

Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Abteilung: Neuro- und Verhaltenstoxikologie  
Direktor: Herr Prof. Dr. G. Winneke

**Belastung mit polychlorierten Biphenylen (PCB) während der  
Entwicklung der Ratte: Wirkung auf emotionales Verhalten,  
Lernverhalten, geschlechtsspezifisches Verhalten und  
Sexualhormone**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hatice Kaya

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab  
Dekan  
Referent: Prof. Dr. Winnecke  
Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Kahl

## Abkürzungen

<b>AroA</b>	Aromataseaktivität
<b>ABP</b>	Androgen Binding Protein
<b>ADI</b>	„Acceptable Daily Intake“, Akzeptable tägliche Aufnahmedosis
<b>AFP</b>	Alpha Fetoprotein
<b>AHH</b>	Arylhydrocarbonhydroxylase
<b>Ah-R</b>	Arylhydrocarbon-Rezeptor
<b>ATD-Werte</b>	Annehmbare Tagesdosis
<b>BAT-Wert</b>	Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert
<b>CL</b>	„Confidence Level“, Konfidenzintervall
<b>CYP</b>	Cytochrom P-450-Genlokus
<b>dB</b>	Dezibel
<b>D<sub>2</sub>-R</b>	Dopamin-Rezeptor 2
<b>DFG</b>	Deutsche Forschungsgemeinschaft
<b>DK</b>	Duldbare Konzentration
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>DOPAC</b>	Dihydroxyphenylacetaldehyd
<b>E<sub>2</sub></b>	Östradiol-17 $\beta$
<b>Elisa</b>	Enzym-linked immunosorbant assay
<b>EROD</b>	7-Ethoxyresorufin-O-deethylase
<b>F1</b>	Erste Filialgeneration
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>GC/ECD</b>	Gaschromatographie gekoppelt mit Elektroneneinfangdetektor
<b>GD</b>	„Gestational Day“, Tag der Trächtigkeit
<b>HBC</b>	2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin
<b>HBM-Werte</b>	Human-Biomonitoring-Werte
<b>HPLC</b>	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
<b>HPOA</b>	Hypothalamus und Präoptischer Bereich
<b>HRP</b>	Horse-radish peroxidase-Konjugat
<b>LOAEL</b>	Lowest observed adverse effect level
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LD<sub>50</sub></b>	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
<b>MAK-Wert</b>	Maximale Arbeitsplatz Konzentration

<b>MPFC</b>	Medialer Präfrontaler Kortex
<b>NOAEL</b>	No observed adverse effect level
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>PB</b>	Phenobarbital
<b>PC 12</b>	Phaeochromozytom-Zelllinie
<b>PCB</b>	Polychlorierte Biphenyle
<b>PCDD</b>	Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine
<b>PCDF</b>	Polychlorierte Dibenzofurane
<b>PCQ</b>	Polychlorierte Quarterphenyl
<b>PHAH</b>	Polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
<b>PND</b>	„Postnatal Day“, Alter der Nachkommen in Tagen
<b>PTU</b>	Propylthiouracil
<b>REGWQ</b>	Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test
<b>RG</b>	rekonstituiertes PCB-Gemisch, entspricht dem Kongenerenmuster und den Konzentrationsverhältnissen der Kongenere in menschlicher Muttermilch
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SD</b>	„Standard Deviation“, Standardabweichung
<b>T</b>	Testosteron
<b>T<sub>3</sub></b>	Trijodthyronin
<b>T<sub>4</sub></b>	Thyroxin
<b>TCB</b>	Tetrachlorbiphenyl
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
<b>TDI</b>	„Tolerable Daily Intake“, Tolerierbare tägliche Aufnahmedosis
<b>TEF</b>	Toxizitätsäquivalenzfaktor
<b>TEQ</b>	Toxizitätsäquivalenzwert
<b>TSH</b>	Thyreotropin
<b>VM</b>	Verzehrmenge
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Polychlorierte Biphenyle: Stoffmonographie</b> .....	1
<b>1.2 Polychlorierte Biphenyle: Herstellung und Verwendung</b> .....	2
<b>1.3 Vorkommen</b> .....	2
<b>1.4 Aufnahme, Verteilung und Elimination</b> .....	3
1.4.1 Aufnahme.....	3
1.4.2 Verteilung im Körper.....	5
1.4.3 Anreicherung, Metabolismus und Elimination.....	5
<b>1.5 Unterteilung und Wirkung von PCB</b> .....	5
1.5.1 Koplanare PCB.....	6
1.5.2 Ortho-chlorierte PCB-Kongenere.....	7
1.5.3 Mono-ortho-PCB-Kongenere.....	8
<b>1.7 Akute und Chronische Toxizität</b> .....	8
<b>1.8 Neurotoxizität</b> .....	9
1.8.1 Dopaminerges und serotonerges System.....	10
<b>1.9 Wechselwirkung der PCB mit dem endokrinen System</b> .....	10
1.9.1 Sexualsteroid.....	11
1.9.2 Schilddrüsenhormone.....	12
1.9.3 Östrogene Wirkqualität.....	13
<b>1.10 Geschlechtsspezifische Gehirndifferenzierung</b> .....	14
<b>2. Fragestellung</b> .....	16
<b>2.1 Zielsetzung</b> .....	16
<b>3. Methoden</b> .....	18
3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	18
3.2 Exposition.....	20
3.3 Präparationen.....	22
3.4 PCB Bestimmung.....	22
3.5 Verhaltensversuche.....	23
3.5.1 „Open Field“.....	25
3.5.2 „Step Down“, Passive Vermeidung.....	26

3.5.3	Konditionierte Ultraschall-Vokalisation.....	27
3.4.3	Katalepsie.....	28
<b>3.6</b>	<b>Geschlechtsspezifische Verhaltensversuche.....</b>	<b>28</b>
3.6.1	Süßpräferenz.....	28
3.6.2	Konditionierte Platzpräferenz.....	29
<b>3.7</b>	<b>Hormonmessung.....</b>	<b>30</b>
3.7.1	Enzymgekoppelter Immunnachweis.....	31
3.7.2	Extraktions-/Anreicherungsverfahren für die Östradiol/Testosteron- Bestimmung aus Rattenserum.....	32
3.7.3	Berechnung der Extraktionseffizienz beim ELISA.....	33
3.7.4	Bestimmung der Serumhormon-Konzentration im ELISA: Testdurchführung.....	34
3.7.5	Sensitivität des ELISA.....	38
3.7.6	Spezifität des ELISA.....	38
3.7.7	Extraktionsgüte.....	38
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklungsdaten.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Gewichtsentwicklung.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3</b>	<b>Innere PCB Belastung.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4</b>	<b>Verhaltensversuche.....</b>	<b>49</b>
4.4.1	Open Field.....	49
4.4.1.1	<i>Explorationsverhalten im Open field.....</i>	<i>49</i>
4.4.1.2	<i>Defäkation im Open field.....</i>	<i>50</i>
4.4.1.3	<i>Messung der lokomotorischen Aktivität der Jungtiere im Open field an PND 30.....</i>	<i>52</i>
4.4.1.4	<i>Aktivitätsmessung der adulten Tieren (PND 100) im open field.....</i>	<i>54</i>
4.4.2	Passive Vermeidung.....	56
4.4.3	Ultraschall Vokalisation.....	57
4.4.4	Katalepsie.....	58
<b>4.5</b>	<b>Geschlechtsspezifische Verhaltensversuche.....</b>	<b>61</b>
4.5.1	Süßpräferenz.....	61

