

Untersuchungen zur toxikologischen Relevanz von MVOCs

Hans Joachim Seidel und Ludwika Kreja
Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
Universitätsklinikum Ulm

Förderkennzeichen: BWB 99006

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit
Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Oktober 2001

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkung einiger häufig nachgewiesener MVOC (microbial volatile organic compounds) auf Säugerzellen in vitro untersucht. Die Zytotoxizität wurde mit der humanen Lungenkarzinomzell-Linie A549 in drei verschiedenen Tests untersucht: im Kolonie-assay, MTT-assay (tetrazolium assay) und im Methylenblau-assay. Für die Genotoxizitätsuntersuchungen wurden DNS Strangbrüche in dem Einzelzellelektrophorese-assay (comet assay) in A549 Zellen, in Hamster V79 Lungenfibroblasten und in peripheren Blutzellen studiert. Klastogene bzw. aneugene Effekte wurden mit dem Mikronukleus-Test untersucht und die Mutagenität der MVOCs wurde im HPRT-Test (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) mit V79 Zellen untersucht. Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren Il-1 α , Il-6, Il-8 und TNF- α nach MVOC Exposition wurde mit ELISA in Kulturüberständen von A549 Zellen studiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die toxische Wirkung der untersuchten MVOCs geringer ist als die der Kontrollsubstanzen: MMS (Methyl Methansulfonat; alkylierende Substanz), Gliotoxin (Mykotoxin) und Formaldehyd. Im Comet assay und im Mikronukleus-Test waren die getesteten Substanzen nicht genotoxisch. Mutagenität konnte auch nicht nachgewiesen werden. MVOC induzieren Il-8 Freisetzung in A549 Zellen, was auf ihre immunomodulatorische Wirkung hinweist.

Schlüsselwörter:

Genotoxizität; Zytotoxizität; Mutagenität, MVOC - microbial volatile organic compounds

Abstract**Toxicology study of microbial volatile organic compounds (MVOC)**

The purpose of the study was the in vitro investigation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of some often detected microbial volatile organic compounds (MVOC). The cytotoxicity was evaluated with a human lung cell carcinoma cell line A549 in three different tests: the colony assay, MTT assay (tetrazolium dye reduction) and the methylene blue assay. For the genotoxicity DNA strand breaks in A549 cells, V79 Chinese hamster fibroblasts and in human peripheral blood cells were studied using the single cell gel electrophoresis assay (comet assay). The clastogenic and aneugenic effects were studied by the micronucleus assay using the Chinese hamster V79 cells. The mutagenicity was tested with the HPRT assay (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase) with the hamster lung fibroblast cell line V79.

The results show that the MVOC tested were far less toxic than the control substances: MMS (methyl methanesulfonate; an alkylating agent) gliotoxin (a non-volatile mycotoxin) and formaldehyde. The substances tested were not genotoxic in the comet assay and the micronucleus assay and they do not appear to be mutagenic. MVOC induced Il-8 release in A549 cells indicates that MVOC could play a role in the induction of proinflammatory responses in human lung cells.

Key words:

genotoxicity; cytotoxicity; mutagenicity; MVOC - microbial volatile organic compounds

1. Einleitung

Die flüchtigen organischen Metaboliten der Schimmelpilze (microbial volatile organic compounds - MVOC) sind Substanzen, die in Müllsortieranlagen, Kompostanlagen und anderen von Schimmelpilzen befallenen Räumen nachgewiesen werden. Sie gehören chemisch zu verschiedenen Stoffklassen wie: Aldehyde, Alkohole, Ketone, Ether, Ester, Furane, Terpene, aromatische Verbindungen und Schwefelverbindungen.

Weit über 100 MVOC's wurden identifiziert, die meisten dieser Substanzen sind sehr geruchscharakteristisch und geruchsintensiv. Einige in Innenräumen nachgewiesene MVOCs werden als Frühindikatoren vom verdeckten Pilzbefall gesehen und näher erforscht (STRÖM et al. 1994, DEWEY et al. 1995, WESSÉN et al. 1996, SCHLEIBINGER et al. 1997). In der MVOC Analytik ist man bestrebt, über die Zusammensetzung und quantitative Bestimmung der einzelnen Substanzen in der Luft einen Aufschluss über Pilzart und Ausmaß des Befalls zu gewinnen (SAGUNSKI 1997, SUNESSON et al. 1995, KELLER et al. 1997, KORPI et al. 1998, FISCHER et al. 1999, WILKINS et al. 2000).

Die MVOCs stehen im Verdacht, Schleimhautreizungen und Atemwegserkrankungen zu verursachen. Eine potenziell gesundheitsschädliche Exposition ist relevant in Innenräumen, die von sichtbaren bzw. unsichtbaren Schimmelpilz stark befallen sind, sowie an Arbeitsplätzen in der Abfallwirtschaft, wie z. B. in Müllsortieranlagen und Kompostanlagen. (FISCHER et al. 1998, FISCHER et al. 2000). Über die toxikologische Relevanz von MVOC's gibt es jedoch bis jetzt nur wenig gesicherte Erkenntnisse (HERR et al. 1999, SEIDEL und PLAPPERT 1999, KORPI et al. 1999, BARROT 2001). Zur Abklärung der allergenen, toxischen und kanzerogenen Risiken besteht Forschungsbedarf.

In der vorliegenden Studie wurde die zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkung der MVOCs *in vitro* untersucht. Darüber hinaus wurden immunmodulatorische Eigenschaften, wie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren $IL-1\alpha$, $IL-6$, $IL-8$ und $TNF-\alpha$ in A549 Zellen nach MVOC Exposition *in vitro*, untersucht.

