ■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 6;) mit **Doxycyclin** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

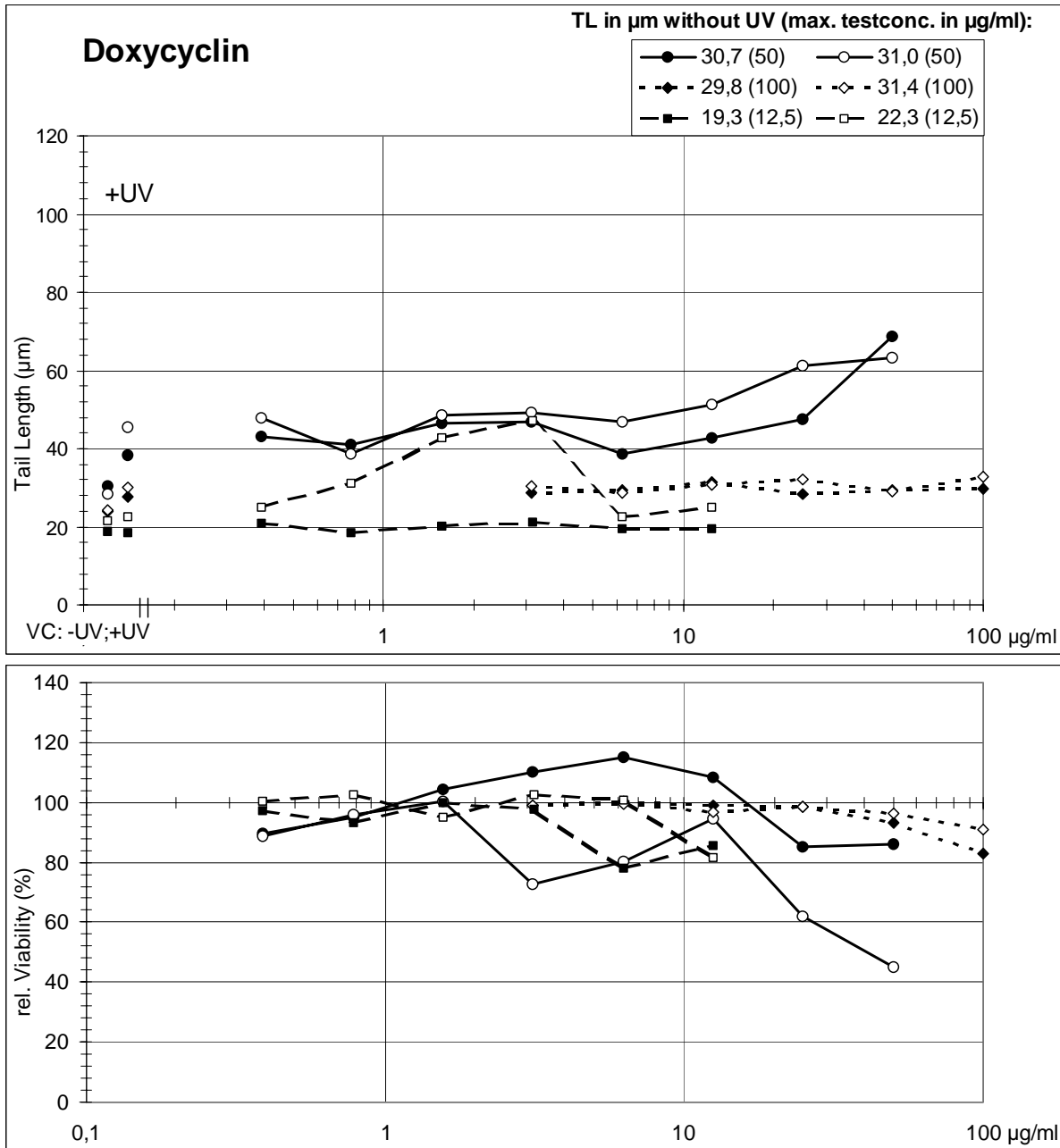


Abb. 43: Ergebnisse aus drei Labors (■ □ Labor 3; ◆ ◇ Labor 6; + Labor 7) mit **Promazin** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

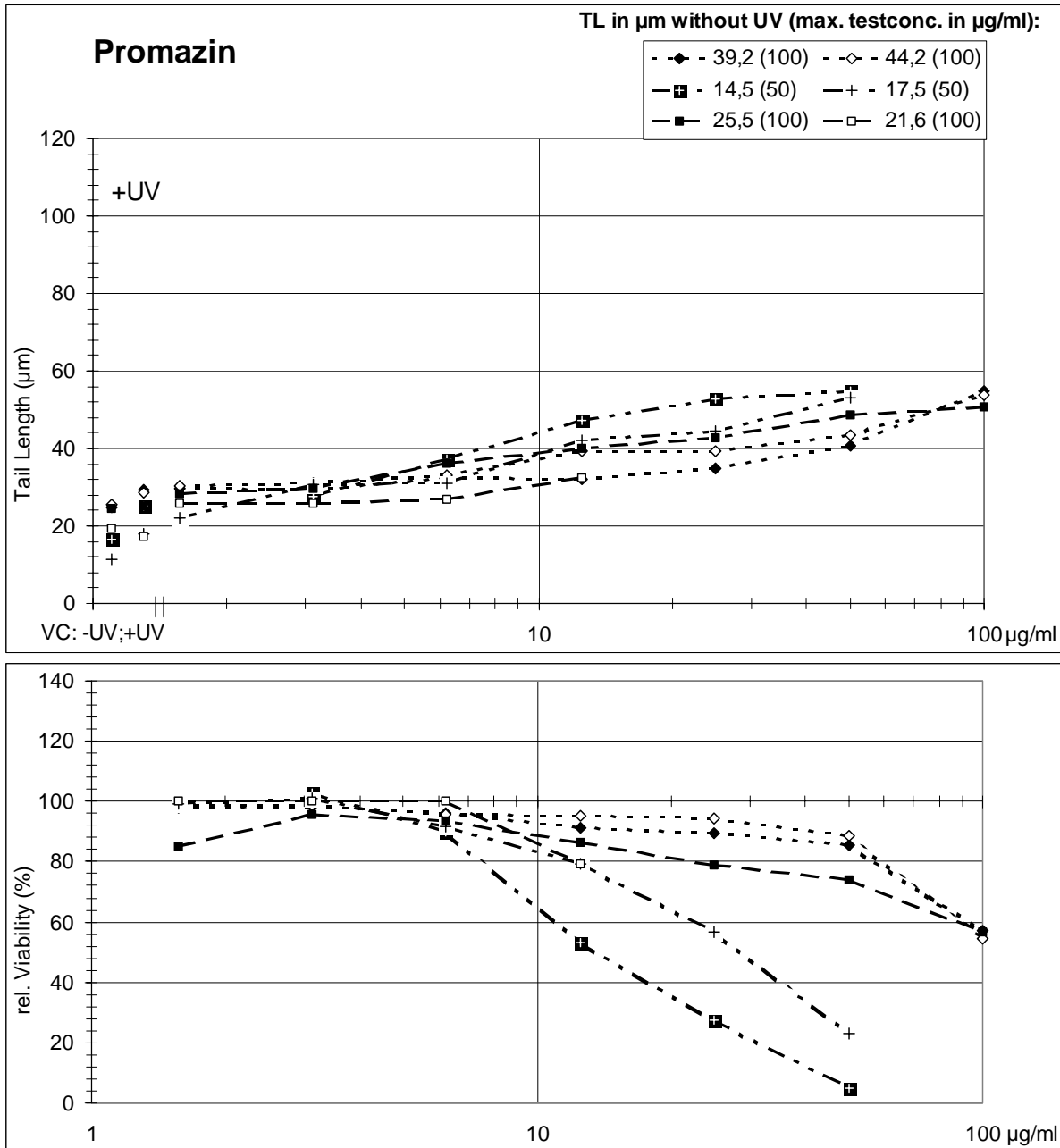


Abb. 44: Ergebnisse aus drei Labors (⊗ * Labor 1; ● ○ Labor 2; ◆ ◇ Labor 6) mit **Ketoprofen** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

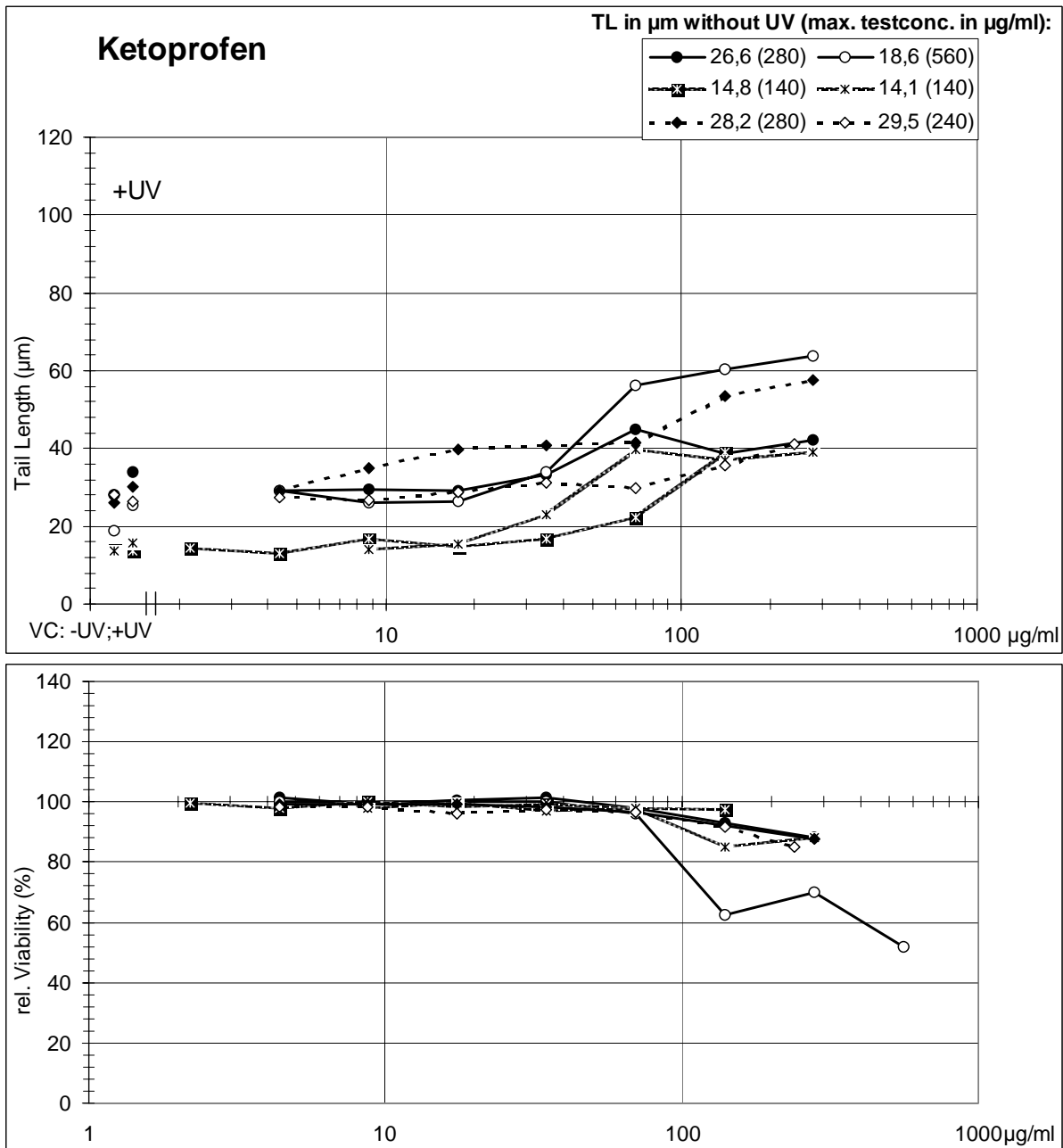


Abb. 45: Ergebnisse aus drei Labors (⊗ * Labor 1; ■ □ Labor 3; ⊕ + Labor 7) mit **Acridin** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in µm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