4.5.2	Konditionierte Platzpräferenz.....	67
<b>4.6</b>	<b>Hormonmessungen.....</b>	<b>68</b>
4.6.1	Serumkonzentration von Östradiol und Testosteron.....	68
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
<b>5.1</b>	<b>Körperliche Entwicklung.....</b>	<b>72</b>
<b>5.2</b>	<b>Innere PCB-Belastung.....</b>	<b>73</b>
<b>5.3</b>	<b>Verhaltensversuche.....</b>	<b>74</b>
5.3.1	Open field.....	74
5.3.2	Passive Vermeidung.....	75
5.3.3	Katalepsie.....	76
5.3.4	Ultraschall Vokalisation.....	76
<b>5.4</b>	<b>Geschlechtsspezifische Verhaltensversuche.....</b>	<b>77</b>
5.4.1	Süßpräferenz.....	77
5.4.2	Konditionierte Platzpräferenz.....	78
<b>5.5</b>	<b>Hormonmessungen.....</b>	<b>79</b>
5.5.1	Serumkonzentration von Testosteron und Östrogen.....	79
<b>5.6</b>	<b>Sexualhormone und Gehirnentwicklung.....</b>	<b>81</b>
<b>5.7</b>	<b>Toxikologische Bewertung.....</b>	<b>83</b>
5.7.1	Toxizitätsäquivalenzfaktor (TEF).....	83
5.7.2	Referenzwerte für PCB.....	84
5.7.3	„Human-Biomonitoring-Werte“ .....	85
<b>5.8</b>	<b>Umweltmedizinische Relevanz.....</b>	<b>86</b>
<b>5.9</b>	<b>Welche Probleme gibt es bei der gesundheitlichen Beurteilung?.....</b>	<b>88</b>
5.9.1.	Berücksichtigung von Metaboliten.....	88
5.9.2	Kombinationswirkung mit andere Kontaminanten.....	88
5.9.3	Berücksichtigung der Langzeitaufnahme.....	88
<b>5.10</b>	<b>Schwierigkeiten der Risikobewertung.....</b>	<b>89</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>93</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Polychlorierte Biphenyle: Stoffmonographie

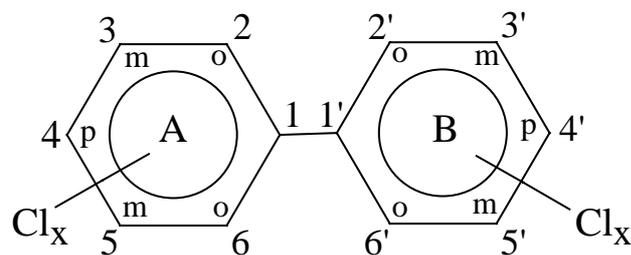
PCB gehören zu den halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen mit der Summenformel  $C_{12}H_{10-x}Cl_x$  ( $x = 1$  bis 10, MG 189-499 je nach Anzahl der Chloratome, siehe Abbildung 1).

Aus der Anzahl der Chloratome und deren Stellung im Molekül (10 mögliche Positionen) lassen sich 209 verschiedene Einzelverbindungen, die sogenannten PCB Kongenere ableiten.

Die systematische Numerierung der PCB folgt den Regeln der IUPAC („International Union of Pure and Applied Chemistry). Zur Vereinfachung der Nomenklatur wurden die 209 verschiedenen Kongenere nach Ballschmiter und Zell durchnummeriert (Ballschmiter et al., 1980).

Weltweit wurden PCB-Gemische mit unterschiedlichem Chlorierungsgrad unter verschiedenen Namen z.B. Aroclor und Pyranol (USA, Monsanto), Clophen (BRD, Bayer), Phenoclor (Frankreich), Sovol (UDSSR), Fenchlor (Italien) und Kanechlor (Japan) hergestellt. Die Bezeichnung Aroclor 1242 beschreibt ein PCB-Gemisch von chlorierten Biphenylen, wobei die letzten beiden Ziffern des Nummerncodes Aufschluß über den Chlorierungsgrad in Prozent geben, also bei Aroclor 1242 42 %.

Aufgrund ihrer thermischen Stabilität (nicht brennbar), ihrer chemischen Beständigkeit gegenüber Säuren und Alkalien und ihrer guten dielektrischen Eigenschaften wurden die PCB vielfältig industriell genutzt. PCB sind wasserhelle Flüssigkeiten von dünnflüssiger bis viskoser oder harziger Konsistenz.



**Abb. 1:** Struktur der polychlorierten Biphenyle und Reihenfolge der Bezifferung der Chlorsubstitution am Ring A: ungestrichene Ziffern bzw. Ring B: gestrichene Ziffern, o = ortho; m = meta; p = para.

## 1.2 Polychlorierte Biphenyle: Herstellung und Verwendung

PCB wurden erstmals 1881 synthetisiert. Technisch wurden sie seit 1929, hauptsächlich jedoch in den 50er Jahren weltweit hergestellt und verwendet (DeVoogt et al., 1989). PCB wurden eingesetzt als Weichmacher in Farben, Lackharzen, Kunststoffen, Papierbeschichtungsmitteln, Schmier-, Imprägnier- und Flammschutzmitteln, als Additive in Kittungen, Dichtungsmassen, Spachtelmassen, Preßspanplatten, als Wärmeaustauschflüssigkeit und als Hydraulikmittel. Mengenmäßig sind die PCB vor allem weit verbreitet als Kühlmittel in Transformatoren und als Dielektrikum in Kondensatoren (Hutzinger et al., 1974, WHO 1993, DFG 1988).