Für die Untersuchungen der Zytotoxizität wurden drei verschiedene Testsysteme eingesetzt: die Reproduktionskapazität der Zellen wurde mit dem Kolonie-assay (CFA assay; colony forming ability) untersucht, die metabolische Zellaktivität wurde mit dem MTT-assay und die Zellvitalität (Messung der Biomasse durch Protein Bestimmung) mit dem Methylene blue assay (MB-assay) untersucht. Für die Genotoxizitätsuntersuchung wurden DNA Strangbrüche und alkali-sensitive Stellen mit dem Comet assay bestimmt (ROJAS et al. 1999). Klastogene bzw. aneugene Effekte wurden mit dem Mikronukleus-Test untersucht (ROMAGNA, 1993) und in HPRT-Test wurde die Mutation im

Hypoxanthin - Guanin - Phosphoribosyl-transferase-Gen untersucht (BRADLEY et al. 1981).

Die Zytotoxizitätstests wurden unter Verwendung der menschlichen Lungenepithelkarzinomzell-Linie A549 durchgeführt. Da der Atemtrakt vermutlich am meisten bei der MVOC Exposition betroffen ist, wurden diese Zellen als Modell für humanen Typ II Alveolar-Epithelzellen gewählt. Sie waren auch von anderen in Untersuchungen von immunmodulatorischen Effekten in vitro verwendet worden (STANDIFORD et al. 1990, PALMBERG et al. 1998, WANG et al. 1999). Im Comet assay wurden als Targetzellen A549, V79 Zellen und periphere Blutleukozyten (pBL) verwendet. Der Mikronukleus-Test und der HPRT-Test wurden mit der Zelllinie V79 (Hamster Lungenfibroblasten) durchgeführt.

Für die Validierung der angewandten Testsysteme wurden drei Substanzen als positive Kontrollen eingesetzt: das Mykotoxin Gliotoxin, die alkylierende Substanz Methylmethansulfonat (MMS) und Formaldehyd als VOC (volatile organic compound). Die getesteten Substanzen sind in der Tabelle 1. aufgestellt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

A549 und V79 Zellen wurden in 75 cm² Gewebekulturflaschen im Kulturmedium Dulbecco's MEM bzw. in Earle MEM mit 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und Streptomycin und mit 10% fetalen Kälberserum kultiviert und bei 37°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ in der Luft inkubiert. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (subkonfluente Kultur) mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, zentrifugiert (5 Min., 150g) und in den verschiedenen Testsystemen eingesetzt bzw. weiter passagiert. Bevor die Zellen im CFA-, MTT- bzw. in MB-assay mit Testsubstanz inkubiert wurden, wurden sie zuerst in Medium 24 Std. in Kulturschalen bzw. in Mikrotiterplatten inkubiert, um das Anheften am Boden des Kulturgefäßes zu erreichen.

2.2 Colony Forming Ability (CFA) assay

100-200 A549 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von MVOC in Kulturmedium in 6 cm Kulturplatten (3 Platten/Ansatz) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 9 Tagen wurden die Kolonien (Klone mit >30 Zellen) mit Methanol fixiert, mit Giemsa-Lösung gefärbt und gezählt. Die CFA (Mittelwert ± Standardabweichung, SA) wurde in 3-6 Experimenten ermittelt.

MVOC, die wasser-unlöslich waren, wurden zuerst mit Ethanol absolut im Verhältnis 1:1 verdünnt. Weitere Verdünnungen wurden im Kulturmedium gemacht. Die Endkonzentration von Ethanol war weniger als 0,1% und hatte keinen Einfluss auf das Wachstum von A549 Zellen.

2.3 MTT assay

Der MTT assay wurde durchgeführt wie bei ALLEY et al. 1988 beschrieben. In Kürze: 5000 und 10.000 A549 Zellen/well wurden in 0,1 ml Medium in 96-well Mikrotiter Flachbodenplatten 24 Std. mit Testsubstanz (6 wells/Konzentration) in 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden 0,4 mg/ml MTT [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma) zugegeben und 4 Std. inkubiert. Die Formazankristalle wurden mit 0,15 ml DMSO gelöst, die Absorption des Kulturmediums wurde bei 550 nm Wellenlänge gemessen und Mittelwert von 6 wells bestimmt.

2.4 Methylene blue assay

Der MB-assay wurde durchgeführt wie bei FINLAY et al. 1984 beschrieben. 5000 und 10.000 A549 Zellen/well wurden, wie im MTT-assay, in je 6 wells in 0,1 ml Medium in 96-well Mikrotiterplatten mit Testsubstanz inkubiert. Nach 24 Std. wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit Phosphat Puffer gewaschen und mit 0,1 ml Methylen Blau (0,5% in 50% Ethanol/Wasser; Sigma) 30 Min. fixiert und gefärbt. Nach dem Auswaschen von ungebundenem Farbstoff und Zugabe von 0,1 ml von 1% SDS wurde die Absorption bei 620 nm gemessen.

CFA-, MTT- und MB-assay wurden gleichzeitig durchgeführt. Jede Substanz wurde in 5-7 Konzentrationen in 3-5 einzelnen Experimenten getestet und von den Konzentrations-Wirkungskurven wurden mit Hilfe von non-linearen Regressionsanalyse (GraphPad Prism Computerprogramm) die IC₅₀ ermittelt. IC₅₀ ist definiert als Substanzkonzentration, die das Koloniewachstum bzw. die Absorption in MTT- und im MB-assay auf 50% der Kontrollwerte reduziert.