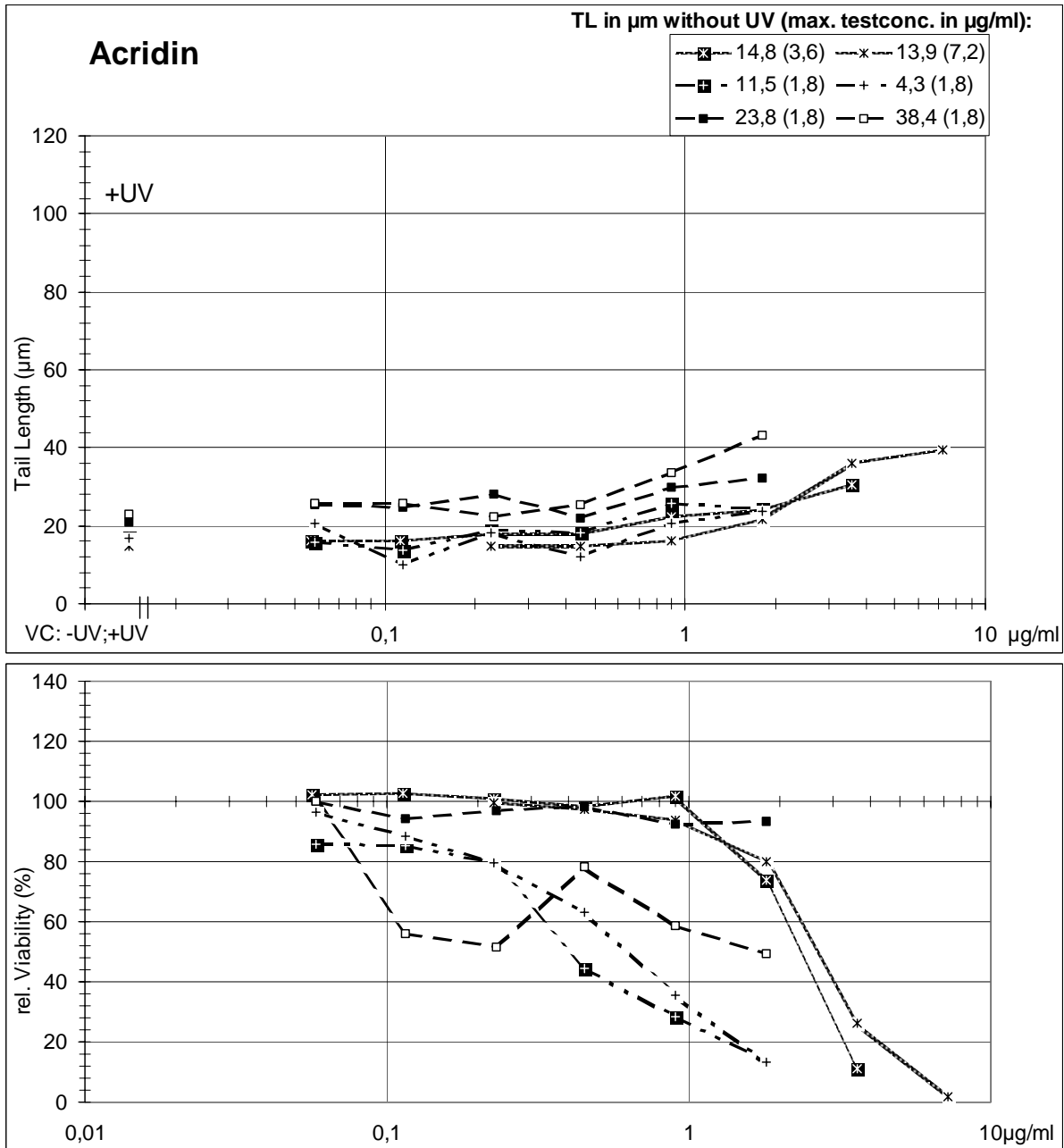


Abb. 46: Ergebnisse aus vier Labors (✱ ✱ Labor 1; ■ □ Labor 3; ▲ △ Labor 4; ◆ ◇ Labor 6;) mit **Octylmethoxycinnamat** im Photo-Cometassay. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in µm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in µg/ml). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

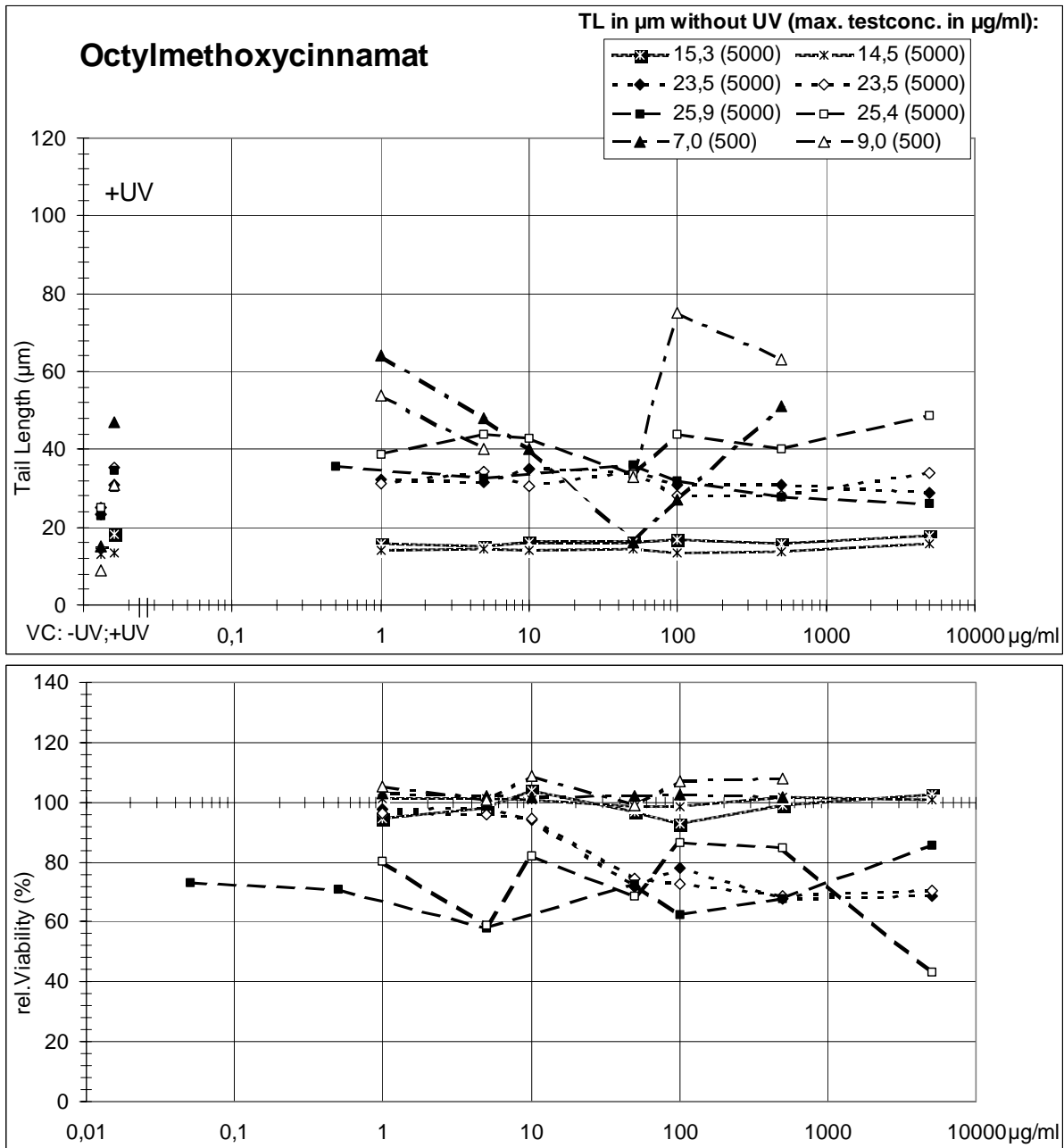


Abb. 47: Ergebnisse aus drei Labors (● ○ Labor 2; ◆ ◇ Labor 6; ■ + Labor 7) mit **Titandioxid** im Photo-**Cometassay**. Konzentrations-Wirkungskurven für die Tail-Length (TL) in μm in der oberen Grafik, für relative Viabilität im Trypanblau-Test in der unteren Grafik. Das Insert oben rechts zeigt die TL nach Behandlung mit Testsubstanz ohne UV-Bestrahlung in der im jeweiligen Labor verwendeten höchsten Testkonzentration (in Klammern in $\mu\text{g/ml}$). VC: -UV; +UV = Vehikelkontrolle ohne und mit UV-Bestrahlung. Die hellen und dunklen Symbole repräsentieren den jeweils 1. und 2. Run eines Labors.

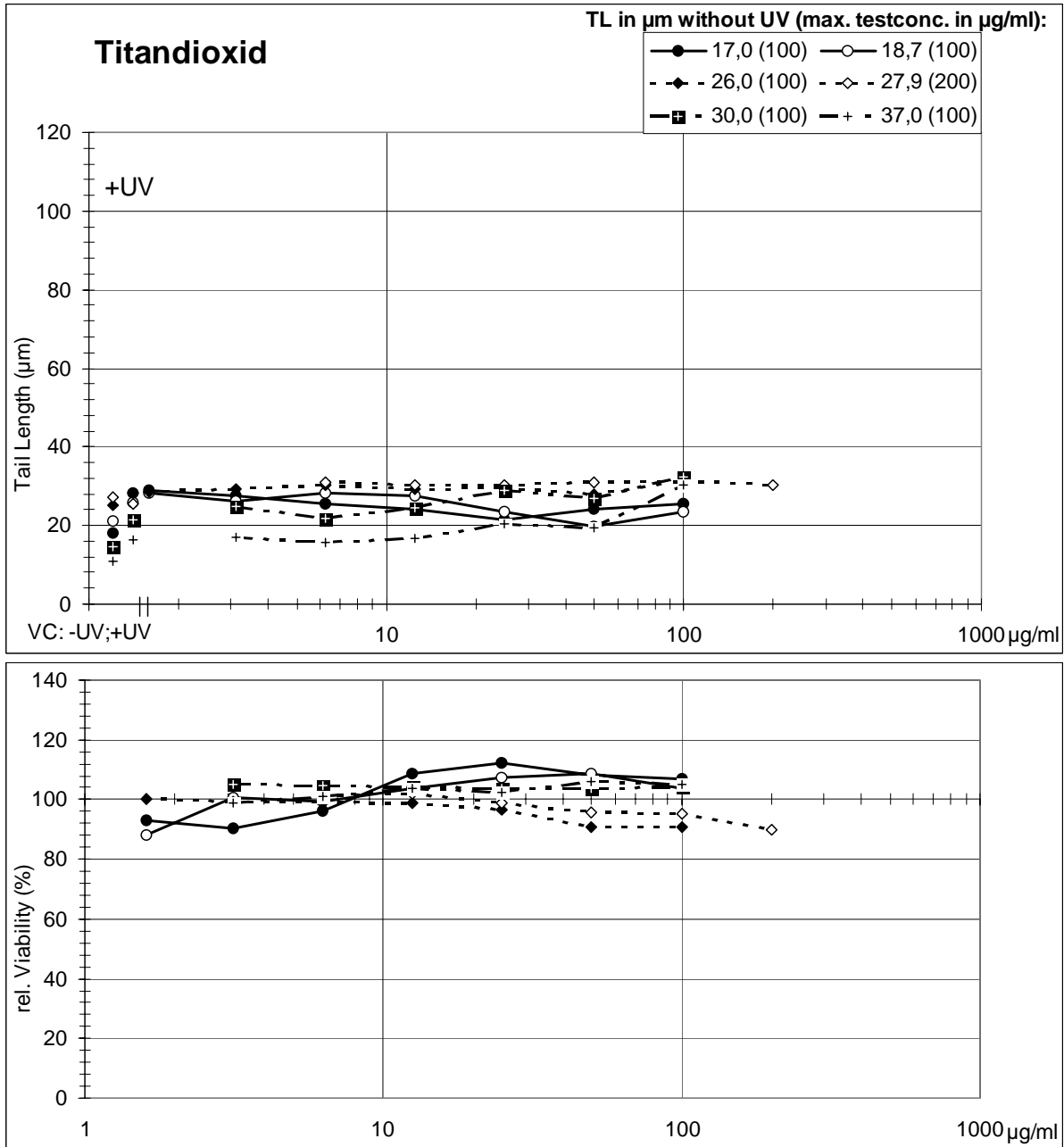


Abb. 48: Photo-Cometassay: Übersicht der Gesamtergebnisse mit allen 13 Testsubstanzen der Ringstudie.



Abb. 49: Box-Whisker-Plots für die Darstellung der akkumulierten Kontrollwerte der Mikrokernraten im Photo-Mikrokerntest von vier Labors. C(-UV) = unbestrahlte Vehikelkontrolle; C (+UV) = UV-bestrahlte Vehikelkontrolle; PC 0,3/ PC 0,6 = Chlorpromazin 0,3 µg/ml bzw. 0,6 µg/ml (Positivkontrolle). Zahlen unter der X-Achse zeigen Anzahl der Versuche (n).