Die PCB-Verwendung wurde 1973 durch eine EG-Richtlinie (76/769 EWG) auf den Einsatz in geschlossenen Anlagen beschränkt. 1979 wurde die PCB-Produktion in den USA verboten. In Deutschland dürfen PCB nach der Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaft und nach der 10. Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes der Bundesregierung seit 1983 nicht mehr hergestellt werden. Die PCB-Produktion wurde von Bayer 1982 eingestellt. Laut Gefahrstoffverordnung dürfen seit dem 01.01.1989 PCB, PCB-haltige Produkte und Geräte nicht mehr hergestellt, importiert, exportiert oder verkauft werden.

Trotz der Rechtsvorschriften, die Verwendung und Ausbreitung der PCB begrenzen sind PCB aufgrund ihrer Persistenz und begründet durch hohe thermische Stabilität und Lipophilie, noch weiterhin in großen Mengen ubiquitär verbreitet (Safe et al., 1987) und gelangen insbesondere durch Abfalldeponierung und Müllverbrennungsanlagen weiterhin in die Umwelt. Es sind noch größere Mengen an PCB in geschlossenen Anlagen (z.B. Hydraulikflüssigkeit), elektrischen Geräten (z.B. Transformatoren), in Abfalldeponien und in anderen Altlasten vorhanden. Nach Schätzung der National Academy of Science (1974) wurden 1978 insgesamt 1 Million Tonnen PCB produziert, von denen bisher höchstens ca. 30% in die Umwelt gelangt sind .

## 1.3 Vorkommen

Aufgrund ihrer Lipophilie und Persistenz reichern sich PCB in der Nahrungskette an, so dass die höheren Glieder der Nahrungskette am stärksten belastet sind. Die geringe Wasserlöslichkeit der PCB nimmt mit zunehmendem Chlorgehalt ab. In der Umwelt sind bisher ca. 132 PCB-Kongeneren nachgewiesen worden, die sich in ihrer toxischen Potenz, sowie in ihrer biologischen und toxischen Wirkung deutlich unterscheiden (Seegal, 1996). Das Kongeneren-Muster in

technischen PCB-Gemischen unterscheidet sich von der in Umweltproben gefundenen Kongeneren-Zusammensetzung (Safe, 1994).

Hohe PCB Konzentrationen finden sich insbesondere in öffentlichen Gebäuden, z.B. Schulen und Kindergärten, die bis 1975 in Großplattenbauweise unter Verwendung PCB-haltiger Fugendichtungsmassen (z.B. Thiokol) hergestellt wurden. Im Bundesland Hessen wurden in Schulen PCB-Konzentrationen in der Raumluft zwischen 80 und 5600 µg/m<sup>3</sup> gemessen.

In der Luft überwiegen die leicht flüchtigen niederchlorierten PCB (Indikator-Kongener PCB 28, 52 und 101). In tierischen Nahrungsmitteln finden sich höherchlorierte PCB (Indikator-Kongener PCB 138, 153 und 180).

PCB konnten nachgewiesen werden in Luft, Wasser, Boden, Sedimenten, Klärschlamm, Pflanzen und Tieren (Hansen, 1987, WHO 1993, Safe, 1994). Besonders bedenklich ist die Anreicherung in der Nahrungskette. In Lebensmitteln tierischen Ursprungs befinden sich nachweislich noch 60-70 Kongener PCB (Marquardt et al., 1994). Die besonders toxischen höherchlorierten PCB sind schlecht abbaubar und reichern sich durch ihre Lipophilie vor allem in tierischen Lebensmitteln an. Der Anteil höherchlorierter PCB (mehr als 5 Chloratome) macht in menschlichen Fettproben mehr als 90% aus (Schulte et al., 1984).

## **1.4 Aufnahme, Verteilung und Elimination**

### **1.4.1 Aufnahme**

Die PCB Belastung des Menschen ist hauptsächlich auf den Verzehr tierischer Lebensmittel zurück zu führen. Nach Unfällen im Umgang mit PCB und langfristiger Exposition mit PCB am Arbeitsplatz wurden folgende PCB-Wirkungen beobachtet: dermale Läsionen, Mutagenität, Teratogenität, Immuntoxizität und Neurotoxizität.

Als ein Endglied in der terrestrischen Nahrungskette akkumuliert der Mensch die PCB in besonderem Maße. Aufgenommen werden PCB überwiegend mit der Nahrung (Beck, 1990, Kimbrough, 1995). Die PCB-Belastung des Menschen beruht bis zu 90 % auf dem Verzehr tierischer Fette und Lebensmittel (Milch, Milchprodukte, Fleisch, Fisch), für die daher in der Schadstoff-Höchstmengen-Verordnung Grenzwerte festgelegt wurden. In einigen epidemiologischen Untersuchungen korreliert die konsumierte Fischmenge nachweislich mit den PCB-Konzentrationen in der Muttermilch (Schwartz et al., 1983, Grandjean et al., 1995).

Die tägliche PCB-Aufnahme durch die Nahrung ist in den meisten Industrieländern rückläufig. In Deutschland sank die PCB-Aufnahme über die Nahrung für Erwachsene von ca. 0,05 µg PCB/kg KG Ende der 80er Jahre auf ca. 0,02 µg/kg KG Ende der 90er Jahre (Brunn et al., 1989, Kibler et al., 1990, Heinzow, 1998). Auch der PCB-Gehalt in menschlicher Muttermilch geht seit Ende der 70er Jahre deutlich zurück (Dewailly et al., 1969, DFG, 1988, Patterson et al., 1994). Der gestillte Säugling erhält über die Frauenmilch täglich ca. 3 µg PCB/kg KG (Vieth 1996).

Als weiterer Belastungspfad kann in kontaminierten Räumen der Inhalationsweg Bedeutung erlangen. Als Innenraumkontaminationsquellen sind von den PCB-enthaltenden Baumaterialien vor allem dauerelastische Dichtungsmaterialien zu nennen, die durchschnittlich 15% PCB enthalten.

Mit der Nahrung werden ca. 0,1 µg/kg KG und Tag aufgenommen. Nach BGA sollte die zusätzliche Belastung über den Luftpfad nicht mehr als 10% der maximal tolerierbaren Gesamt-PCB-Tagesaufnahme (1 µg/kg KG) betragen. Bei ganztägigem Aufenthalt in kontaminierten Räumen soll laut BGA die PCB-Raumluftkonzentration im langfristigen Mittel 300 ng/m<sup>3</sup> nicht überschreiten. Der Interventionswert, bei dessen Überschreitung im Sinne des vorbeugenden Gesundheitsschutzes unverzüglich Sanierungsmaßnahmen einzuleiten wären, wurde auf 3000 ng/m<sup>3</sup> festgelegt (Suchenwirth et al., 1998). Es wurde jedoch nicht definiert, ob dieser Wert auf eine 8- oder 24-stündige Expositionszeit zu beziehen ist.