2.5 Alkalischer Comet assay (Einzelzell-Gelelektrophorese-assay)

Der Comet assay ist eine mikro-gelelektrophoretische Technik, die es ermöglicht, Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche und alkali-sensitive Stellen in der DNA individueller Zellen zu detektieren. Der Comet assay wurde nach der Beschreibung vom SINGH et al. 1988 durchgeführt. In Kürze: die A549 Zellen wurden in 3 cm Kulturschalen angesetzt (3x10⁵ Zellen/Platte, je 2 Platten pro Ansatz). Nach 24 Std. wurde Kulturmedium erneuert,

Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Zellen 4 Std. in 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen trypsiniert, gewaschen und in 100 µl Medium resuspendiert. 5-10 µl Zellen wurden mit 85 µl der 0,5% Low Melting Point Agarose gemischt und auf Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden zuvor mit 300 µl 0,6%-iger Agarose beschichtet. Dann erfolgte Inkubation über 12 Std. bei 4°C mit dem Lysispuffer, 60 Min. Denaturierung im Elektrophoresepuffer pH 13 und Elektrophorese über 30 Min. bei 25 kV und 300 mA. Anschließend Behandlung mit Neutralisationspuffer und 10 Min. Färbung mit Ethidiumbromid. Die Auswertung wurde im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Comet Analysis Software (Kinetic Imaging Ltd. England) vorgenommen. Pro Probe wurden 54 zufällig ausgewählte Zellen gemessen. Ein Maß für die DNA Schädigung ist der s.g. tail moment (TM = Länge von Cometschweif x prozentualer DNA Anteil im Schweif). Mittelwerte von TM Median aus 3-4 Experimenten wurden ermittelt. Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle und den MVOC-exponierten Zellen wurden mit dem t-Test auf die Signifikanz ($p < 0,05$) untersucht.

2.6 Mikronukleus Test

Der Mikronukleus Test ist ein gut etablierter Standardassay für die Untersuchung genotoxische Effekte auf dem Chromosomenlevel. Mikronuklei eukaryotischer Zellen bestehen aus Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen, die bei der Zellteilung nicht in einer der beiden Tochterzellekerne integriert wurden. In der darauffolgenden Interphase kondensieren die zurückgebliebenen Chromatinstrukturen zu einem oder mehreren Mikronuklei. Die quantitative Erfassung mikronukleus-haltiger Zellen kann damit zu indirekten Messung der Induktion von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen herangezogen werden (ROMAGNA, 1993). Zusätzlich zu den chromosomenbrechenden (klastogenen) Effekten sind auch solche Wirkungen nachzuweisen, die auf eine Dysfunktion des Spindelapparates und dem Verlust ganzer Chromosomen beruhen (aneugene Effekte). Zwischen der Induktion chromosomalen Aberration und dem Auftreten von Mikronuklei besteht eine sehr gute Korrelation (MASTUOKA et al. 1993).

Der Test wurde gemäß dem Arbeitsprotokoll von MILLER et al. 1995 mit Hamster Lungenfibroblasten Zelllinie V79 ausgeführt. Je 1×10^5 Zellen pro Objektträger wurden in Quadriperm[®] Schalen mit 4 ml Medium 24 Std. kultiviert. Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen, bis zur toxischen Konzentration, wurde zugegeben und 4 Std. inkubiert. Bei einigen Substanzen wurde der Test auch mit Zusatz von 3% S9-Mix aus Rattenleber

(CCR GmbH&Co. KG, Roßdorf) als externe metabolische Aktivierung durchgeführt. Der Abbruch der Exposition erfolgte durch zwei Waschschrirte mit Hanks Salzlösung und die Zugabe frischen Gewebemediums. Nach 24 Std. Nachinkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 10 Min. mit Methanol fixiert und luftgetrocknet. Anschließend folgte die Giemsa-Färbung (10 Min). Die Mikronuklei wurden bei 1000-facher Vergrößerung analysiert. Die Kriterien für eine positive Identifikation richteten sich nach FENECH (1993). Nur einkernige Zellen mit gut erhaltene Zytoplasma und weniger als fünf Mikronuklei wurden in die Auswertung einbezogen. Die Anzahl der erfassten Zellen in 2-4 unabhängigen Experimenten betrug 1000 je Testansatz. Eine Substanz wurde im Test als eindeutig klastogen/aneugen eingestuft, wenn sie in der Lage war, die spontan auftretende Mikronukleusfrequenz mindestens zu verdreifachen.

2.7 HPRT assay

Der HPRT assay zum Nachweis von Mutationen im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-transferase-Gen wurde mit der V79 Hamster Lungenfibroblasten Zelllinie wie bei SEIDEL und PLAPPERT (1999) beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden 2 Std. mit Testsubstanz mit und ohne Zusatz von 3% S9-Mix inkubiert. Expressionszeit: 7 Tage, Selektionszeit von 6-Thioguanin resistenten Kolonien: 7 Tage. Eine Substanz wird als mutagen eingestuft, wenn sie in der Lage ist, die spontan auftretende Mutantenfrequenz mindestens zu verdreifachen.