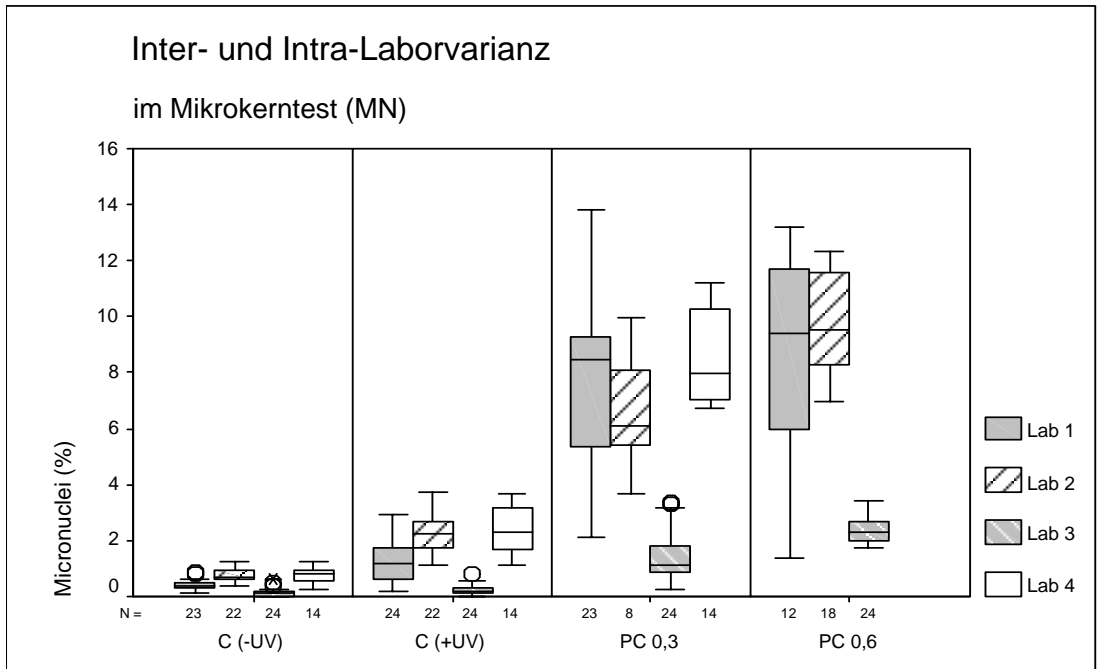
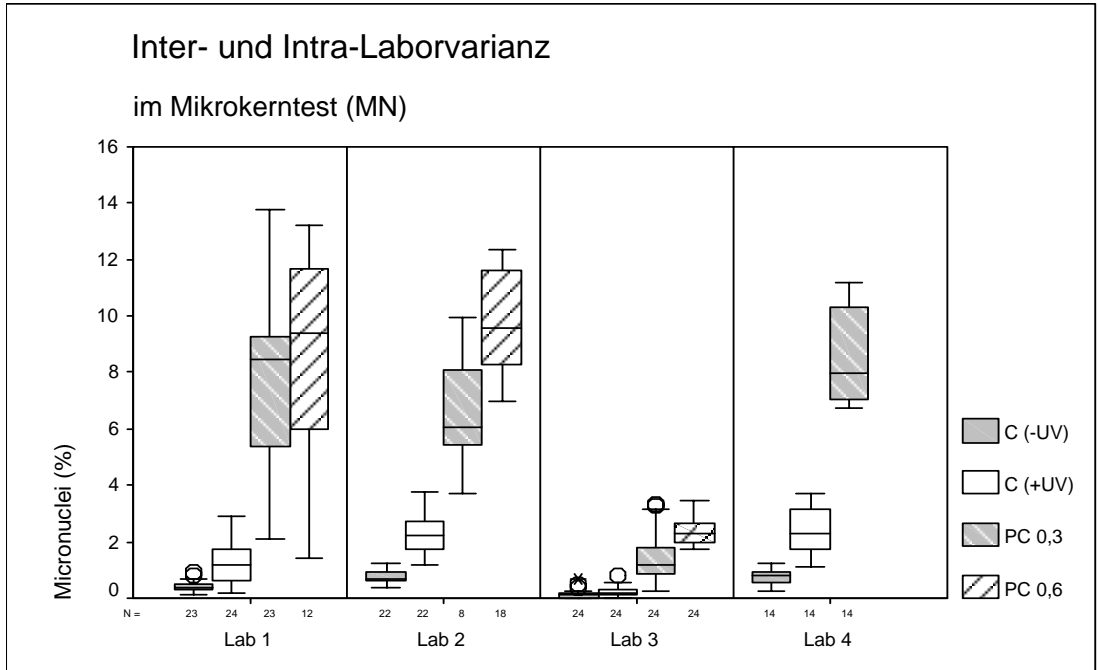


Abb. 50: Box-Whisker-Plots für die Darstellung der akkumulierten Kontrollwerte der Proliferationsindices im Photo-Mikrokerntest von vier Labors. C(-UV) = unbestrahlte Vehikelkontrolle; C (+UV) = UV-bestrahlte Vehikelkontrolle; PC 0,3/ PC 0,6 = Chlorpromazin 0,3 µg/ml bzw. 0,6 µg/ml (Positivkontrolle). Zahlen unter der X-Achse zeigen Anzahl der Versuche (n).

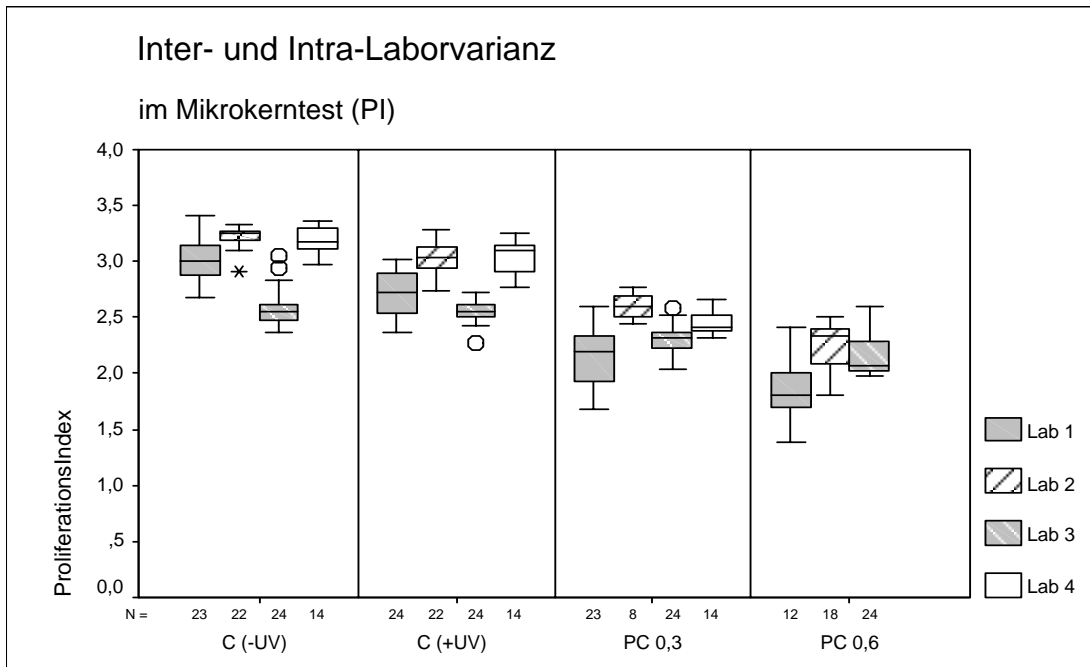
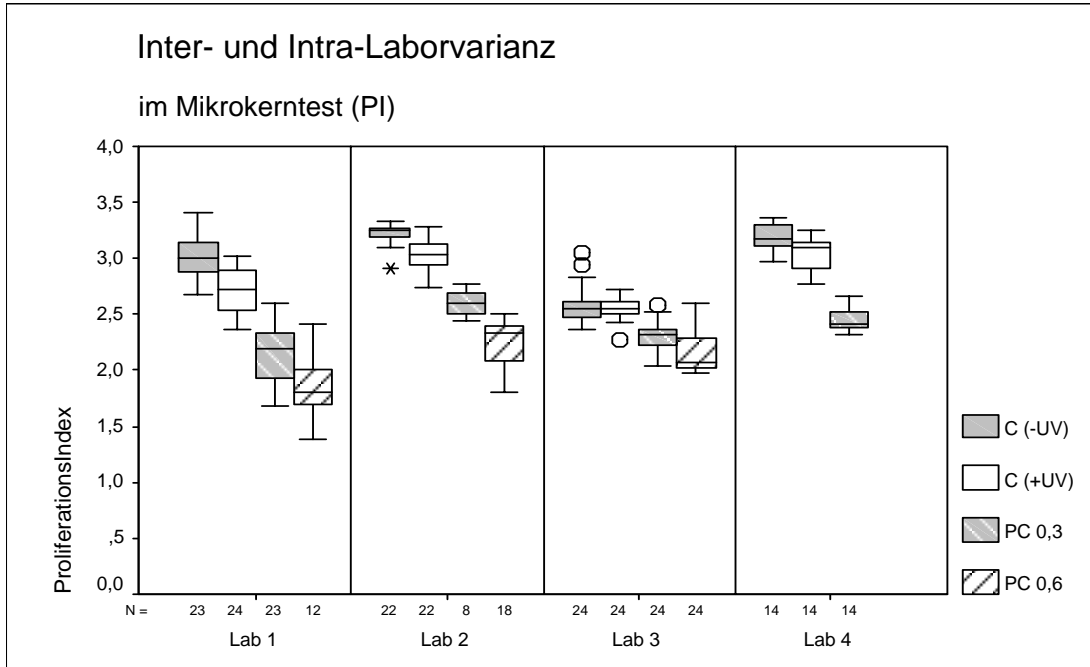


Abb. 51: Box-Plots für die Darstellung der akkumulierten Kontrollwerte der Tail-Length (TL) im Photo-Cometassay von sechs Labors. C(-UV) = unbestrahlte Vehikelkontrolle; C (+UV) = UV-bestrahlte Vehikelkontrolle; PC x = Chlorpromazin x µg/ml (Positivkontrolle). Zahlen unter der X-Achse zeigen Anzahl der Versuche (n).

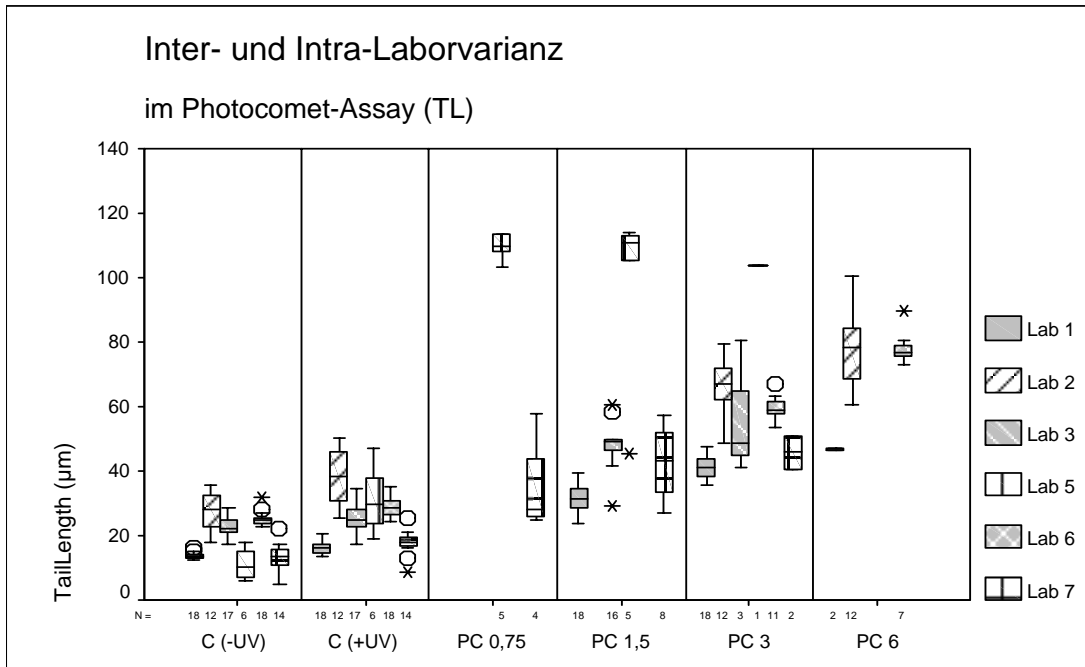
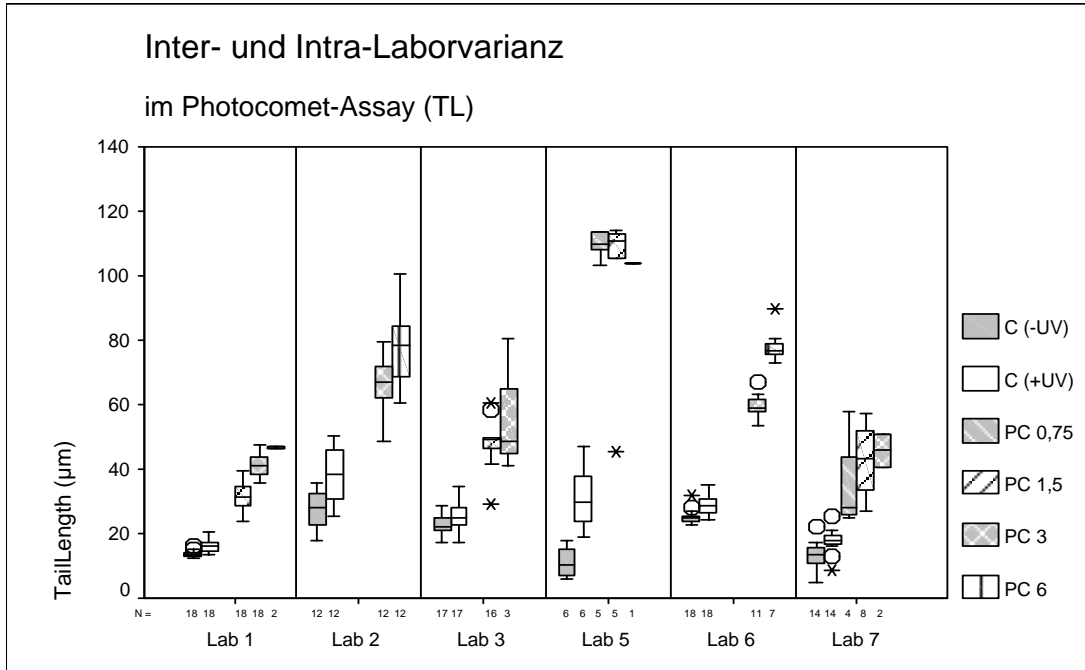