Die PCB-Konzentrationen in der Luft liegen bei 0,1 bis 10 ng/m<sup>3</sup>. Als jährliche Ablagerung wurden 1 bis 3 µg/m<sup>2</sup> gemessen (Kimbrough, 1995). Der MAK-Wert wurde mit 1 mg/m<sup>3</sup> festgelegt, wobei in diesem Wert PCB mit einem Chloranteil von 42% berücksichtigt wurden, da vor allem die niederchlorierten PCB in der Innenraumluft nachgewiesen werden (Roskamp, 1992). Der Luftpfad als Kontaminationsquelle spielt eine untergeordnete Rolle. Bei einer 50%igen Resorption in der Lunge fallen die inhalative Aufnahme und die dermale Resorption (bei Rhesusaffen 20%ige Resorption von Aroclor 1242) im Vergleich zur oralen Aufnahme mit einer Resorptionsquote von 90% nicht ins Gewicht (Expert Panel 1994, Dahl et al., 1995). Die lipophilen Eigenschaften der PCB begünstigen die Resorption im Magen-Darm-Trakt (Zimmermann et al., 1995).

### **1.4.2 Verteilung im Körper**

Abhängig von ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften verteilen sich die PCB-Kongenere unterschiedlich im Körper. Eine Woche nach der Gabe einer oralen Dosis von PCB 153 wurden 81% der PCB im Körper von Ratten nachgewiesen. Diese verteilen sich mit 64% auf das Fettgewebe, 11% Haut, 5% Muskulatur, 1% Leber und jeweils 0,1% bis 0,3 % auf die Lunge, das Blut, und das Gehirn (Yoshimura et al., 1985).

Die PCB-Kongenere können im Körper je nach Chlorierungsgrad unterschiedlich akkumulieren, somit ist durch die Lipophilie bedingt der PCB die Konzentration im Fettgewebe wesentlich höher ist als in anderen Geweben. Des weiteren erhöht sich die Anreicherung im Fettgewebe mit steigender Chlorsubstitution in ortho-Position. Ebenso verteilen sich die PCB-Kongenere auch abhängig vom Chlorierungsgrad unterschiedlich auf die Lipid- oder Proteinfraction. Die hexachlorierten Biphenyle verteilen sich im Gewebe von Leber und ZNS zu rund 90% auf die Lipidfraktion und zu rund 10% auf die Proteinfraction (DFG, 1980, Bühler et al., 1988).

### **1.4.3 Anreicherung, Metabolismus und Elimination:**

PCB werden kongenerenspezifisch durch Cytochrom P-450-abhängige mischfunktionelle Monooxygenasen über die Zwischenstufe von Epoxiden hauptsächlich in Phenole umgewandelt. Anzahl und Position der PCB-Kongenere bestimmen die Oxidationsgeschwindigkeit und Verweildauer der Kongenere. In der Phase-I-Reaktion gebildete Metabolite werden in der Phase-II-Reaktion zu wasserlöslichen Glucuroniden und Acetaten konjugiert und so aus dem Organismus eliminiert. Die Hydroxylierung über Epoxid-Intermediate führt zu Hydroxy-PCB und Phenol. Für die Hydroxylierung der PCB sind vor allem bestimmte Cytochrome P-450-Isoenzyme von Interesse (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 3A3, CYP 3A4). Ortho-substituierte PCB-Kongenere werden bevorzugt durch Phenobarbital induzierbare P-450-abhängige Monooxygenasen metabolisiert. Nicht-ortho-substituierte (koplanare Konformation) PCB-Kongenere werden bevorzugt von den Cytochromen CYP 1A1 und CYP 1A2 metabolisiert (Kaminsky et al., 1981, Kennedy et al., 1981).

## **1.5 Unterteilung und Wirkung von PCB**

Aufgrund der unterschiedlichen Konformation und damit verbundenen Interaktionen der PCB mit dem Ah-Rezeptor (Arylhydrocarbon-Rezeptor) können die PCB in drei große Gruppen unterteilt werden (Seegal, 1996).

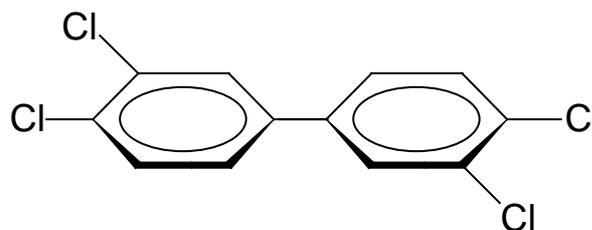
### 1.5.1 Koplanare PCB

Zu dieser Gruppe gehören 20 PCB-Kongenerere ohne Chlorsubstitution in den ortho-Positionen (2,2', und 6,6'). Die beiden aromatischen Ringe sind daher frei drehbar und befinden sich in einer Ebene (planare Anordnung, siehe Abbildung 2). Diese Dioxin-ähnlichen PCB-Kongenerere sind Arylhydrocarbon-Rezeptor-Agonisten (Ah-R). Der Ligand-Rezeptor-Komplex bildet sich im Zytosol und wandert in den Zellkern ein, wo er an DNA bindet und die Expression bestimmter Gene moduliert. Ein endogener Ligand ist nicht bekannt. PCB und 2,3,7,8-TCDD induzieren durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen (Dioxin-Responsive Elements, DRE) u.a. die fremdstoffmetabolisierenden Monooxygenasen Cytochrom P-450 1A1 und 1A2 (Safe et al., 1985). Die koplanaren PCB beeinflussen die Transkription verschiedener Gene und haben somit je nach Genprodukt und gewebespezifischer Konzentration der Ah-Rezeptoren vielfältige toxische Wirkungen. Die Elektronenaffinität des coplanaren PCB-Moleküls ist Voraussetzung für die Kopplung an den Ah-Rezeptor, wohingegen die Planarität, die geringe Lipophilie und der geringe Entropiegrad über die Bindungsstärke am Rezeptor und das Ausmaß der toxischen Wirkung entscheiden. Die Interaktion mit dem Ah-Rezeptor ist dosisabhängig und verläuft in einer Sättigungskurve (Kafafi et al., 1993).