2.8 Bestimmung von Interleukin-6 und Interleukin-8 in A549 Kulturüberständen

1×10^4 A549 Zellen/well wurden in 96-well Platten in 24 Std. Kultur angesetzt. Testsubstanz wurde zugegeben und die Zellen für weitere 24 Std. in 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Kulturüberstand wurde geerntet, gepoolt (4 wells/Konzentration), 1000g 10 Min. zentrifugiert und in -70°C aufbewahrt. Die Zellen wurden trypsiniert und gezählt. Il-1 α , TNF- α , Il-6 und Il-8 Produktion/10⁶ Zellen wurde mit einem enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA kit; Endogen, USA) bestimmt. Nachweisgrenze: Il-1 α 2 pg/ml, TNF- α 25 pg/ml, Il-6 10 pg/ml, und Il-8 20 pg/ml. Als Hintergrundkontrolle (Background) diente Kulturüberstand ohne MVOC Zugabe. Als positive Kontrolle wurden Kulturen mit Lipopolysaccharid (LPS E.coli 055:B5; Sigma L2880) angesetzt. Background-Werte von nicht behandelten A549 Kulturen (Mittelwert \pm SEM für Il-6 aus 32 Versuchen = $0,37 \pm 0,08$ ng/10⁶ Zellen; für Il-8 = $7,55 \pm 0,56$ ng/10⁶ Zellen) wurden von den Werten, die in MVOC bzw. LPS stimulierten Kulturen gemessen wurden, abgezogen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die MVOC Konzentrations-Wirkungseffekte wurden gleichzeitig in den 3 Testsystemen, MTT-, MB- und CFA-assay, untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die A549 Zellen auf die Substanzen empfindlich reagieren und für die Untersuchung geeignet sind. Die Stabilität der MVOCs im Kulturmedium ist nicht bekannt. Da es flüchtige Substanzen sind, verändert sich ihre Konzentration während der Kulturdauer. Die angegebene Konzentrationen beziehen sich auf den Beginn der Inkubation.

Mit den drei Testsystemen wurden verschiedene Endpunkte gemessen, um die unterschiedlichen Aspekte der Zytotoxizität zu erfassen. Da im CFA-assay die Zellen länger mit MVOC exponiert werden und die Reproduktionskapazität der Zellen über mehrere Generationen erfasst wird, ist dieser Test empfindlicher als der MTT- und der MB-assay (HUNT et al. 1987).

In der Tabelle 2 sind die IC_{50} Werte für 19 MVOCs und 3 Kontrollsubstanzen: Gliotoxin (Mykotoxin), MMS (alkylierende, zytotoxische Substanz) und Formaldehyd (VOC) zusammengestellt. Die IC_{50} wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt. Unter den getesteten Substanzen hat 1-Decanol die stärkste zytotoxische Wirkung mit IC_{50} unter 1 mM, vergleichbar mit der Toxizität von MMS und Formaldehyd. IC_{50} Werte unter 10mM wurden für 1-Octen-3-ol, 3-Octanol, 1-Hexanol sowie für Terpeneol und Pentylfuran ermittelt. DMSO und 2-Butanon waren ca. 1000-fach weniger toxisch als MMS bzw. Formaldehyd. Die Zytotoxizität von Gliotoxin übersteigt die der MVOCs um mehrere Potenzen.

Die Genotoxizität von 16 MVOC, MMS und Gliotoxin wurde mit dem Comet assay studiert. Die Kontrollsubstanz MMS hat einen relevanten genotoxischen Effekt in A549 Zellen, V79 Zellen und in pBlutzellen, d.h. sie wirkt schädigend auf die DNA in Konzentrationen, die weit unterhalb der zytotoxischen Dosis liegen. Die DNA schädigende Wirkung von MMS wurde in allen Targetzellen bereits bei der Konzentration von 0,05 mM festgestellt, d.h. bei einer wesentlich niedrigeren Konzentration als der IC_{50} Wert von 0,2 mM im CFA-assay (Tabelle 3). Die Genotoxizität von MMS wurde auch in anderen Zelllinien und in Primärkulturen beschrieben (Übersicht ROJAS et al. 1999). Gliotoxin und die meisten bis jetzt getesteten MVOCs induzieren DNA-Strangbrüche erst in zytotoxischen Konzentrationen, die höher bzw. nah an IC_{50} liegen (KREJA und SEIDEL 2001; KREJA und SEIDEL 2001a, im Druck).

Eine DNA-schädigende Wirkung einer Substanz ist jedoch nur dann relevant und kann zu einer malignen Zelltransformation führen, wenn die Zelle die Exposition überlebt.

Genotoxische Wirkungen von MVOC auf die V79 Zellen wurden auch im Mikronukleus Test untersucht. Die Kontrollsubstanz MMS wirkt stark positiv. Cyclophosphamid wurde als positive Kontrolle für die aktivierende Wirkung von S9-Mix getestet.

Die Ergebnisse zeigen (Tabelle 4), dass keine der 16 untersuchten MVOC klastogene bzw. aneugene Wirkung hatte. Einige Substanzen, wie z.B. 1-Decanol und 1-Octen-3-ol wurden in der Zellkultur auch mit S9-Mix als externe metabolische Aktivierung eingesetzt. Die gleichzeitige Exposition mit S9 hatte keinen Einfluss auf die Wirkung.

Die Ergebnisse der HPRT-Teste zeigen, dass die mit und ohne S9-Mix getesteten 9 MVOCs bzw. Gliotoxin keine mutagene Wirkung in V79 Zellen haben, da sie keine signifikante Erhöhung der spontanen Mutationsrate (Kontrolle ohne MVOC) verursachten. In der Tabelle 5 ist die relative Frequenz der HPRT- Mutanten bei höchster, im CFA-assay mit V79 Zellen noch nicht toxischer Substanzkonzentration angegeben. Die Mutantenfrequenz von MMS (positive Kontrolle) war sehr hoch und betrug 92 Kolonien/10⁶ Zellen, die spontane Mutationsrate betrug maximal 3/10⁶ Zellen.

Freisetzung von Interleukin-6 und -8 nach Exposition von A549 Zellen mit MVOCs.