Abb. 52: Übersicht Konzentrations-Wirkungskurven Photo-Genotoxizität Positivsubstanzen: Vergleich Mikrokerntest (% MN, links) und Cometassay (TL, rechts)

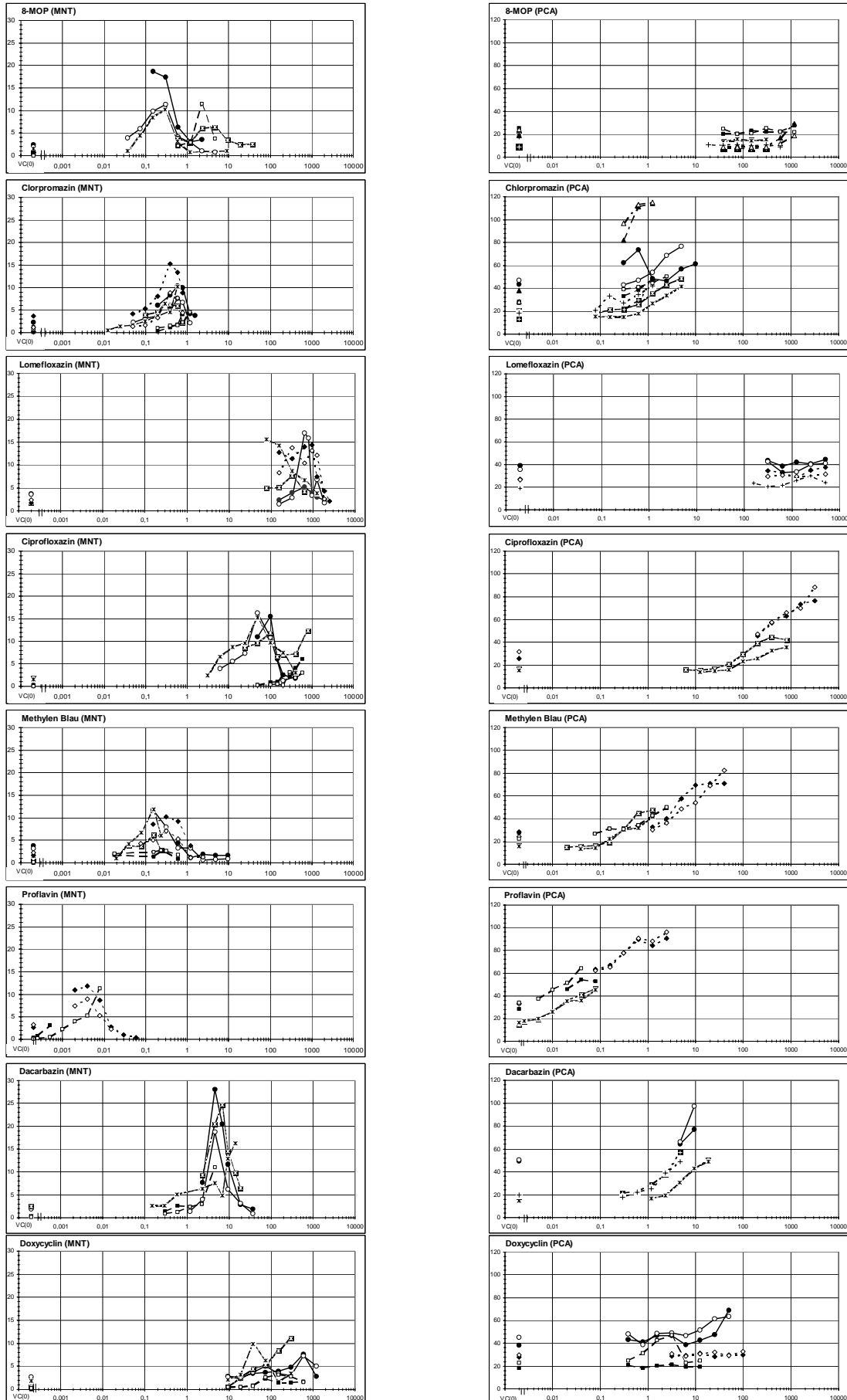


Abb. 53: Übersicht Konzentrations-Wirkungskurven Photo-Genotoxizität "Negativ"-substanzen: Vergleich Mikrokerntest (% MN, links) und Cometassay (TL, rechts)

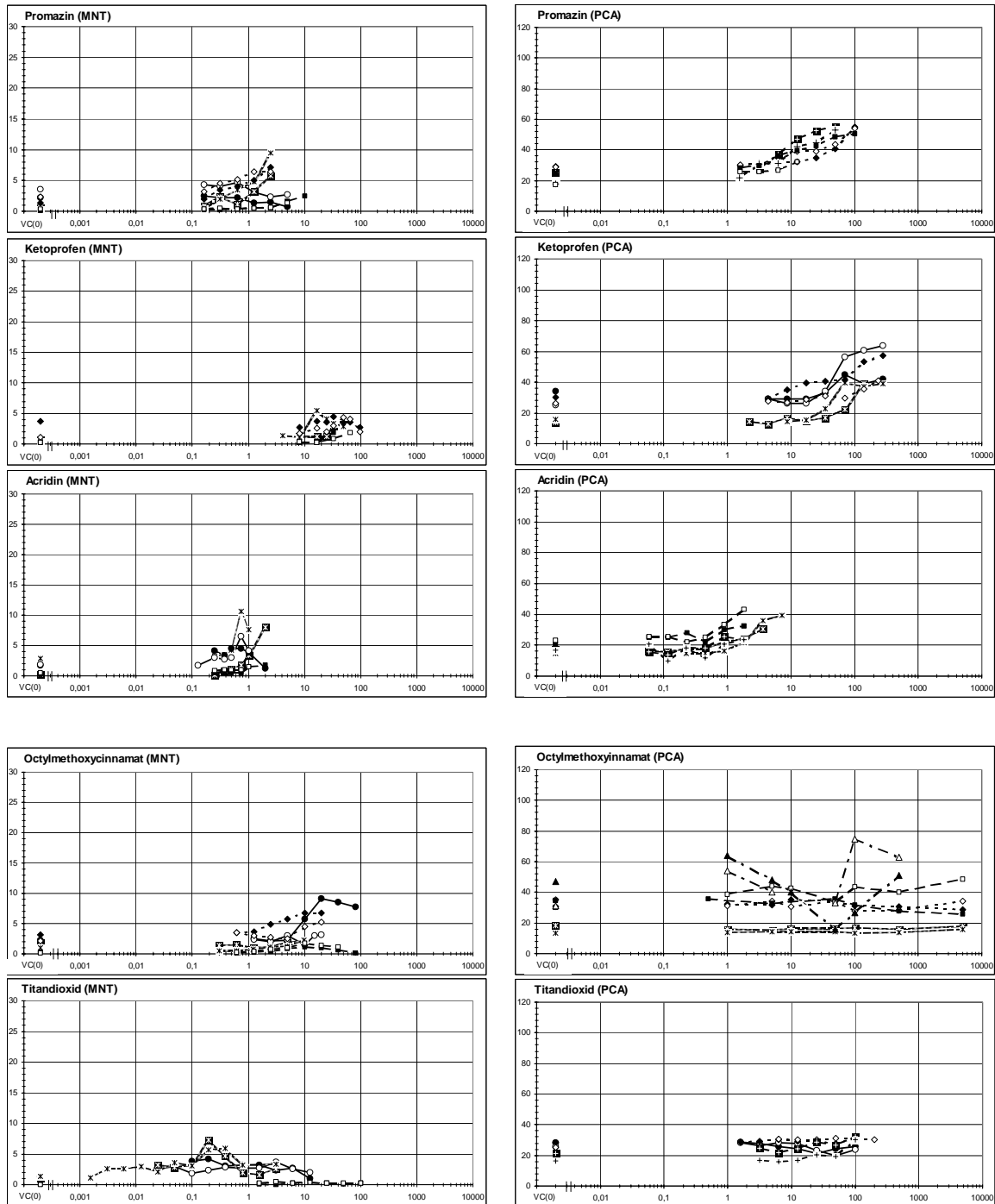


Abb. 54: Evaluation der empirischen Modelle mit einer 2x2-Kontingenztafel: a) Photo-Mikrokerntest, alle Daten; b) Photo-Cometassay, ohne 8-MOP, das erwartungsgemäß Fehlklassifikationen zeigte.

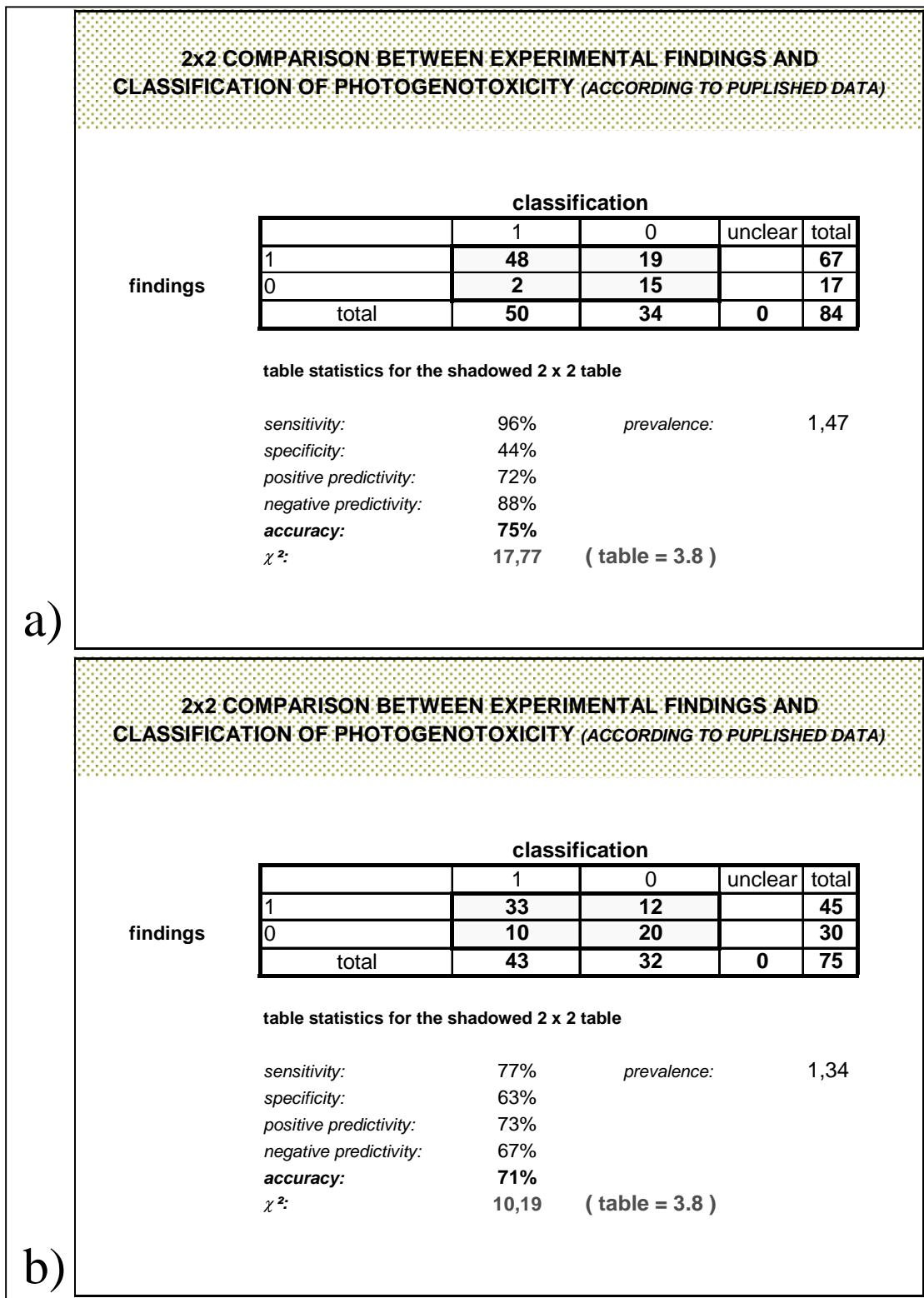


Abb. 55: Evaluation der biometrischen, mittels Diskriminanzanalyse ermittelten Prädiktionsmodelle PMT 3 (a) und PCA 2 (b) mit einer 2x2-Kontingenztafel.