Koplanare PCB sind u.a.: PCB 77 = 3,3',4,4' - Tetrachlorbiphenyl

PCB 126 = 3,3',4,4',5 - Pentachlorbiphenyl

PCB 169 = 3,3',4,4',5,5' - Hexachlorbiphenyl



**Abb. 2:** PCB-Kongenerere mit ebener, koplanarer Konformation

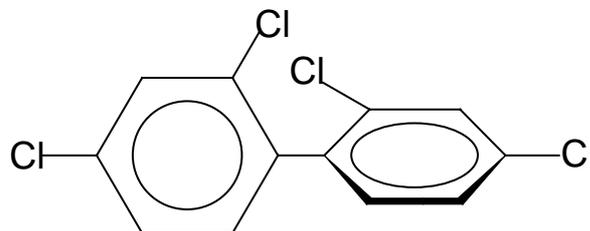
Mäuse zeigten nach einer maternalen Belastung mit 32 mg/kg KG 3,3',4,4',-TCB (Koplanares PCB 77) vom 10. bis 16. Tag der Gestation verschiedene Auffälligkeiten. Das Gewicht der Nachkommen war reduziert und die Sterblichkeit erhöht (Chou et al., 1979). Die Dopamin-Konzentration im Corpus Striatum war reduziert, die motorische Aktivität im Alter von PND 360 war deutlich vermindert (Agrawal et al., 1981) und es traten neuromuskuläre Dysfunktionen auf (Tilson et al., 1979). In Kanzerogenitätsstudien mit unterschiedlichen PCB-Kongeneren waren die dioxinähnlichen PCB-Kongenerere am potentesten (Chu et al., 1994). Auch im Bezug

auf die Immuntoxizität zeigen die coplanaren PCB ausgeprägte Effekte: Thymusatrophie, Knochenmarkdepression sowie Hypoplasie und Atrophie der Milz (Golup et al., 1995, Zimmermann et al., 1995). Metabolite der coplanaren Kongenere blockieren die Bindungsstellen für Schilddrüsenhormone an ihren Serum-Transportproteinen (Brouwer et al., 1990).

### 1.5.2 Ortho-chlorierte PCB-Kongenere

Die sterische Interaktion von zwei ortho-substituierten Chloratomen führt dazu, daß sich die beiden Phenylringe nicht planar ausrichten können sondern eine gewinkelte, verdrehte Konformation einnehmen (vorwiegend im 90°-Winkel, siehe Abb. 3). Bei diesen Kongeneren ist durch die reduzierte Planarität und vor allem durch die geringere Elektronenaffinität die Interaktion und Bindungsaffinität zum Ah-Rezeptor vermindert. Kongenere, die mindestens an zwei ortho-Positionen chloriert sind, induzieren das gleiche Monooxygenase-System wie Phenobarbital (Cytochrom P-450 2B1 und 2B2) (Safe, 1994). Die ortho-chlorierten PCB-Kongenere und ihre Metaboliten besitzen tumorpromovierende, neurotoxische und endokrine Eigenschaften (Barnes et al., 1991, Birnbaum et al., 1995).

Nicht koplanare PCB sind u.a.: PCB 101 = 2,2',4,5,5' Pentachlorbiphenyl  
PCB 138 = 2,2',3,4,4',5' Hexachlorbiphenyl  
PCB 146 = 2,2',3,4',5,5' Hexachlorbiphenyl  
PCB 153 = 2,2',4,4',5,5' Hexachlorbiphenyl  
PCB 170 = 2,2',3,3',4,4',5 Heptachlorbiphenyl  
PCB 180 = 2,2',3,4,4',5,5' Heptachlorbiphenyl  
PCB 187 = 2,2',3,4',5,5',6 Heptachlorbiphenyl



**Abb. 3:** Di-ortho-PCB-Kongener mit verdrehter, gewinkelter Konformation

### 1.5.3 Mono-ortho-PCB-Kongenere

Mono-ortho-substituierte PCB sind unsymmetrisch substituierte Kongenere. Sie besitzen wenigstens ein Chloratom in der ortho-Stellung und weitere in meta- und para-Position. Die 48 Kongenere aus dieser Gruppe können nicht oder nur in reduziertem Ausmaß mit dem Ah-Rezeptor agieren. Sie besitzen eine deutlich geringere Fähigkeit zur Induktion von hepatischen Enzymen als coplanare PCB. Mischinducer sind mono-ortho- und di-ortho-Chlorderivate des coplanaren PCB77. Die Toxizität dieser Kongenere ist der des 2,3,7,8-TCDD qualitativ ähnlich, jedoch schwächer ausgeprägt (Safe, 1984). Sie werden als Mischinducer bezeichnet, da sie sowohl die Cytochrome P-450 1A1 und 1A2 als auch andere Cytochrome induzieren. Die Kongenere dieser Gruppe wie z.B. PCB 138, 156, 170 und 189 machen fast 40% der gesamten PCB-Belastung des menschlichen Fettgewebes aus (Brunn et al., 1990).

Mono-ortho-substituierte Kongenere sind u.a.:

- PCB 28 = 2,4,4' - Trichlorbiphenyl
- PCB 105 = 2,3,3',4,4' - Pentachlorbiphenyl
- PCB 118 = 2,3',4,4',5, - Pentachlorbiphenyl
- PCB 156 = 2,3,3',4,4',5, - Hexachlorbiphenyl

## 1.7 Akute und Chronische Toxizität

Im Allgemeinen haben PCB keine oder nur sehr geringe akute Toxizität. Eine letale Dosis führte im Tierversuch zu allgemeinen Symptomen wie Entkräftung und Mattigkeit („Wasting Syndrom“) und führte erst nach 3 Wochen zum Tod (Rogan et al., 1992). Der LD<sub>50</sub>-Wert für Ratten wird bei oraler Zufuhr von technischen Gemischen abhängig vom Chlorierungsgrad in einem Bereich von 1 bis 11g/kg angegeben (Ahlborg et al., 1992).

Dagegen führt die chronische Belastung mit PCB auch bei niedriger Dosierung zu vielfältigen toxischen Effekten. Hiervon betroffen sind vor allem das Reproduktionssystem, Entwicklungsprozesse und das Immunsystem (Kimbrough, 1995). Der NOAEL für technische Gemische liegt für Ratten bei 0,5 mg/kg KG/Tag (Zimmermann et al., 1995).

Die Untersuchungen zur chronischen Toxizität mit hoher Expositionsrate zeigten im Tierversuch vielfältige pathologische Befunde (Ahlborg et al., 1992, Safe, 1994, Brouwer et al., 1995). Besonders auffällig sind: Hypertrophie und Hyperplasie der Hepatozyten, hepatische Porphyrie, Atrophie von Thymus und Milz, pathologische Veränderungen der Nieren, Hyperpigmentierung der Haut, „Chlorakne“, teratogene Effekte, Auswirkungen auf die Lungen, das Reproduktionssystem, Kanzerogenität, Neurotoxizität und endokrine Veränderungen.