Humorale Mediatoren (Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Colony Stimulating Factors u. a.) werden bei Entzündungsreaktionen durch Epithelialzellen im Atemtrakt freigesetzt (Übersicht LEVINE 1995, DEVALIA et al. 1997, MARTIN et al. 1997, POLITO & PROUD 1998). Es wurde gezeigt, dass humane bronchiale Epithelialzellen in Primärkultur und in A549 Zellen nach Inkubation mit Staub vom Schweinestall zur Freisetzung von Il-8 und Il-6 angeregt werden (PALMBERG et al. 1998, WANG et al. 1999). Wir haben in A549 Zellkulturen nach Exposition mit MVOC die Freisetzung von Il-1 α , IL-6, Il-8 und TNF- α , untersucht. Die Ergebnisse in der Tabelle 6 zeigen, dass alle 14 getesteten Substanzen Dosis-abhängig die Il-8 Produktion in den A549 Zellen induzieren. Meistens waren die gemessene Il-8 Konzentrationen erheblich höher als in Kontrollkulturen, die mit bakteriellem LPS stimuliert wurden. Die Il-6 Freisetzung konnte in LPS bzw. MVOCs stimulierten Kulturen nur an der Nachweisgrenze gemessen werden und war dementsprechend sehr gering. Il-1 α und TNF- α wurde nicht gefunden.

Zusammenfassend brachten die bisherigen Untersuchungen folgende Erkenntnisse:

- Alle getesteten MVOCs haben erheblich geringere zytotoxische Wirkung als das Mykotoxin Gliotoxin. Nur bei 6 von den 19 getesteten Substanzen war die Zytotoxizität annähernd so stark wie bei Formaldehyd bzw. MMS.
- Im Comet assay wirken MVOCs nicht genotoxisch, die DNA Strangbrüche konnten erst in zytotoxischen Konzentrationen gemessen werden. Die Ergebnisse des Mikronukleus-Tests waren negativ – 16 getestete MVOC waren nicht genotoxisch.
- Eine mutagene Wirkung von MVOCs im HPRT-Test wurde bei keiner der 9 getesteten Substanz festgestellt.
- MVOCs induzieren eine Il-8 Freisetzung in A549 Zellen, was auf ihre immunmodulatorische Wirkung hinweist. Die Il-6 Produktion war an der Nachweisgrenze, Il-1 α und TNF- α wurde bis jetzt nicht gefunden.

Die Ergebnisse der Studie lassen noch keine direkte Interpretationen bezüglich der gesundheitlichen Relevanz für den Menschen zu. Es gibt auch noch erhebliche methodische Probleme. Da die MVOCs schnell während der Inkubation verdampfen und einige auch schwer wasserlöslich sind, müssen die Kulturbedingungen bei den in vitro Untersuchungen noch genauer definiert werden. Eine Beziehung zwischen der MVOC-Konzentration in der Luft, wie sie in den befallenen Gebäuden gemessen wird und der Konzentration im Zellkulturmedium muss noch hergestellt werden.

4. Literatur

- ALLEY MC, SCUDIERO DA, MONKS A, HURSEY ML, CZERWINSKI MJ, FINE DL et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988; 48: 589-601.
- BARROT R. Schimmelpilze – ihre gesundheitliche Bedeutung im Berufsleben. Teil I, Teil II. *ErgoMed* 2001; 24: 54-72 und 146-155.
- BRADLEY MO, BHUYAN B, FRANCIS ML, LANGENBACH R, PETERSON A, HUBERMANN E. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells. A review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox program. *Mut Res* 1981; 87: 81-142.
- DEVALIA I, BAYRAM H, RUSZNAK C, CALDERÓN M, SAPSFORD R, ABDELAZIZ MA et al. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways. *Allergy* 1997; 52: 45-51.
- DEWEY S, SAGUNSKI H, PALMGREN U, WILDEBOER B. Microbial volatile organic compounds: a new approach in assessing health risk by indoor mould? *Zbl Hyg* 1985; 197: 504-515.
- FENECH M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mut Res* 1993; 285: 35-44.
- FINLAY GJ, BAGULEY BC, WILSON WR. A semiautomated microculture method for investigating growth effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells. *Anal Biochem* 1984; 139: 272-277.
- FISCHER G, SCHWALBE R, OSTROWSKI R, DOTT W. Airborne fungi and their secondary metabolites in working places in a compost facility. *Mycoses* 1998; 41: 383-388.
- FISCHER G, SCHWALBE R, MÜLLER M, OSTROWSKI R, DOTT W. Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere* 1999; 39: 795-810.
- FISCHER G, MÜLLER M, SCHWALBE R, OSTROWSKI R, DOTT W. Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities. *Int J Environ Health* 2000; 203: 97-104.
- HERR C, BITTIGHOFER PM, BÜNGER J, EIKMANN TH, GRÜNER CH, IDEL H et al. Wirkung von mikrobiellen Aerosolen auf Menschen. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 1999; 59: 229-239.