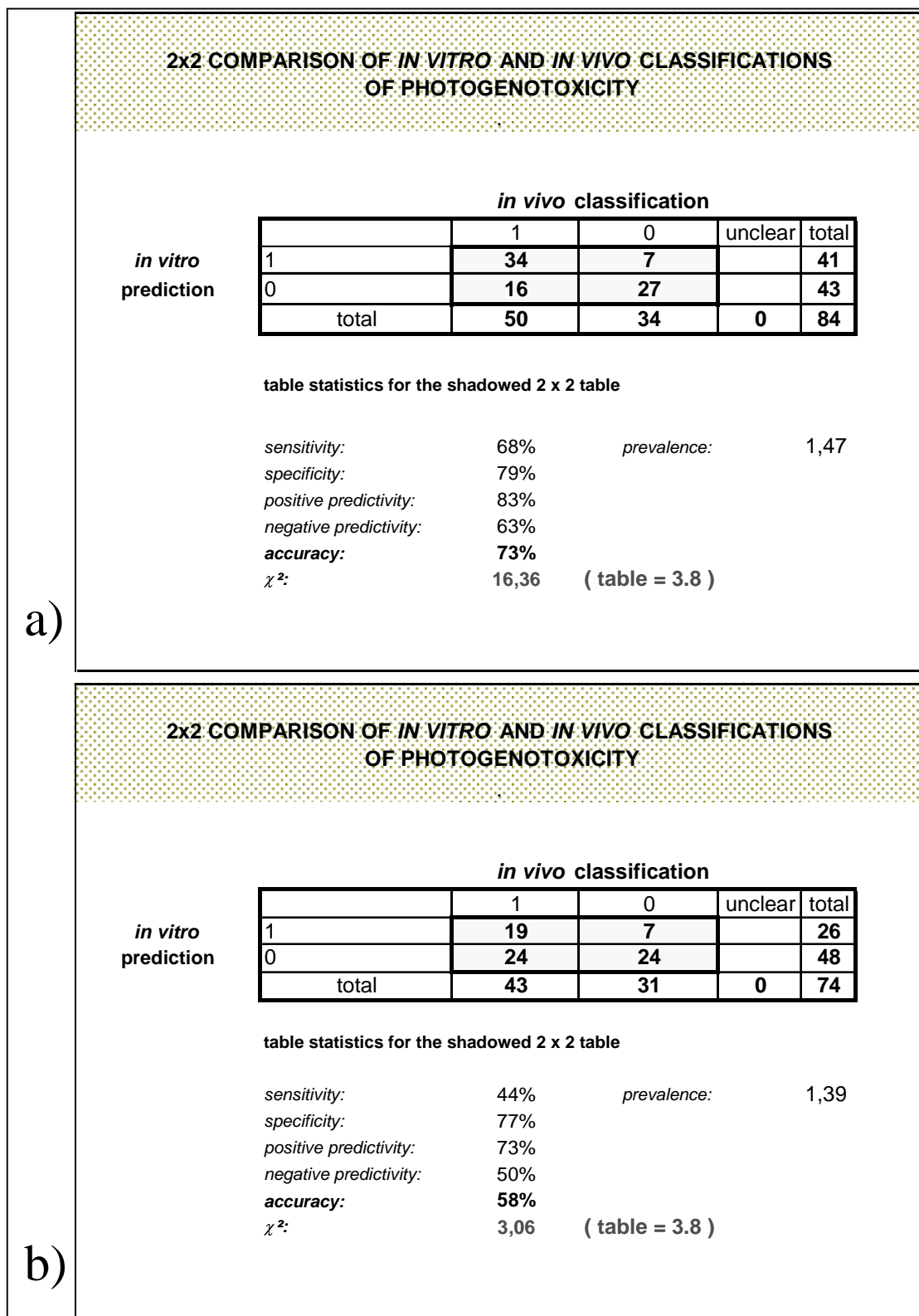


Abb. 57: Spreadsheet zur Erfassung der Daten im Photo-Cometassay. Beispiel für die Ergebnisdokumentation der Kometen-Analyse eines Objektträgers (Rohdaten).

Photo Comet Assay							
Project Nr.: 0312916A				Cells: V 79			
Run Nr.: 1				Dose UVA [mJ/cm ²]: 600			
Experiment Date: 16.10.03				Dose UVB [mJ/cm ²]: 29,07			
Scorer: C				Compound Code: F037			
Slide Nr.: OT 16				Concentration [µg/ml]: 0,08			
No.	Head Length	Tail Length	Head Intensity	Tail Intensity	Tail Moment	Total Area	Total Intensity
Unit	µm	µm	%	%	Arbitrary	µm ²	Grey Level
Count	50	50	50	50	50	50	50
Max	30,77	31,04	100,00	60,65	6,50	803,95	907389,00
Min	13,74	12,36	39,35	0,00	0,00	305,75	266222,00
Mean	21,77	16,93	88,71	11,29	1,28	451,26	461003,74
Median	21,15	15,11	90,48	9,52	1,06	398,84	415103,00
SD	4,02	4,30	11,34	11,34	1,31	119,33	149607,56
1,00	17,03	14,01	77,02	22,98	2,21	327,93	377934,00
2,00	22,53	14,84	99,20	0,80	0,09	392,92	373291,00
3,00	20,33	13,46	99,69	0,31	0,03	322,95	335512,00
4,00	17,58	13,46	98,41	1,59	0,16	328,46	328782,00
5,00	24,18	20,88	92,44	7,56	0,96	571,19	445384,00
6,00	25,82	22,25	91,66	8,34	1,10	616,47	718949,00
7,00	16,48	14,29	80,87	19,13	1,79	339,93	395700,00
8,00	18,68	20,05	74,82	25,18	2,91	476,62	630510,00
9,00	22,53	17,31	80,68	19,32	2,44	508,24	684237,00
10,00	18,68	17,31	87,33	12,67	1,32	365,75	339835,00
11,00	20,88	24,18	83,59	16,41	1,98	495,18	450094,00
12,00	17,03	15,38	75,17	24,83	2,46	363,41	382251,00
13,00	25,82	26,37	80,89	19,11	3,15	712,70	266222,00
14,00	18,68	14,29	93,93	6,07	0,62	347,56	370787,00
15,00	15,93	13,46	83,73	16,27	1,43	305,75	341797,00
16,00	22,53	16,48	88,73	11,27	1,27	448,39	313975,00
17,00	21,98	19,51	62,55	37,45	4,84	633,00	652616,00
18,00	27,47	22,53	98,82	1,18	0,18	518,58	432210,00
19,00	21,43	12,91	98,77	1,23	0,12	380,24	476117,00
20,00	30,77	17,31	97,80	2,20	0,24	504,69	360837,00
21,00	22,53	23,35	83,98	16,02	2,07	532,17	311342,00
22,00	19,23	15,11	80,84	19,16	2,00	367,86	384788,00
23,00	20,33	12,36	99,33	0,67	0,07	362,65	431148,00
24,00	18,13	12,36	88,29	11,71	1,06	344,92	443980,00
25,00	24,18	19,23	89,11	10,89	1,35	572,85	674583,00
26,00	24,73	22,25	77,96	22,04	2,97	631,49	464746,00
27,00	19,23	14,84	88,34	11,66	1,22	369,45	338630,00
28,00	30,22	31,04	88,39	11,61	1,95	803,95	387528,00
29,00	21,98	23,63	84,12	15,88	2,01	552,77	415832,00
30,00	26,37	20,33	99,74	0,26	0,03	329,67	485655,00
31,00	19,23	14,29	96,01	3,99	0,38	345,82	381898,00
32,00	20,33	15,11	96,75	3,25	0,32	323,78	327646,00
33,00	17,03	14,29	82,28	17,72	1,75	363,11	371478,00
34,00	27,47	16,76	94,47	5,53	0,73	630,89	703965,00
35,00	28,57	13,46	100,00	0,00	0,00	584,70	907389,00
36,00	18,68	13,74	89,30	10,70	1,06	358,80	369695,00
37,00	24,18	13,74	98,42	1,58	0,14	488,69	659312,00
38,00	13,74	25,00	39,35	60,65	6,50	536,24	532771,00
39,00	25,82	12,64	99,93	0,07	0,00	418,43	451452,00
40,00	26,37	14,01	99,77	0,23	0,02	516,62	733639,00
41,00	18,68	18,13	72,64	27,36	2,93	401,30	337281,00
42,00	26,37	14,84	99,92	0,08	0,01	543,11	759143,00
43,00	25,82	15,38	95,25	4,75	0,55	563,34	663109,00
44,00	19,23	13,46	93,72	6,28	0,57	332,84	334878,00
45,00	16,48	14,01	84,37	15,63	1,42	327,78	277426,00
46,00	18,68	12,91	95,74	4,26	0,41	342,80	347082,00
47,00	20,88	14,56	98,14	1,86	0,21	365,07	441514,00
48,00	23,08	13,19	92,90	7,10	0,53	383,94	414671,00
49,00	25,82	16,76	86,89	13,11	1,62	511,41	605031,00
50,00	18,68	15,38	93,25	6,75	0,72	396,39	415535,00

Abb. 58: Spreadsheet zur Erfassung der Daten im Photo-Cometassay. Beispiel für die Ergebnisdokumentation zur Bestimmung der Viabilität.

UVA-Dose [mJ/cm ²]		Compound		Conc. [µg/ml]	Well	Diluted with Trypanblue 1:1												Total		Mean		SD		Viability [%]	Total Volume: 2200 µl		Mean Viable Cells/ml	% Viable Cells rel. to VC	µl for 5x10 ⁴ Viable Cells
						1	2	3	4	v	d	v	d	v	d	v	d	v	d	v	d	v	d	Viable Cells [x10 ⁴ /ml]					
600		VC		0		30	0	19	0	31	3	15	2	95	5	23,8	1,3	8,0	1,5	95,0	47,5	64,0	100,0	105					
				0		33	2	48	2	39	1	41	1	161	6	40,3	1,5	6,2	0,6	80,5	64,0	100,0	62						
		Chlorpromazine HCL		PC 1,5		33	2	34	1	34	1	33	1	134	5	33,5	1,3	0,6	0,5	67,0	59,3	92,6	75						
				PC 1,5		35	2	18	2	27	1	23	2	103	7	25,8	1,8	7,2	0,5	93,6	59,3	92,6	97						
				PC 3		29	6	17	8	17	11	17	6	80	31	20,0	7,8	6,0	2,4	72,1	40,0	78,5	125						
				PC 3		30	4	38	7	30	10	23	9	121	30	30,3	7,5	6,1	2,6	80,1	50,3	78,5	83						
				PC 6		21	12	25	6	25	14	21	18	92	50	23,0	12,5	2,3	5,0	64,8	46,0	89,8	109						
				PC 6		38	10	40	8	29	9	31	12	138	39	34,5	9,8	5,3	1,7	78,0	57,5	89,8	72						
		F037		0,08		32	4	34	3	31	6	29	4	126	17	31,5	4,3	2,1	1,3	88,1	63,0	98,8	79						
				0,08		31	3	25	0	35	3	36	7	127	13	31,8	3,3	5,0	2,9	90,7	63,3	98,8	79						
				0,16		35	4	27	5	32	2	31	4	125	15	31,3	3,8	3,3	1,3	89,3	62,5	94,1	80						
				0,16		28	6	29	9	28	5	31	7	116	27	29,0	6,8	1,4	1,7	81,1	58,0	94,1	86						
				0,31		37	7	22	4	18	0	24	5	101	16	25,3	4,0	8,2	2,9	86,3	50,5	77,7	99						
				0,31		20	2	32	2	28	0	18	2	98	6	24,5	1,5	6,6	1,0	94,2	49,0	77,7	102						
				0,63		32	4	27	4	33	0	29	6	121	14	30,3	3,5	2,8	2,5	89,6	60,5	91,0	83						
				0,63		32	2	32	1	21	3	27	6	112	12	28,0	3,0	5,2	2,2	90,3	56,0	91,0	89						
				1,25		42	3	28	3	35	2	38	9	143	17	35,8	4,3	5,9	3,2	89,4	71,5	104,7	70						
				1,25		34	1	28	3	29	2	34	4	125	10	31,3	2,5	3,2	1,3	92,6	62,5	104,7	80						
				2,5		25	8	28	6	27	5	26	12	106	31	26,5	7,8	1,3	3,1	77,4	53,0	93,0	94						
				2,5		30	12	26	6	41	9	35	8	132	35	33,0	8,8	6,5	2,5	79,0	66,0	93,0	76						
				5		13	19	22	20	8	24	8	19	51	82	12,8	20,5	6,6	2,4	38,3	25,5	44,9	196						
				5		16	22	17	12	16	16	15	14	64	64	16,0	16,0	0,8	4,3	50,0	32,0	44,9	156						
				10		6	20	10	22	12	21	10	22	38	85	9,5	21,3	2,5	1,0	30,9	19,0	32,8	263						
				10		14	21	14	29	6	26	12	18	46	94	11,5	23,5	3,8	4,9	32,9	23,0	32,8	217						
0		VC		0		16	0	22	0	22	0	22	0	82	0	20,5	0,0	3,0	0,0	100,0	41,0	100,0	122						
				0		21	0	32	0	21	2	33	0	107	2	26,8	0,5	6,7	1,0	98,2	53,5	100,0	93						
		F037		5		27	2	32	3	30	2	31	0	120	7	30,0	1,8	2,2	1,3	94,5	60,0	130,7	83						
		(Konzentration frei wählbar)		5		31	0	40	0	24	2	32	2	127	4	31,8	1,0	6,6	1,2	96,9	63,5	130,7	79						
		F037		10		28	4	32	2	25	5	20	2	105	13	26,3	3,3	5,1	1,5	89,0	52,5	105,8	95						
				10		29	0	26	0	12	0	28	3	95	3	23,8	0,8	7,9	1,5	96,9	47,5	105,8	105						

Cells: V 79
 Project Nr.: 0312916A
 Run Nr.: 1
 Experiment Date: 16.10.02
 Scorer: B

PHOTO COMET ASSAY
 Viability

Compound Code: F037
 Solvent: DMSO
 Dose UVA [mJ/cm²]: 600
 Dose UVB [mJ/cm²]: 29,07

VC = Positive Control
 VC = Vehicle Control

Abb. 59: Spreadsheet zur Erfassung der Daten im Photo-Cometassay. Beispiel für die Ergebnisdokumentation sämtlicher Daten (Genotoxizität und Zytotoxizität) aus zwei Testdurchläufen.