Schädigungen des zentralen Nervensystems äußern sich in Erschöpfungszuständen, Schwindel und Erbrechen. Auf neurochemischer Ebene wurden strukturabhängige Effekte verschiedener PCB-Kongeneren auf den Dopaminhaushalt (Seegal et al., 1990) und den Schilddrüsenhormonstatus (Porterfield, 1994) sowie verschiedene östrogene und antiöstrogene Wirkungen (Jansen et al., 1993; Nesaretnam et al., 1996) beschrieben. Im Reproduktionssystem werden fetale Toxizität, Entwicklungs-mißbildungen, Fertilitätsstörungen und vielfältige Hodenabnormalitäten als Endpunkte chronischer Toxizität beschrieben (Safe, 1994). Bei chronischer Exposition von Ratten mit ortho-chlorierten und coplanaren Kongeneren traten Chromosenschäden im Knochenmark und erhöhte Polyploidie in den Zellen auf (Meisner et al., 1992). Immunsuppressive Effekte wurden auch bei maternal belasteten Rhesusaffen beobachtet. Die Muttertiere waren mit Aroclor 1248 in einer Dosis von 2,5 mg/kg oder 5 mg/kg Futter exponiert (entsprechend 0,1 mg/kg KG oder 0,2 mg/kg KG). Bei 3 von 6 Jungtieren, die im ersten Lebensjahr starben zeigte sich eine Atrophie von Thymus und Lymphknoten sowie eine Verringerung der Zellzahl im Knochenmark (Allen et al., 1976).

## 1.8 Neurotoxizität

Das sich entwickelnde Nervensystem zeigt sich in bisherigen epidemiologischen Studien an Kindern und nach experimentellen Ergebnissen mit Ratten als besonders empfindlich gegenüber einer PCB-Exposition (Rogan et al., 1986, Lilienthal et al., 1991). In einem Kreuzaufzucht-experiment mit Ratten, die mit einem technischen PCB-Gemisch (30 mg Clophen A 30/kg) exponiert wurden, konnte in unserer Arbeitsgruppe erstmals gezeigt werden, daß die pränatale Exposition mit PCB im Gegensatz zur postnatalen Exposition zu ausgeprägten Änderungen bestimmter Verhaltensleistungen bei den Nachkommen führt. (Lilienthal et al., 1991).

PCB können aufgrund ihrer Lipidlöslichkeit die Plazenta passieren. Embryotoxische Wirkungen wurden bei verschiedenen Tierarten gefunden. Neben der verringerten Zahl von Nachkommen wurden Verzögerungen in der Entwicklung beobachtet (Marks et al., 1981). Die Befunde geben ein einheitliches Bild hinsichtlich der möglichen teratogenen Wirkung von PCB. Die Geburtsgewichte der Nachkommen von Rhesusaffen, die 87 Wochen lang 1 mg Aroclor 1216 pro kg Futter erhalten hatten (Gesamtaufnahme  $18 \pm 3$  mg), waren signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren (Barsotti et al., 1984).

Die zwei wesentlichen Gründe für die embryotoxische Wirkung sind:

1. Die Detoxifikation und Giftstoffeliminierung des Ungeborenen ist noch nicht voll leistungsfähig (Dvorchik, 1981).

2. Die unreife Blut-Hirn-Schranke des Ungeborenen kann das Gehirn noch nicht effektiv vor schädigenden Einflüssen schützen (Woodbury, 1974).

### **1.8.1 Dopaminerges und serotonerges System**

Ortho-chlorierte Kongenere führten im Gegensatz zu koplanaren Kongeneren bei Ratten zu reduzierter Ausschüttung von Dopamin in Gehirnschnitten und bei in vitro Versuchen an Phäochromocytom-Zellen (PC-12-Zellen) zu erniedrigten Dopaminkonzentrationen (Shain et al., 1991, Seegal, 1996). Eine pränatale Exposition mit 32mg 3,4,3',4'-TCB/kg KG führte bei adulten Mäusen zu erniedrigten Dopaminspiegeln im Striatum (Agrawal et al., 1981). In unserer eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine pränatale Exposition von Ratten mit dem koplanaren 3,4,3',4'-TCB und dem Thyreostatikum PTU bei den Nachkommen an PND 40 zu einer Erniedrigung des Quotienten Homovanillinsäure/Dopamin im präfrontalen Cortex bewirkt. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zu den Müttern, die eine erhöhte Metabolitenbildung im Nucleus accumbens aufwiesen, der Dopaminumsatz verringert war (Weinand-Härer, 1996). Bei den PCB-exponierten Nachkommen war sowohl das Dopamin als auch das DOPAC im präfrontalen Cortex erhöht.

## **1.9 Wechselwirkung der PCB mit dem endokrinen System**

Seit einiger Zeit werden PCB wie viele andere umweltrelevante Chemikalien als sogenannte „endocrine disrupting chemicals“ diskutiert, deren hormonähnliche Wirkung mit möglichen Änderungen bei der geschlechtlichen Entwicklung und dem Schilddrüsenhormonstatus, mit gestörter Fertilität und erhöhtem Krebsrisiko bei den Fortpflanzungsorganen in Verbindung gebracht werden (Feeley et al., 1995, European Commission, 1996, Golden, 1998). Ca. 30 Pestizide, Industriechemikalien und andere persistente organische Verbindungen werden von Ökotoxikologen als Verbindungen mit einer schwachen Östrogenwirkung belegt. Es ist denkbar, daß diese Chemikalien an der Entstehung von hormonabhängigen Erkrankungen (z.B. Unfruchtbarkeit, Hodenkrebs, Brustkrebs) beteiligt sind. Es liegen aber noch zu wenig Daten vor, um diese Hypothese zu beweisen oder zu widerlegen. Bekannt sind Fortpflanzungs- und Entwicklungsstörungen als experimentelle Endpunkte (Ryan et al., 1990; Golub et al., 1991, Tilson et al., 1997).

Hormonartig wirkende exogene Substanzen können durch unterschiedliche Wirkmechanismen in das Hormonsystem eingreifen. Sie können in die Synthese, die Freisetzung, den Transport, den Metabolismus, die Bindungsvorgänge, die Wirkung oder die Elimination der natürlichen Hormone eingreifen. Hormonähnliche Chemikalien ahmen natürliche Hormone nach, inhibieren die Wirkung von Hormonen oder verändern die normale regulatorische Funktion des Immun-, Nerven-, und endokrinen Systems.

### 1.9.1 Sexualsteroid

In der Literatur mehren sich die Hinweise auf verschiedene östrogene und antiöstrogene Wirkungen der PCB mit verändertem Plasma-Spiegel von Östrogen und Progesteron bei verschiedenen Spezies (Jansen et al., 1993; Nesaretnam et al., 1996). Es wurde auch eine Wirkungen auf die Transkriptionsrate von Östrogenrezeptor-mRNA belegt (Lundkvist et al., 1987, Patnode and Curtis 1994, Chaffin 1996).