- HUNT SM, CHRZANOWSKA C, BARNETT CR, BRAND HN, FAWELL JK. A comparison of in vitro cytotoxicity assays and their application to water sample. *ATLA* 1987; 15: 20-29
- KELLER R, SÖNNICHSEN R, OHGKE H. Untersuchung der flüchtigen organischen Stoffwechselprodukte von ausgewählten Schimmelpilzen (*P.expansum*, *A.versicolor*) mittels GC-MSD. *Umweltmed Forsch Prax* 1997; 2: 265-274.
- KORPI A, PASANEN AL, PASANEN P. Volatile compounds originating from mixed microbial cultures on building materials under various humidity conditions. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2914-2919.
- KORPI A, KASANEN JP, ALARIE Y, KOSMA VM, PASANEN AL. Sensory irritating potency of some microbial volatile organic compounds (MVOCs) and a mixture of five MVOCs. *Arch Environ Health* 1999; 54: 347-352.
- KREJA L, SEIDEL H-J. (2001): Toxikologische Untersuchungen einiger häufig nachgewiesener flüchtiger organischer Metabolite der Schimmelpilze (MVOC). *Umweltmed Forsch Prax* 6: 159-163.
- KREJA L, SEIDEL H-J. (2001a): Evaluation of the genotoxic potential of some microbial volatile organic compounds (MVOC) with the comet assay, the micronucleus assay and the HPRT gene mutation assay. *Mutation Res* (im Druck)
- LEVINE S. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *Journal of Investigative medicine* 1995; 43: 241-249.
- MARTIN L, ROCHELLE L, FISCHER B, KRUNKOSKY T, Adler K. Airway epithelium as an effector of inflammation: molecular regulation of secondary mediators. *Eur Respir J* 1997; 10: 2139-2146.
- MASTUOKA A, YAMAZAKI N, SUZUKU T, HAYASHI M AND SOFUNI T. Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test. *Mut Res* 1993; 272: 223-236.
- PALMBERG L, LARSSON BM, MALMBERG P, LARSSON K. Induction of Il-8 production in human alveolar macrophages and human bronchial epithelial cells in vitro by swine dust. *Thorax* 1998; 53: 260-264.
- POLITO A and PROUD D. Epithelial cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 714-718.
- ROJAS E, LOPEZ MC, VALVERDE M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1999; 722: 225-254.
- ROMAGNA F. Mikrokernsysteme. In: Fahrig R (Hrsg) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft Darmstadt, 1993, S. 290-298.

- SAGUNSKI H. Mikrobielle flüchtige organische Verbindungen: Expositions-indikatoren bei Schimmelpilzbefall in Innenräumen? *Umweltmed Forsch Prax* 1997; 2: 95-100.
- SCHLEIBINGER HW, WURM D, MORITZ M, BOCK R, RUDEN H. Sick bulding syndrome and HVAC system: MVOC from air filters. *Zbl Hyg* 1997; 200: 137-151.
- SEIDEL H-J, PLAPPERT U. Zur Toxikologie zweier häufig nachgewiesene MVOCs: 1-Octen-3-ol und 3-Methyl-1-butanol. *Umweltmed Forsch Prax* 1999; 4: 251-312.
- SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191.
- STANDIFORD TJ, KUNKEL SL, BASHA SW, CHENSUE SW, LYNCH JPL, TOEWS GB et al. Interleukin-8 expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine network in the lung. *J Clin Invest* 1990; 86: 1945-1953.
- STRÖM G, WEST TJ, WESSÉN B, PALMGREN U. Quantitative analysis of microbial volatiles in damp Swedish houses. In: SAMSON RA, FLANNIGAN B, FLANNIGAN ME, VERHOEFF AP, ADAN OCG AND HOEKSTRA ES, editors. *Health implications of fungi in indoor environments. Air quality monographs. Amsterdam: Elsevier Science BV* 1994. p. 291-305.
- SUNESSON AL, VAES WHJ, NILSSON CA, BLOMQUIST G, ANDERSSON B, CARLSON R. Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61 : 2911-2918.
- WANG Z, MALMBERG P, EK A, LARSSON K, PALMBERG L. Swine dust induces cytokine secretion from human epithelial cells and alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 6-12.
- WESSÉN B, SCHOEPS KO. Microbial volatile organic compounds - what substances can be found in sick buildings? *Analyst* 1996; 131: 1203-1205.
- WILKINS K, LARSEN K, SIMKUS M. Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media. *Chemosphere* 2000; 41: 437-446.

Tabelle 1. MVOCs - toxikologische Untersuchungen in vitro.

	Substanz	CAS	Quelle
<u>MVOCs:</u>			
<u>Alkohole:</u>	1-Butanol	[71-36-3]	Fluka; 19420
	2-Methyl-1-propanol	[78-83-1]	Riedel de Haen; 24125
	2-Methyl-1-butanol	[137-32-6]	Merck; 8.0031
	3-Methyl-1-butanol	[123-51-3]	Fluka; 59085
	3-Methyl-2-butanol	[598-75-4]	Merck; 8.41399
	1-Pentanol	[71-41-0]	Fluka; 76929
	1-Hexanol	[111-27-3]	Merck; 8.04393
	3-Octanol	[589-98-0]	Merck; 8.21859
	1-Decanol	[112-30-1]	Merck; 8.03463
	1-Octen-3-ol	[3391-86-4]	Fluka; 74950
<u>Ketone:</u>	2-Butanon	[78-93-3]	Sigma; M2886
	2-Pentanon	[107-87-9]	Aldrich; 47,119-4
	2-Hexanon	[591-78-6]	Fluka; 20270
	2-Heptanon	[110-43-0]	Fluka; 68592
	3-Octanon	[106-68-3]	Fluka; 04659
	2-Nonanon	[821-55-6]	Merck; 8.18790
<u>Ether:</u>	2-Pentylfuran	Fema Nr. 3317; EC 2232347	
<u>Terpene:</u>	Terpineol	[8006-39-1]	Fluka; 86480
<u>Schwefelverbindungen:</u>	Dimethylsulfoxid	[67-68-5]	Merck; 2950
	Methylmethansulfonat	[66-27-3]	Sigma; M4016
	Gliotoxin	[67-99-2]	Sigma; G9893
	Formaldehyd (VOC)	[50-00-0]	Merck; 103999

Tabelle 2. Zytotoxizität von MVOCs, untersucht mit der humanen Lungenzelllinie A549

in drei verschiedenen Zytotoxizitätstests.