PHOTO COMET ASSAY													
Final Summary (Run 1 and Run 2)													
Project Nr.: 0312916A													
Cells: V 79													
UVA-Dose [mJ/cm ²]	Run Nr	Compound	Conc. [µg/ml]	Tail Length		Tail Intensity		Tail Moment		Viable Cells/ml (x 10 ⁴)		Viability	
				Mean	%	Mean	%	Mean	%	Mean	%	Mean	%
600	1	VC	0	20,8	100,0	13,0	100,0	1,6	100,0	64,0	100,0	95,7	100,0
600	1	Chlorpromazine HCL	PC 1,5	36,8	176,8	24,7	189,8	5,3	323,1	59,3	92,6	95,0	99,3
600	1	Chlorpromazine HCL	PC 3	44,6	214,5	61,2	470,2	14,5	886,0	50,3	78,5	76,1	79,5
600	1	Chlorpromazine HCL	PC 6	47,1	226,3	56,7	435,9	14,4	877,9	57,5	89,8	71,4	74,6
600	1	F037	0,08	17,5	84,3	11,7	90,0	1,3	81,8	63,3	98,8	89,4	93,4
600	1	F037	0,16	21,4	103,1	14,1	108,5	1,9	113,1	60,3	94,1	85,2	89,0
600	1	F037	0,31	21,9	105,3	10,2	78,1	1,4	83,4	49,8	77,7	90,3	94,3
600	1	F037	0,63	25,5	122,5	10,8	83,0	1,8	107,4	58,3	91,0	90,0	94,0
600	1	F037	1,25	35,8	172,0	21,6	165,7	4,7	287,3	67,0	104,7	91,0	95,1
600	1	F037	2,5	43,2	207,5	48,2	370,2	11,0	673,9	59,5	93,0	78,2	81,7
600	1	F037	5	48,5	233,4	55,1	423,4	13,9	849,6	28,8	44,9	44,2	46,2
600	1	F037	10							21,0	32,8	31,9	33,3
0	1	VC	0	16,3	100,0	8,1	100,0	1,0	100,0	47,3	100,0	99,1	100,0
0	1	F037	5	14,4	88,3	5,7	70,7	0,6	62,2	61,8	130,7	95,7	96,6
0	1	F037	10	20,1	123,7	10,9	135,0	1,4	142,3	50,0	105,8	93,0	93,8
600	2	VC	0	14,5	100,0	4,8	100,0	0,5	100,0	77,3	100,0	97,2	100,0
600	2	Chlorpromazine HCL	PC 1,5	23,9	165,1	9,0	185,5	1,4	279,5	86,8	112,3	97,4	100,2
600	2	Chlorpromazine HCL	PC 3	36,4	250,9	33,7	695,7	7,3	1458,1	66,8	86,4	93,9	96,6
600	2	Chlorpromazine HCL	PC 6	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
600	2	F037	0,08	15,2	104,9	35,8	739,4	3,1	617,9	78,3	101,3	98,4	101,3
600	2	F037	0,16	14,8	102,3	5,2	108,0	0,5	107,9	85,5	110,7	99,1	102,0
600	2	F037	0,31	14,8	102,0	5,8	120,7	0,6	121,0	64,8	83,8	97,7	100,5
600	2	F037	0,63	18,0	124,2	9,1	188,6	1,1	216,5	70,0	90,6	95,0	97,8
600	2	F037	1,25	26,5	182,9	11,4	235,0	1,8	353,6	77,8	100,6	94,8	97,6
600	2	F037	2,5	33,8	232,8	26,8	554,6	5,7	1124,5	60,5	78,3	93,6	96,3
600	2	F037	5	41,3	284,4	63,6	1313,4	13,9	2765,0	64,8	83,8	80,8	83,2
600	2	F037	10							37,5	48,5	56,4	58,0
0	2	VC	0	15,2	100,0	5,4	100,0	0,6	100,0	70,0	100,0	98,6	100,0
0	2	F037	5	12,9	85,2	4,1	76,7	0,4	62,7	57,3	81,8	97,0	98,5
0	2	F037	10	14,0	92,5	4,9	90,5	0,5	82,4	60,5	86,4	97,9	99,3

ANLAGE 2: Standard Operation Procedures (SOPs) für den Photo-Mikrokerntest und den Photo-Cometassay

Standard Operation Procedure (SOP)

„In vitro Photo Micronucleus Test for the detection of photogenotoxic drugs“

(to be used in the „Collaborative study on in vitro photogenotoxicity tests“)

Introduction

Several different in vitro genotoxicity tests have been adapted for testing of the consequences of photoactivation of chemicals to damage the DNA. For safety testing purposes it is recommended to focus on those in vitro systems, which are currently used as standard tests in regulatory testing strategies. As no genotoxic photochemical is known to date which is exclusively positive for gene mutations, and the recognized photochemical reaction mechanisms are strongly clastogenic it is suggested that a test for photochemical clastogenicity (chromosomal aberration or micronucleus test) should have first priority.

The in vitro micronucleus assay is a mutagenicity test system for the detection of chemicals which induce the formation of small membrane bound DNA fragments i.e. micronuclei in the cytoplasm of interphase cells. These micronuclei may originate from chromosome fragments lacking a centromere or whole chromosomes which are unable to migrate with the rest of the chromosomes during the anaphase of cell division. Thus, the micronucleus assay is in principle appropriate for the detection of clastogenic and aneugenic effects (the latter is not relevant for photogenotoxicity testing).

A protocol for the in vitro micronucleus test using Chinese hamster V79 cells has been recently developed (Kalweit et al. 1998) and further validated in a collaborative study (van der Hude et al. 2000). This protocol has been successfully adapted to photogenotoxicity testing during a research project at BfArM supported by the German Ministry of Research (Kersten et al. 1999). Based on the experience and data collected in the course of this project a detailed protocol of the in vitro photo micronucleus assay with V79 cells is given in the following SOP.

Very useful recommendations regarding the conduct of tests for photochemical genotoxicity have been recently elaborated by an international expert working group (Gocke et al. 2000) and are taken into consideration in this SOP.

Cell cultures

1. Chinese hamster lung V79 cells (V79 cells) will be used as testing cells in the in vitro photo micronucleus assay. Frozen stocks of the cells will be distributed to the participants of the collaborative study. These cells are regularly checked for the absence of mycoplasma contamination and karyotype stability. They have a modal chromosome number of 22 and a population doubling time of 10-14 hours.
2. Frozen stocks are quickly thawed by shaking the tubes in a waterbath (37°C). After thawing cell suspension is transferred to a culture flask (75 cm²) already containing 20 ml prewarmed (37°C) culture medium (see 4.). The next day the medium is discarded and fresh medium is added. After reconstitution of frozen cells, stock cultures are regularly subcultivated one to two times per week (before overgrowth occurs) using a 0.17% Trypsin / 0.07% EDTA solution. This is done by discarding the culture medium and washing the cell layer with PBS once. After discarding the PBS 10 ml of the Trypsin-EDTA solution are added. The whole cell layer is rinsed shortly. Subsequently, the trypsin-solution is removed. Optical control of cell detachment is done by eye. Subsequently, cells are suspended in 10 ml culture medium including 10% FCS, which is stopping the trypsin reaction. If a subsequent determination of cell number is performed, an aliquot of the cell suspension should be diluted about 1:10 before counting. For routine cell culture cells can be diluted and seeded in new culture flasks according to the optical cell density seen by eye. The wanted cell number can be seeded in 75 cm² flasks (20 ml culture medium) or 175 cm² flask (50 ml culture medium).
3. It is advisable to reduce seeded cell count per flask to 1000 cells about every second week. The cells are considered suitable for use in a test with the 3rd subcultivation after reconstitution. New frozen batches have to be produced from subcultures by each of the participating laboratories. Cells can be

used for testing until maximum the 25th subcultivation of the stock cultures after reconstitution of frozen batches provided quality is checked and proven (e.g. by determining spontaneous mutation frequency).

4. The V79 cells are cultivated in MEM medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% fetal calf serum (= culture medium) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Test chemicals

5. The test chemicals will be purchased, coded and delivered by ZEBET, BfR (Berlin). In order to fulfil demands of occupational health and safety rules, safety data sheets for each coded substance will be sent in a sealed envelope. Each test chemical should be handled with care as if it is mutagenic/carcinogenic. Special properties and requirements will be indicated (volatility, protection from light / preparation under red light, etc).
Test chemicals must be freshly prepared immediately prior to use.

Solvent

6. Test chemicals of limited solution in water should be dissolved in appropriate solvents (information on solvent to be used will be prescribed for each substance). The substance will be dissolved and diluted in pure solvent at 100-fold the intended final concentration. At each concentration step the dissolved substance is then added to the cell cultures in volumes equivalent to 1% of the culture volume resulting in a final DMSO concentration of 1% in all cultures. The solvent must be present at the same volume also in the negative controls.

Choice of concentrations

7. For freely soluble, non-toxic compounds the upper treatment level is 5 mg/ml or 10 mM. For (photo-)cytotoxic compounds, the highest concentration should reduce the PI (see 21.-23.) to at most 1.3, i.e. at least 20 - 30% of cell clones evaluated should be clones consisting of more than 1 cell.
8. For poorly soluble substances that are not toxic at levels lower than the insoluble level, the highest treatment level should be the highest possible concentration without significant precipitation. Precipitation should be avoided since (heavy) precipitates may absorb or scatter UV irradiation and thus protect the target cells from possible photo(geno)toxic effects. Precipitation is determined by eye immediately before irradiation.
9. The concentration levels should be given in µg/ml and should be adequately spaced. At least 4 concentrations should be available for photogenotoxicity assessment.

Controls

10. Non-irradiated and irradiated vehicle control cultures are used as negative controls. The highest soluble concentration of the test chemical tested with UV-irradiation is also tested without UV irradiation in order to determine possible effects induced by the compounds themselves.
11. As a positive control for photogenotoxic effects chlorpromazine at concentrations of 10⁻⁶ to 10⁻⁵ M plus standard UV irradiation was found to be suitable according the experiences in the BfArM laboratory. However, the concentration may be revised lab-specifically dependent on the outcome during the first phase of the ring trial.

Metabolic activation

12. The compounds selected for testing in the collaborative study do not need metabolic activation to exert photogenotoxic effects (at present no chemical is known for which metabolic transformation is needed for the chemical to act as a photogenotoxin). The use of rat liver S9 mix, normally applied in standard in vitro genotoxicity tests, is therefore not required in the collaborative study.

UV irradiation (Photo Micronucleus Test)

Light source

13. As light source a solar simulator containing a xenon arc lamp plus appropriate filters to remove the UVC part of the emission spectrum should be used. Therefore, irradiation is performed with UV- and visible light at wave lengths > 290 nm. If possible an emission spectrum of the lamp should be determined.

Irradiation conditions

14. In general, the irradiation condition should yield a small, reproducible genotoxic or toxic effect only but should be appropriate to photoactivate a broad spectrum of different photogenotoxic compounds. On the basis of the results of the inter-laboratory dose-response curve studies (see 15.) for micronucleus induction by UV irradiation the following irradiation conditions were selected: The UVA-dose was set to 600 mJ/cm² and the ratio of [UVA dose rate] to [UVB dose rate] should have a value of >30 : 1, i.e. the UVB dose should not exceed 20 mJ/cm². Compounds which exert an extreme photocytotoxic response resulting in a very steep phototoxicity dose response curve under the irradiation conditions described above (but no photogenotoxicity) should be tested with a lower UVA dose of about 100 mJ/cm² in addition in order to prevent that a possible photogenotoxic effect is superimposed by the phototoxicity of the compound.
15. At the beginning of the collaborative study all participating laboratories have to perform a full (0 – 1000 mJ/cm² UVA; UVA : UVB ~ 30 - 40 : 1) irradiation dose-response curve of micronucleus induction and cytotoxicity (PI) in the absence of test compound. This serves to compare the irradiation levels in different laboratories by comparison of the actual biological effects and will be helpful to fix the adequate UV dose for subsequent experiments.

Irradiation dose measurements

16. The intensity of UVA and UVB (irradiance) should be determined in parallel to each experiment by using suitable UV-meter. The dose determination should be performed under conditions identical to the exposure of the test system (e.g. behind the plastic lid and at the actual position of the culture flasks). The data of dosimetry are used to calculate exposure times to obtain the required dose.
Calculation of UV-dose: measured value [mW/cm²] x sec irradiation time = mJ/cm²

Test protocol for the V79 micronucleus test

Treatment

17. Single cell suspensions of 1.5 x 10⁵ V79 cells in 5 ml culture medium are seeded onto glass slides in QuadriPERM® culture dishes and preincubated for about 6h. Prior to treatment the culture medium is replaced by treatment medium (2 % FCS, without Phenolred) and the solvent or serial dilutions of the test chemical are added to one set of duplicate cultures (slide A and B) for each of the treatment groups. After incubation for 30 min in the dark the cultures are exposed to the required dose of UV light. Following irradiation the treatment medium is removed, the cells are washed twice with PBS, re-fed with fresh culture medium and incubated in the dark for a further 24 h before harvesting.