**Tab. 4:** PCB-Gemisch-induzierte endokrine Veränderungen im Tierversuch. ↑ = gesteigerte und ↓ = reduzierte Veränderung (Ahlborg et al., 1992).

Hormon	Parameter	Spezies
Progesteron	↓ Plasmakonzentration	Ratten
	↑ Metabolismus	Ratten
Östrogen	↓ Bindung an Uterus-Rezeptoren	Ratten
Östradiol	↓ Plasmakonzentration	Affen
Testosteron	↑ Metabolismus	Ratten
Androstendion	↑ Metabolismus	Ratten
Corticosteroide	↑↓ Plasmakonzentration	Ratten, Maus
Thyroxin	↓ Plasmakonzentration	Ratten, Maus
Schilddrüse	↑ Aktivität	Ratten
	↑ Gewicht	Ratten

## 1.9.2 Schilddrüsenhormone

Perinatale PCB-Exposition sowohl mit coplanaren als auch mit hochdosierten ortho-chlorierten Kongeneren ist assoziiert mit einer Reduktion der Schilddrüsenhormone (Barter et al., 1992, Barter et al., 1994, Brouwer et al., 1990, Brouwer, 1991, Ness et al., 1993, Van Birgelen et al., 1995). PCB greifen zusätzlich über verschiedene Mechanismen in das Hormonsystem ein (Brouwer, 1984). Veränderungen zirkulierender Schilddrüsenhormon-Mengen betreffen beim Erwachsenen vielfältige physiologische Endpunkte. Während der Schwangerschaft, als zeitlich begrenzte kritische Periode, sind die Hormonkonzentrationen entscheidend für eine normale Entwicklung des Embryos (Porterfield et al., 1998, Haddow, et al., 1999). Schilddrüsenhormone spielen eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung des Gehirns. Sie sind beteiligt an der Regulation der embryonalen Proliferationsrate von Neuronen und Glia-Zellen, sie steuern die Migration, die Differenzierung des Zytoskeletts, das Neuritenwachstum, die Synaptogenese und die Myelinbildung in Oligodendrozyten (Porterfield et al., 1993).

Während der Gravidität wird Thyroxin zu einem Großteil von der Mutter auf den Fötus übertragen und von diesem in das biologisch aktive  $T_3$  umgewandelt. Entwicklungsverzögerungen, die mit chronischer PCB-Exposition in Zusammenhang stehen, werden mit Veränderungen im Schilddrüsenhormonsystem in kritischen Phasen der Gehirnentwicklung in Verbindung gebracht (Porterfield, 1994). Pränatale PCB-Exposition von Menschen führt zu erniedrigten Schilddrüsenhormon-Spiegeln der Nachkommen (Koopman-Esseboom et al., 1994). Es besteht ein Zusammenhang zwischen mütterlichem Konsum von PCB-kontaminiertem Fisch und Entwicklungsstörungen bei Tieren (Beattie et al., 1996) sowie beim Menschen (Jacobson et al., 1990).

Erniedrigte Schilddrüsen-Hormonkonzentrationen bei PCB Belastung resultieren aus a) einem verstärkten Abbau der Hormone, b) aus einer Blockade der Bindungsstellen an ihren Serumtransportproteinen und c) einer verminderten Proteolyse von Thyreoglobulin und Freisetzung von  $T_4$  und  $T_3$ .

Eine Erhöhung im Metabolismus von Schilddrüsenhormonen nach Exposition von Ratten mit einem PCB-Gemisch (A 1254) ist die Folge einer Induktion von UDP-Glucuronosyltransferase durch koplanare und mono-orthosubstituierte Kongenere (Barter et al., 1992, Barter et al., 1994). Die UDP-Glucuronosyltransferase ist ein mikrosomales Phase-II-Enzym, das die Bildung von T<sub>4</sub>-Glucuroniden katalysiert, wodurch sie über die Galle ausgeschieden werden können. Die erhöhte Ausscheidung der T<sub>4</sub>-Glucuronide belegt einen extrathyroidalen Wirkmechanismus der PCB (Barter et al., 1994). Ein weiterer Einfluss auf den Schilddrüsenhormonhaushalt ergibt sich aus der Bindung von PCB-Metaboliten an das Serumtransportprotein Transthyretin. Dieser Wirkmechanismus wurde für die Metaboliten des coplanaren PCB 77 (4-OH-3,3',4',5-Tetrachlorobiphenylol) und für die Metaboliten des mono-ortho-chlorierten PCB 105 bei Ratten (Brouwer et al., 1990, Brouwer, 1991, Moore et al., 1996 ) belegt. Zwar spielt beim Menschen Transthyretin eine untergeordnete Rolle für den Serumtransport, es ist aber für den Transport von T<sub>4</sub> ins Gehirn und vor allem auch über die Plazentaschranke von Bedeutung.

### 1.9.3 Östrogene Wirkqualität

Besonders kritische Lebensphasen für Östrogeneinwirkung sind die Embryonalphase, in der die sexuelle Differenzierung erfolgt (Bern, 1992) und die Kindheit, in der die endogenen Östrogenspiegel sehr niedrig sind (Klein et al., 1994). Verschiedene technische PCB-Gemische (Aroclor), die meisten der untersuchten PCB-Kongenere und PCB-Hydroxy-Metabolite zeigen im Tierversuch und im „in-vitro“-Experiment östrogene Wirkqualität aber auch antiöstrogene Wirkungen sind je nach Kongenertyp und Endpunkt beobachtet worden. Demgegenüber sind non-ortho-PCB und mono-ortho-PCB (PCB105) als antiöstrogen anzusehen. Die insgesamt überwiegend östrogene Wirksamkeit von PCB (siehe Tab. 5) stellt vermutlich einen Nettoeffekt aus östrogenen und antiöstrogenen Wirkungen der einzelnen Kongenere dar (Fischer et al., 1998, Battershill, 1994, Umweltbundesamt, 1997, Moore et al., 1997, Van Birgelen et al., 1995).

**Tab. 5:** Reproduktions- und Entwicklungseffekte von PCB-Gemischen. ↑ = gesteigerte und ↓ = reduzierte Veränderung (Ahlborg et al., 1992).