Substanz	IC ₅₀ (mMol)*		
	MTT - assay	MB - assay	CFA - assay
Kontrollen			
Gliotoxin	0,0003	0,0003	< 0,00003
MMS	0,5	0,4	0,2
Formaldehyd (VOC)	0,15	0,12	0,01
MVOCs			
<u>Alkohole:</u>			
1-Decanol	0,4	0,3	0,7
1-Octen-3-ol	3,4	2,1	3,8
3-Octanol	4,3	3,8	3,5
1-Hexanol	7,0	6,9	3,9
1-Pentanol	39,6	19,6	24,3
1-Butanol	40,6	40,4	50,7
2-Methyl-1-butanol	42,1	29,9	31,4
3-Methyl-1-butanol	51,8	25,9	27,7
3-Methyl-2-butanol	109,9	45,2	59,7
2-Methyl-1-propanol	149,3	37,1	10,9
<u>Ether:</u>			
2-Pentylfuran	20,1	5,6	2,0
<u>Terpen:</u>			
Terpineol	3,5	2,5	1,8
<u>Ketone:</u>			
2-Nonanon	13,0	13,1	1,9
3-Octanon	47,7	36,5	5,8
2-Heptanon	25,6	19,8	12,2
2-Hexanon	52,3	55,1	40,1
2-Pentanon	246,0	160,4	89,6
2-Butanon	327,7	307,1	304,6
<u>Schwefelverbindung:</u>			
DMSO	559,7	296,5	173,7

* IC₅₀ - Substanzkonzentration, die das Koloniewachstum bzw. die Absorption im MTT- und im MB-assay auf 50% der Kontrollwerte reduziert.

Tabelle 3. Genotoxischer und zytotoxischer Effekt von MVOCs in vitro.

	IC50 (mM)	(mM)	A549 Zellen	V79 Zellen	pBlutzellen
Kontrolle unbehandelt			1,55 ± 0,3	1,50 ± 0,54	
MMS	0.2	0,025 0,05	4,34 ± 1,4 12,03 ± 4,90*	3,47 ± 0,34*	10,55 ± 4,05*
<u>MVOCs:</u>					
1-Decanol	0.7	0,05 0,5	1,86 ± 0,31 1,76 ± 0,50	4,07 ± 2,31 4,25 ± 0,41*	3,30 toxisch
1-Octen-3-ol	3.8	0,6 6,4	1,78 ± 0,51 1,45 ± 0,17	2,78 ± 0,93 3,51 ± 1,33*	2,40
3-Octanol	3.5	6,2 31	1,83 ± 0,90 toxisch	2,32 ± 0,94 2,48 ± 0,37	
1-Hexanol	3.9	8 40	2,21 ± 1,34 1,60 ± 0,46	1,65 ± 0,01 1,80 ± 0,20	
1-Pentanol	24	9 46	1,84 ± 0,86 2,47 ± 1,36	1,65 ± 0,68 1,34 ± 0,17	
1-Butanol	51	54 108	2,22 ± 0,82 2,25 ± 1,60	1,67 ± 0,91 1,63 ± 0,79	
2-Methyl 1-butanol	31	45 90	1,86 ± 0,44 3,88 ± 2,13	1,51 ± 0,80 4,3 ± 2,7	
3-Methyl-1-butanol	28	23 46 91	1,53 ± 0,28 1,62 ± 0,79 2,38 ± 1,01	1,43 ± 0,91 2,96 ± 0,81	1,62 ± 0,29 toxisch
3-Methyl-2-butanol	60	45 90	2,00 ± 0,01 1,15 ± 0,26		
2-Methyl-1-propanol	11	53 270	1,34 ± 0,26 3,16 ± 0,55*	2,84 ± 0,43, toxisch	
2-Nonanon	2	6 14	2,23 ± 1,18 2,50 ± 1,17	2,20 ± 0,52 2,21 ± 0,10	
3-Octanon	6	6 31 62	2,12 ± 0,18 3,04 ± 2,06 toxisch	0,92 1,80 ± 1,62 4,15 ± 5,20	1,67 ± 0,31
2-Heptanon	12	7 35 70	2,07 ± 0,51 1,93 ± 0,94 toxisch	1,76 ± 1,65 1,92 ± 0,87 22,84 ± 0,38*	1,58
2-Hexanon	40	40 80	2,45 ± 0,94 toxisch	0,7 ± 0,6 11,58	1,74
2-Butanon	305	112 560	1,99 ± 0,80 2,92 ± 0,94	2,92 ± 0,65 4,46	
DMSO	174	140 700	2,61 ± 0,85 3,53 ± 1,36	2,01 ± 0,15 1,76 ± 0,18	

* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (t-Test; p<0.05)

Tabelle 4. Genotoxischer Effekt von MVOCs in V79 Zellen, untersucht im Mikronukleus

Test mit bzw. ohne S9-Mix als externe metabolische Aktivierung.