Harvesting/Preparation of slides

18. At the end of cultivation, the medium is discarded and the cells are rinsed in 1.5% tri-sodium citrate 2-hydrate and fixed in acetic acid:ethanol (1:3) supplemented with 1.25% v/v formaldehyde solution (37%). On the following day the air-dried slides are stained in May-Gruenwald's solution for 3 min and further stained in 2.6% of Giemsa's solution in Weise's buffer, pH 7.2 for 20 min. Lab specific models of the staining procedure are allowed if necessary to optimize the staining results concerning contrast between nucleus and cytoplasm.

Scoring of micronuclei

19. 1000 cells from clones with > 1 and < 9 cell(s) of each of 2 slides per experimental point should be scored to assess the frequency of cells with one, two, or more than two micronuclei. Micronuclei in single cells (representing non-proliferating cells) are not considered. Micronuclei should be identified according to the criteria of Heddle (1973). Only micronuclei not exceeding 1/3 of the main nucleus diameter, not overlapping with the main nucleus and with distinct borders, will be included in the scoring.

Determination of cytotoxicity

20. Plating of a single cell suspension at a relatively low density allows the determination of „clone sizes“. Cytotoxicity is assessed by counting the number of clones consisting of 1 cell (c1), 2 (c2), 3-4 (c4), 5-8 (c8) cells, representing cells that have undergone 1, 2 or 3 cell divisions during the culture period. From these data, a proliferation index (PI), i.e. a measure of cell cycle delay, is calculated following the formula:

$$PI = \frac{(c1 \times 1) + (c2 \times 2) + (c4 \times 3) + (c8 \times 4)}{n \text{ (number of total cell colonies)}}$$

As a second endpoint of cytotoxicity the number of mitotic cells per 1000 cells should be scored to calculate the mitotic index (MI%).

Testing approach

Range-finder experiment without UV irradiation

21. In a first step, a broad range of concentrations is tested to investigate the cytotoxicity of the test compound. For free soluble compounds the maximum concentration should be 5 mg/ml, for other compounds the maximum concentration is determined by the limit of solubility. Cytotoxicity is assessed by determination of PI.

Phototoxicity range-finder experiment

22. Based on the findings (PI) of the range-finder experiment without UV irradiation an appropriate range of concentrations is tested to investigate the phototoxicity of the test compound.

Main study experiment

23. Based on the findings (PI) of the range-finder experiment with UV irradiation, the test compound has to be tested in an appropriate range of concentrations to investigate micronucleus induction and cell cycle delay (PI). At least four concentrations should be available for photogenotoxicity assessment, i.e. when testing with UV irradiation whereas testing without UV irradiation can be restricted to the highest test concentration. In the case of (photo-)cytotoxic compounds, the upper limit of testing is defined by an inhibition of proliferation which should not fall below a PI of 1.3.

Number of experiments

24. The main study should be reproduced in an independent experiment. In case of conflicting results between the two assays a third assay has to be conducted. In this case, variation of the experimental conditions (e.g. spacing of test concentration) may be important to achieve a clear result.

Acceptance criteria

25. The assay is to be considered valid if the following criteria are met:

- The PI in negative control cultures fall within the normal range thus indicating properly proliferating cell cultures (BfArM: PI > 2.5 w/o irradiation or PI > 2.2 with irradiation).
- The proportion of cells containing micronuclei in negative control cultures and in the UV irradiation controls (without test chemical treatment) fall within the normal range [BfArM: mean percentage of MN-containing cells: 100 mJ/cm² UVA: 1.55% (n=21); 400 mJ/cm²: 3.65% (n=59)].
- The positive control chemical indicates the expected effects.

Evaluation criteria

The following criteria are based on testing experiences with the protocol at the BfArM and are considered as provisional. It will be one of the principal goals of the collaborative study to establish appropriate and generally applicable evaluation criteria for the in vitro photo micronucleus assay.

26. A compound is considered to be photogenotoxic if at least a 2-fold increase in the number of micronucleated cells in comparison to the concurrent UV control is observed at one or more concentrations and if the percentage of micronuclei-containing cells at least reaches a value of 7.3% (with 400 mJ/cm² UVA dose) or 3.1% (with 100 mJ/cm² UVA dose) corresponding to 2-fold the mean of UV controls obtained from historical control experiments (reference to historical control data will prevent a too high sensitivity for obtaining a positive result in case the concurrent control used in the actual experiment is very low). If the compound is a micronucleus inducer itself, an additional photogenotoxic effect is indicated by a shift in the LOEC to at least a half-log lower concentration.
27. A photocytotoxic effect is induced by a compound if a concentration-related decrease in the PI is recorded in comparison to UV. If the compound is cytotoxic itself, then an additional photocytotoxic effect was indicated by a decrease in the PI at least at a half-log lower concentration.

Reporting of data

28. Standardized spreadsheets in MS EXCEL formats for collection of results will be made available by the study coordinator BfArM. Results have to be sent at the end of each experiment on each compound to ZEBET.

References

- Gocke E et al. (2000) Considerations on photochemical genotoxicity: Report of the IWGTP working group, *Environ Molec Mutagen* 35, 173-184.
- Heddle JA (1973) A rapid in vitro test for chromosomal damage, *Mutat Res* 18, 187-190.
- Kalweit S et al. (1999) Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutat Res* 439, 183-190.
- Kersten B et al. (1999) The application of the in vitro micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutat Res* 445, 55-71.
- v.d. Hude W et al. (2000) In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – Results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances, *Mutat Res* 468, 137-163.

Standard Operation Procedure (SOP)

„In vitro Photo-Comet Assay for the detection of photogenotoxic drugs“

(to be used in the „Collaborative study on in vitro photogenotoxicity tests“)

Introduction

Several different in vitro genotoxicity tests were adapted for testing the potential of chemicals to damage the DNA after photoactivation. For safety testing purposes it is recommended to focus on those in vitro systems, which are currently used as standard tests in regulatory testing strategies. As no genotoxic photochemical is known to date which is exclusively positive for gene mutations, and the recognized photochemical reaction mechanisms are strongly clastogenic it is suggested that a test for photochemical clastogenicity (chromosomal aberration or micronucleus test) should have first priority. As reasonable supplementary test which may give additional information on photogenotoxic properties of a compound the Photo-Comet assay was proposed (Gocke et al., 2000).

The in vitro Comet assay is a genotoxicity test system for the detection of chemically induced DNA damage. Using the alkaline version of the Comet assay protocol the induction of DNA single strand breaks is measured. The Comet assay is considered to be a very sensitive test system and was firstly described by Singh et al., 1988. This protocol has been successfully adapted to photogenotoxicity testing as is reflected in several publications (Bulera et al., 1999, Chetelat et al., 1996, Marrot et al., 2001, Nakagawa et al., 1997, Reavy et al., 1997) and during a research project at Bayer AG supported by the German Ministry of Research. Based on the experience and data collected in the course of this project a detailed protocol of the in vitro Photo-Comet assay with V79 cells is given in the following SOP.

In addition, very useful recommendations regarding the conduct of tests for photochemical genotoxicity have been recently elaborated by an international expert working group (Gocke et al., 2000) and are taken into consideration in this SOP.

Cell cultures

29. Chinese hamster lung V79 cells (V79 cells) will be used as testing cells in the in vitro Photo Comet assay. Frozen stocks of the cells will be distributed to the participants of the collaborative study. These cells are regularly checked for the absence of mycoplasma contamination and karyotype stability. They have a modal chromosome number of 22 and a population doubling time of 10-14 hours.
30. Frozen stocks are quickly thawed by shaking the tubes in a waterbath (37°C). After thawing cell suspension is transferred to a culture flask (75 cm²) already containing 20 ml prewarmed (37°C) culture medium (see 4.). The next day the medium is discarded and fresh medium is added. After reconstitution of frozen cells, stock cultures are regularly subcultivated one to two times per week (before overgrowth occurs) using a 0.17% Trypsin / 0.07% EDTA solution. This is done by discarding the culture medium and washing the cell layer with PBS once. After discarding the PBS 10 ml of the Trypsin-EDTA solution are added. The whole cell layer is rinsed shortly. Subsequently, the trypsin-solution is removed. Optical control of cell detachment is done by eye. Subsequently, cells are suspended in 10 ml culture medium including 10% FCS, which is stopping the trypsin reaction. If a subsequent determination of cell number is performed, an aliquot of the cell suspension should be diluted about 1:10 before counting. For routine cell culture cells can be deluted and seeded in new culture flasks according to the optical cell density seen by eye. The wanted cell number can be seeded in 75 cm² flasks (20 ml culture medium) or 175 cm² flasks (50 ml culture medium).
31. It is advisable to reduce seeded cell count per flask to 1000 cells about every second week. The cells are considered suitable for use in a test with the 3rd subcultivation after reconstitution. New frozen batches have to be produced from subcultures by each of the participating laboratories. Cells can be used for testing until maximum the 25th subcultivation of the stock cultures after reconstitution of frozen batches provided quality is checked and proven (e.g. by determining spontaneous mutation frequency).
32. The V79 cells are cultivated in MEM medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% fetal calf serum (= culture medium) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Test chemicals

33. The test chemicals will be purchased, coded and delivered by ZEBET, BgVV (Berlin). In order to fulfil demands of occupational health and safety rules, safety data sheets for each coded substance will be sent in a sealed envelope. Each test chemical should be handled with care as if it is mutagenic/carcinogenic. Special properties and requirements will be indicated (volatility, protection from light / preparation under red light, etc).
Test chemicals must be freshly prepared immediately prior to use.

Solvent

34. Test chemicals of limited solution in water should be dissolved in appropriate solvents (normally DMSO or ethanol) at 100-fold the intended final concentration and then diluted with the solvent. The solvent used should be present at a constant volume (1 % v/v) in all cultures, i.e. in the negative controls as well as in all concentrations of the test chemical.

Choice of concentrations

35. For freely soluble, non-toxic compounds the upper treatment level is 5 mg/ml or 10 mM. For (photo-)cytotoxic compounds, the highest concentration should induce cytotoxicity as defined under the specific test protocol sections for Comet Assay.
36. For poorly soluble substances that are not toxic at levels lower than the insoluble level, the highest treatment level should be the highest possible concentration without significant precipitation. Precipitation should be avoided since (heavy) precipitates may absorb or scatter UV irradiation and thus protect the target cells from possible photo(geno)toxic effects. Precipitation is determined by eye immediately before irradiation.
37. The concentration levels will be given in µg/ml and should be adequately spaced. For a valid experiment at least 4 concentrations should be available for photogenotoxicity assessment.

Controls

38. Non-irradiated and irradiated vehicle control cultures are used as negative controls. The highest soluble concentration of the test chemical tested with UV-irradiation is also tested without UV irradiation in order to determine possible effects induced by the compounds themselves.
39. As positive control for photogenotoxic effects chlorpromazine is used. The respective concentration will be dependent on laboratory specific data established at the beginning of the ring trial. However, a concentration already proven to be suitable is proposed in the specific test protocol sections for the Comet Assay.

Metabolic activation

40. The compounds selected for testing in the collaborative study do not need metabolic activation to exert photogenotoxic effects (at present no chemical is known for which metabolic transformation is need for the chemical to act as a photogenotoxin). The use of rat liver S9 mix, normally applied in standard in vitro genotoxicity tests, is therefore not required in the collaborative study.

UV irradiation (Photo Comet Assay)

Light source

41. As light source a solar simulator containing a xenon arc lamp plus appropriate filters to remove the UVC part of the emission spectrum should be used. Therefore, irradiation is performed with UV- and visible light at wave lengths > 290 nm. If possible an emission spectrum of the lamp should be determined.

Irradiation conditions

42. In general, the irradiation condition should yield a small, reproducible genotoxic or toxic effect only but should be appropriate to photoactivate a broad spectrum of different photogenotoxic compounds. [According to the experiences in the Bayer laboratory this can be achieved for the V79 Photo-Comet assay when using a ratio of [UVB dose]:[UVA dose] of 1:18 – 1:24 and a UVB dose of 40 mJ/cm² (UVA about 850 mJ/cm²).] However, irradiation doses may be adjusted in each of the participating laboratories according to the results obtained after having established a dose-response curve for induction of DNA single strand breaks by UV-irradiation alone in V79 cells (see 15.). Compounds which exert an extreme photocytotoxic response resulting in a very steep phototoxicity dose response curve under the irradiation conditions described above (but no photogenotoxicity) should be tested with a lower UVB dose of 5 mJ/cm² and about 100 mJ/cm² UVA in addition in order to prevent that a possible photogenotoxic effect is superimposed by the phototoxicity of the compound.

43. At the beginning of the collaborative study all participating laboratories have to perform a full (0, 200, 400, 600, 800, 1000 mJ/cm² UVA; UVA : UVB around 20 : 1) irradiation dose-response curve of DNA single strand break induction and cytotoxicity in the absence of test compound. This serves to compare the irradiation levels in different laboratories by comparison of the actual biological effects and will be helpful to fix the adequate UV dose for subsequent experiments.
Following the results of the dose response curves (as presented on the meeting of January 28, 2003) the following conditions of UV irradiation were fixed for the Photo-Comet Assay:
600 mJ/cm² UVA, ratio UVA:UVB 13:1 or above without filtering UVB. Ratios of UVA:UVB below this should be increased at least to this level by using an UVB filter, e.g. petri dish lid.