Substanz	Konzentration (mMol)	% Mikronuklei*	
		ohne S9	mit S9
Kontrolle unbehandelt		0,5 ± 0,3	
MMS (Kontr. positiv)	0,25	3,4 ± 1,1	
	0,5	11,8 ± 4,4	
Cyclophosphamid	0,1	0,3	4,8
Gliotoxin	0,0015	2,5 ± 1,9	
	0,003	2,4 ± 1,5	
<u>MVOCs:</u>			
1-Decanol	0,5	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,0
	1,3	0,4 ± 0,1	
1-Octen-3-ol	0,6	0,6 ± 0,3	0,5
	3,2	0,7 ± 0,2	0,8
	6,6	0,4 ± 0,1	
3-Octanol	3,1	1,3 ± 0,9	
	6,2	1,1 ± 0,6	
1-Hexanol	4	0,4 ± 0,1	
	8	0,6 ± 0,6	
1-Pentanol	23	0,8 ± 0,0	
	46	1,0 ± 0,6	
1-Butanol	54	0,7 ± 0,7	
	108	1,2 ± 1,1	
2-Methyl 1-butanol	23	0,5 ± 0,1	
	45	0,8 ± 0,4	0,3
3-Methyl-1-butanol	5	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	9	0,8 ± 0,3	0,4
	23	0,7 ± 0,4	
3-Methyl-2-butanol	45	0,8 ± 0,6	
	90	1,4 ± 1,1	
2-Methyl-1-propanol	53	0,7 ± 0,0	
	107	2,6 ± 0,2	
2-Nonanon	6	0,5 ± 0,2	
	14	0,5 ± 0,1	
3-Octanon	16	0,7 ± 0,4	
	31	0,5 ± 0,4	
2-Heptanon	17	0,7 ± 0,2	
	35	0,8 ± 0,1	0
2-Hexanon	40	1,0 ± 0,7	0,7 ± 0,6
	80	0,8 ± 0,6	0,5
2-Butanon	280	1,2 ± 0,6	
	560	toxisch	
DMSO	350	0,2 ± 0,2	1,6 ± 1,9
	700	0,9 ± 0,5	1,1 ± 1,0

*Mittelwerte \pm SA; n= 2-4 Versuche

Tabelle 5. Mutagenität von MVOCs, untersucht an V79 Zellen mit dem HPRT-Test, mit und ohne S9-Mix als externe metabolische Aktivierung.

Substanz	Höchste nicht toxische Konzentration (mM)	Relative Mutanten Frequenz* /10 ⁶ V79 Zellen	
		ohne S9	mit S9
Kontrolle ohne MVOC		0 - 2,8	0 - 3,1
MMS 0,5 mM		92	
Gliotoxin	0,008	0	1,1
1-Decanol	3	2,9	6,8
1-Octen-3-ol	5	1,1	2,2
2-Methyl-1-propanol	107	0	1,3
2-Methyl-1-butanol	46	2,9	0,9
3-Methyl-1-butanol	51,5	1,6	2,7
2-Pentylfuran	3,1	0	4,4
3-Octanon	14,4	0	2,1
2-Heptanon	18,2	1,2	1,9
2-Hexanon	40	3,2	0

* Mittelwerte von 1-3 Versuchen

Tabelle 6. Produktion von IL-6 und IL-8 in A549 Zellkulturen nach Exposition mit MVOCs.

Substanz	IC50* (mMol)	Konzentration	IL-6	IL-8
			(ng/10 ⁶ A549 Zellen)**	
<u>LPS</u> (positive Kontrolle)		µg/ml:		
		10	0.04 ± 0.03	0.8 ± 0.5
		100	0.26 ± 0.10	5.7 ± 2.33
		200	0.47 ± 0.11	11.8 ± 4.3
1-Decanol	0,4	mMol:		
		0,25	0.16 ± 0.28	1.7 ± 0.9
		0,5	0.43 ± 0.49	3.3 ± 1.3
1-Octen-3-ol	3	3	0.12 ± 0.20	3.5 ± 3.3
		6	0.09 ± 0.19	5.8 ± 1.5
3-Octanol	4	3	0.10 ± 0.14	9.5 ± 1.0
		6	1.73 ± 1.25	54.8 ± 10.1
1-Hexanol	7	4	0.38 ± 0.04	6.8 ± 1.2
		8	0.76 ± 0	7.6 ± 7.6
1-Pentanol	40	23	0.18 ± 0.13	5.0 ± 2.8
		46	0	28.1 ± 14.0
1-Butanol	41	54	0.35 ± 0.28	8.4 ± 1.8
		108	0.22 ± 0.31	14.3 ± 3.7
2-Methyl-1-butanol	42	46	0.83 ± 0.34	35.3 ± 14.5
		92	5.83 ± 2.58	130.1 ± 10.0
3-Methyl-1-butanol	52	9	0.09 ± 0.09	4.7 ± 2.6
		46	0.14 ± 0.03	33.3 ± 15.5
2-Methyl-1-propanol	150	54	0.27 ± 0.35	4.4 ± 3.7
		107	0.36 ± 0.55	18.2 ± 13.5
		268	1.05 ± 0.41	24.3 ± 4.7
3-Octanon	48	16	0.23 ± 0.27	2.9 ± 1.5
		31	1.35 ± 0.99	18.2 ± 8.1
		62	0.75 ± 0.75	66.7 ± 16.7
2-Heptanon	26	7	0.24 ± 0.20	3.3 ± 2.3
		17	2.39 ± 1.52	60.3 ± 34.6
		35	0	17.7 ± 11.7
2-Hexanon	52	40	0.45 ± 0.42	2.7 ± 1.4
		80	3.78 ± 0.62	63.1 ± 28.8
2-Butanon	328	112	0.06 ± 0.06	0.63 ± 0-64
		280	0.20 ± 0.17	5.1 ± 2.3
DMSO	560	700	0.11 ± 0.08	5.0 ± 0.6
		1400	1.26 ± 0.41	19.3 ± 1.6

* Inhibitory concentration IC50 bestimmt im zytotoxischen MTT- Test

**Mittelwerte ± SA von 2-8 Experimenten