Irradiation dose measurements

44. The intensity of UVA and UVB (irradiance) should be determined in parallel to each experiment by using suitable UV-meter. The dose determination should be performed under conditions identical to the exposure of the test system (e.g. behind the plastic lid and at the actual position of the culture flasks). The data of dosimetry are used to calculate exposure times to obtain the required dose.
Calculation of UV-dose: measured value (mW/cm²) x sec irradiation time = mJ/cm²
(Irradiation set up Bayer: irradiance adjusted to 0.1 mW/cm² UVB, 40 cm distance between UV source and cell monolayer without plastic lid; to obtain a standard dose of about 850 mJ/cm² UVA requires an exposure time of appr. 400 sec; UVA : UVB around 20 : 1)

Test protocol of the V79 Photo-Comet assay

Treatment

45. As a rule 0.8-1x10⁶ cells in 2 ml culture medium are seeded per well (6-well plates, Ø well 35 mm). Cells are cultivated in a CO₂-Incubator at 37°C until treatment.

! All following steps have to be performed under red light !

Treatment of cells with test compound (+/- UV irradiation) is performed on the following day.

- starting of irradiation lamp at least 30 min before irradiation of cells
- after 30 min control and calculation of UV intensity (UVA/UVB)
- 6-well plates seeded at the day before treatment are taken out of the incubator
- removing of medium, washing of cells 1x with PBS
- addition of 2 ml treatment medium (2% FCS, without Phenolred) per well
- addition of 220 µl vehicle control or positive control or test compound solution, respectively. Two independent cultures (= 2 wells) are treated per control or test compound concentration.

As positive control with UV-irradiation Chlorpromazine is used (at Bayer at a concentration of 3.0 µg/ml).

- Cultures with UV irradiation are irradiated (without lid) after 20 min. preincubation with the test compound in the dark in a CO₂-incubator

After UV-irradiation incubation of cultures is performed in a CO₂-incubator for additional 10 min.

Treatment of unirradiated cultures is exactly the same with the exception that no UV-irradiation is performed.

Cell Harvest

46. A: Cytotoxicity determination on the day before the Comet assay experiment
Incubation is followed by removing the treatment medium, rinsing of cells 1x with PBS and harvesting of cells using a 0.17% Trypsin / 0.07% EDTA solution. Irradiated cells can be collected with the additional use of a cell rubber. After trypsination cells are suspended in 2 ml of culture medium. The volume is increased to 5 ml with PBS. After cell harvest the required volume of cell suspension to reach a cell number of about 5x10⁴ viable cells is pipetted into one Eppendorf tube per treated culture (as a rule 100 µl – 200 µl/tube). Cytotoxicity can be determined on the day before (see 24). The cell suspension is centrifuged (e.g. Eppendorf 5415C, 1200 rpm) at about 116 g for 6 min. Subsequently, the supernatant is discarded.
18. B: Cytotoxicity determination at the same day as the Comet assay experiment
Incubation is followed by removing the treatment medium, rinsing of cells 1x with PBS and harvesting of cells using 100 µl of a 0.17% Trypsin / 0.07% EDTA solution. Irradiated cells can be collected with the

additional use of a cell rubber. Trypsination of cells is stopped by adding 100 µl culture medium. After resuspending the cells an aliquot of 15 µl is mixed with 135 µl LMA. 45 µl of this suspension are dropped onto the prepared slide using 24x24 mm coverslips. 75 µl of this suspension are dropped onto the prepared slide using 24x36 mm coverslips (see 19, second paragraph). The volume of the remaining cell suspension is increased to 2 - 4 ml with PBS, depending on the cell density. An aliquot of the resulting cell suspension is diluted 1:1 with Trypan blue for determination of the viable cell count.

Preparation of Slides / Lysis

47. A 1% Agarose-solution is prepared and shortly before use boiled again. A slide (fully frosted) is dipped into this solution. Using a paper towel the backside of the slide is cleaned and the slide is layered horizontally. 1 slide is prepared per culture (well) which results in at least 2 slides per test compound concentration or respective control. Slides are dried in a drying chamber (e.g. Heraeus) at about 60°C for about 30 Min. The dried slides are stored at room temperature for at least 1 week before use in the Comet assay.

A 0.7% **Low-Melting-Agarose-solution (LMA)** is prepared. The cell pellet (see 18.) containing about 5×10^4 viable cells is suspended in 75 µl LMA, dropped onto the prepared slide and is covered with a cover slip (24x36 mm). It is also possible to use 2 cover slips per slide (e.g. as performed at Novartis). Cell amount and volume have to be adjusted accordingly. The agarose layer becomes solid after transferring the slide to a cooled plate.

The lysis solution is freshly prepared at the day of use. It is cooled down to 4°C e.g. in a histological staining chamber. After removing the cover slip, slides are placed in a glass rack and slowly dipped into the lysis solution. Lysis is performed for at least 1 hour and maximum 20 hours at 4°C.

Electrophoresis

48. For electrophoresis a horizontal electrophoresis chamber (e.g. 2 GE-A3, AGS) is used. It is adjusted using a spirit-level and the surrounding tank is filled with ice. The ice-cold (4°C) electrophoresis buffer is filled into the inner tank until the gel-table is covered. Attention has to be taken that the buffer is free of bubbles. The slides are taken out of the lysis buffer and are shortly dipped into electrophoresis buffer. Subsequently, slides are tightly layered onto the gel-table with the agarose layer upward starting at the anode as near as possible. After incubation with the electrophoresis buffer for 20 min (unwinding) electrophoresis is started by switching on the al mains set (e.g. ST 504, Gibco BRL). Electrophoresis is performed under intra-laboratory conditions to reach optimal comet figures for 60 min. (e.g. at Bayer: 18 V/ 300 mA according to 0.4 V/cm using an electrophoresis chamber with a distance of 45 cm between anode and cathode).

Staining with Propidiumjodide

49. After end of electrophoresis slides are taken out of the electrophoresis chamber and layered onto a staining table or a comparable tool. The agarose layer is carefully rinsed with neutralisation buffer. E.g. by inclining the table the buffer can run off afterwards. Subsequently, slides are dried in vertical position and stored at room temperature until staining.

For staining 50 µl Propidiumjodide solution per slide is pipetted on top of the agarose layer and covered with a cover slip (see above, 19.). Alternatively the slide can be dipped into the staining solution. Slides are stored at room temperature for at least 30 min. before evaluation.

Scoring of Comets

50. Comets are measured using a fluorescence microscope (ocular 10x, objective widefield 40x). As measure of DNA damage induction the parameters „Tail Length“ (TL), "Tail Moment" (TM) and "Tail intensity" (TI) are determined. The TL is defined as distance from the middle of the head to the end of the tail. For evaluation a software program is used (e.g. purchased from Perceptive Instruments, Haverhill, UK, or Kinetic Imaging).

Alternatively, TL can be scored by using a special ocular.

50 cells are scored per slide and two slides are scored per experimental point.

Selection of cells for evaluation should be performed randomly by using the following rules:

- evaluation of cells near the edges (below 3 mm) of the slide should be avoided
- poorly stained areas should not be evaluated

- cells should be randomly selected for evaluation by e.g. following the x-axis, moving the slide along the y-axis and then scoring along the x-axis again or by performing scoring in a helical manner. It should be assured that the same cell cannot be scored twice.
- Comets not having a clearly defined head anymore (so called "clouds" or "hedgehogs") should not be evaluated.
- It should be controlled that the position of the slides in the electrophoretic chamber has no influence on the comet evaluation.

51. A mean TL-, TM- and TI-value per concentration is calculated from the mean TL value of each of the two slides per treatment group. Concentrations showing test substance precipitation are not used for evaluation.

Determination of cytotoxicity

52. After compound treatment (+/- UV) culture medium containing the compound is discarded. Cells are washed 1x with PBS, trypsinized and suspended in 2 ml of culture medium in an Eppendorf tube (see 18.). The volume is increased to 5 ml with PBS shortly before counting with Trypanblue. An aliquot of the cell suspension is mixed with the same volume of Trypanblue (50 -100 µl Trypanblue, 1:1 dissolved in PBS). Viable cell number and cell viability are determined using a Neubauer chamber. Determination of viability can alternatively be performed one day before the main experiment as a pre-cytotoxicity test. It should be assured that the test conditions are the same as for the main Photo-Comet-experiment. The viable cell number determined in this pre-test is then used for calculating the number of cells used in the main experiment.

Testing approach

Range-finder experiment without UV irradiation

53. In a first step, a broad range of concentrations is tested to investigate the cytotoxicity of the test compound. For freely soluble, non-toxic compounds the maximum concentration should be 5 mg/ml, for other compounds the maximum concentration is determined by the limit of solubility. The highest concentration of freely soluble, toxic compounds should reduce the viable cell number not more than 40% relative to the concurrent vehicle control. Viable cell count is determined in 2 independent cultures per concentration.

Phototoxicity range-finder experiment

54. Based on the findings (viable cell count) of the range-finder experiment without UV irradiation an appropriate range of concentrations is tested to investigate the phototoxicity of the test compound. Viable cell count is determined in 2 independent cultures per concentration.

Main study experiments

55. Based on the findings of the range-finder experiment with UV irradiation, the test compound has to be tested in an appropriate range of concentrations to investigate DNA single strand break induction with UV irradiation. Exposure level leading to about 40% reduction of viable cell count compared to the concurrent irradiated vehicle control should be used as the maximum concentration.

Number of experiments

56. If the first experiment reveals a negative result, a second experiment is performed under the same conditions. The standard test program is completed if the second experiment is negative as well. In the case of conflicting results of the two experiments a third experiment has to be conducted. In this case, variation of the experimental conditions (e.g. spacing of test concentrations; UV-irradiation directly after compound addition without preincubation in the dark) may be important to achieve a clear result.
57. In the case of a clear positive result in the first experiment no additional experiment will be performed.

Acceptance criteria

58. The assay is to be considered valid if the following criteria are met:
- The viable cell count in unirradiated vehicle control cultures falls within the normal range thus indicating cell cultures with high quality.
 - The mean TL value of irradiated and unirradiated vehicle controls falls within the normal range (*Bayer: mean TL V79 without UV irradiation (n = 14): 19.25 ± 0.85; mean TL V79 with UV irradiation (n = 12): 24.6 ± 3.7*).
 - The positive control chemical induces a photogenotoxic effect of about 30% increase compared to the concurrent irradiated vehicle control (*Bayer: TL Chlorpromazine at least > 35 µm*).

- At least four evaluable concentrations should be available for (photo-)genotoxicity assessment.

Evaluation criteria

The following criteria are based on testing experiences with the protocol at Bayer and are considered as provisional. It will be one of the principal goals of the collaborative study to establish appropriate and generally applicable evaluation criteria for the in vitro Photo Comet assay.

59. A compound is considered to be photogenotoxic if a biologically relevant increase of TL in comparison to the concurrent irradiated vehicle control is observed at one (the highest concentration tested) or several concentrations (at Bayer: about 25% increase compared to the concurrent irradiated control). This increase should occur in a dose dependent manner. In addition, the mean TL value of irradiated vehicle controls obtained during the course of the ring trial is taken into account for assessment of the result (the latter will prevent a too high sensitivity for obtaining a positive result in case the concurrent control used in the actual experiment is very low). If the compound induces DNA single strandbreaks already without UV irradiation, an additional photogenotoxic effect is indicated by a relevant shift in the LOEC to a lower concentration.
60. The usefulness of the endpoints TM and TI, evaluated in addition, for assessment of photogenotoxicity will be investigated according to the obtained data in the course of the ring trial.
61. A photocytotoxic effect is induced by a compound if a concentration-related decrease in the viable cell count was recorded in comparison to the concurrent irradiated vehicle control. If the compound is cytotoxic itself, then an additional photocytotoxic effect is indicated by a relevant decrease in the viable cell count at a lower concentration.

Reporting of data

62. Standardized spreadsheets in MS EXCEL formats for collection of results will be made available by the study coordinator BfArM for the Photo MNT and by Bayer for the Photo-Comet assay. Results have to be sent at the end of each experiment on each compound to ZEBET.

References

- Bulera, S.J. et al. (1999) In vitro photogenotoxic activity of Clinafloxacin: A paradigm predicting photocarcinogenicity, *Tox. Appl. Pharm.* 156, 222-230.
- Chetelat, A-A. et al. (1996) The photomutagenicity of fluoroquinolones in tests for gene mutation, chromosomal aberration, gene conversion and DNA breakage (Comet assay), *Mutagenesis* 11, 497-504.
- Gocke E et al. (2000) Considerations on photochemical genotoxicity: Report of the IWGTP working group, *Environ Molec Mutagen* 35, 173-184.
- Marrot, L. et al. (2001) Fluoroquinolones as chemical tools to define a strategy for photogenotoxicity in vitro assessment. *Toxicology in Vitro* 15, 131-142.
- Nakagawa, Y. et al. (1997) The photogenotoxicity of titanium dioxide particles, *Mutation Res.* 394, 125-132.
- Reavy, H.J. et al. (1997) Photogenotoxicity of skin phototumorigenic fluoroquinolone antibiotics detected using the comet assay, *Photochem. Photobiol.* 66, 368-373.
- Singh, N.P. et al. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.