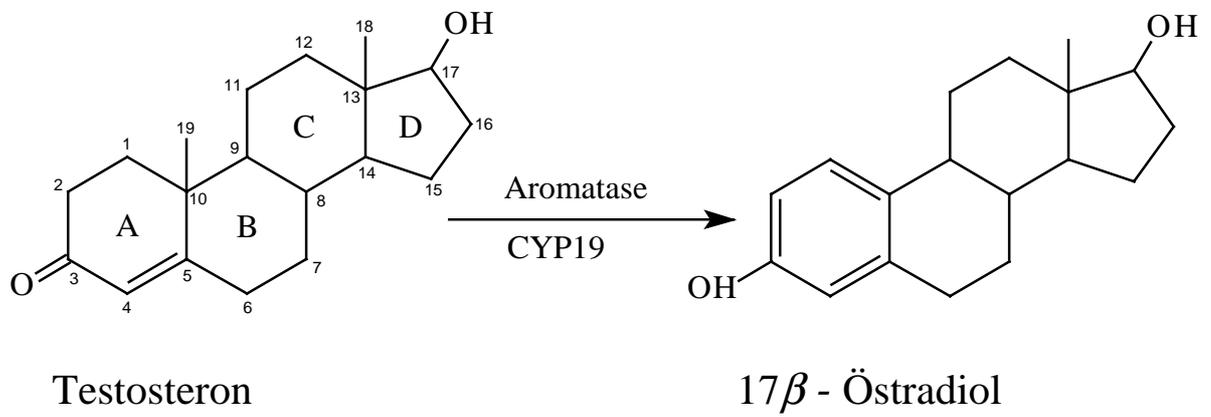
	Wirkung	Spezies
Männliches Reproduktionssystem	↓ Fertilität (postnatale Exposition)	Ratte
	↓ Paarung	Ratte
	↓ Spermatozoen Konzentration	Maus
	↓ Gewicht der ventralen Prostata	Ratte
Weibliches Reproduktionssystem	↑ Anovulation	Ratte
	↓ Veränderter Östruszyklus	Ratte, Maus, Affe
	↓ Gewicht von Uterus und Ovarien	Maus
Nachkommen	↓ Implantationsstellen	Ratte, Maus,
	↓ Fetale Entwicklung	Maus
	↑ Gestationsdauer	Ratte
	↓ Nachkommenzahl	Ratte, Maus,
	↓ Fetale, perinatale Überlebensrate	Ratte, Maus, Affe
	↓ Gewichtsentwicklung	Ratte, Maus, Affe

### 1.10 Geschlechtsspezifische Gehirndifferenzierung

Östrogen hat eine hohe Potenz bei der geschlechtlichen Gehirndifferenzierung. Bei Ratten-Männchen wird das Östrogen durch das Enzym Aromatase lokal synthetisiert, wohingegen das Östrogen in den Weibchen von den Ovarien produziert wird und an  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) gebunden die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr passieren kann. Das AFP wird 3-4 Wochen nach der Festlegung des Geschlechtes reduziert und erlaubt nun dem ungebundenen Östrogen Zutritt ins Gehirn. Östrogen fördert im Prozeß der Gehirnreifung die Synaptogenese und die synaptische Plastizität, wobei die Förderung der Proliferation und Differenzierung auch über die perinatale Periode hinaus auch im adulten Stadium anhält (Keefe et al., 1994).

Corticosteroid bindende Proteine schützen das Gehirn neugeborener Ratten vor dem Östrogen in der Muttermilch. Östrogene wie das Diethylstilbestron und Moxestrol, die nicht an AFP binden,

gewinnen aber Zugang zu neuronalen Östrogen-Rezeptoren und defeminisieren das Gehirn (Mc Ewen, 1994).



**Abb. 5:** Umwandlung von Testosteron in  $17\beta$  - Östradiol durch die Aromatase.

## 2. Fragestellung

Bisherige Studien haben im Zusammenhang mit der hormonartigen Wirkung von PCB in erster Linie reproduktionstoxische Endpunkte untersucht. Dagegen fehlen Untersuchungen, die die Rolle von Sexualsteroiden während der neuronalen Entwicklung sowie mögliche Veränderungen unter PCB-Belastung prüfen. Den ersten Hinweis auf PCB-induzierte geschlechtsspezifische Verhaltensänderung, die nicht das Sexualverhalten, sondern Lern- und Gedächtnisfunktionen betreffen, lieferte die Arbeit von Schantz et al. (1995). Diese Untersuchung ergab Lerndefizite in der verzögerten räumlichen Alteration im T-Labyrinth bei weiblichen, nicht aber bei männlichen adulten Ratten, die maternal mit ortho-chlorierten PCB-Kongeneren belastet waren.

Ferner ergaben Untersuchungen des Elektretinogramms in unserer Arbeitsgruppe eine geschlechtsspezifische Wirkung bei pränataler Belastung mit dem koplanaren PCB 77 (Kremer et al. 1999).

In den bisherigen Arbeiten zur Wirkung von PCB während der Entwicklung sind überwiegend technische Gemische oder Einzelkongenere untersucht worden. Beides wird der Belastungssituation in der Umwelt nicht gerecht. Unterschiedliche Abbauraten, Anreicherungsfaktoren und chemische Eigenschaften der PCB-Kongenere (Löslichkeit, Verdampfung, Adsorption, Photostabilität) führen zu einer unterschiedlichen Haltbarkeit und Zusammensetzung in der Umwelt. Das Kongeneren-Muster in technischen PCB-Gemischen unterscheidet sich von der in Umweltproben gefundenen Kongeneren-Zusammensetzung, denen der Mensch ausgesetzt ist (Safe, 1994).

Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe ein PCB Gemisch zusammengestellt, das nach dem Muster der in Muttermilch vorhandenen Kongenere rekonstituiert wurde (Hany et al., 1999). Es wurde basierend auf den Ergebnissen einer Reihe von Untersuchungen zusammengestellt, in denen das Muster der PCB-Kongere in der Muttermilch analysiert worden war.

### 2.1 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die Dosis-Wirkung von maternaler PCB-Exposition auf geschlechtsspezifisches Verhalten, emotionales Verhalten und Lernverhalten zu untersuchen.

Die Auswirkungen des PCB-Gemisches auf die sexuelle Differenzierung des Gehirns wurde durch die Ausprägung des geschlechtsspezifischen (nicht reproduktiven) Verhaltens der Nachkommen untersucht. Als Nachweis diente die Süßpräferenz. Im Hinblick auf einen möglichen Wirkmechanismus wurden bei Jungtieren sowie adulten Tieren die

Geschlechtshormone Testosteron und 17- $\beta$ -Östradiol gemessen. Basierend auf den von Hany (Hany et al., 1999) beschriebenen Ergebnissen sollten die Parameter Sexualhormonspiegel im Serum und Feminisierung des Verhaltens hinsichtlich einer möglichen Dosis-Wirkungsbeziehung zur PCB-Belastung untersucht werden.

Mit Hilfe der konditionierten Platzpräferenz sollte überprüft werden, ob die affektiven Eigenschaften von Testosteron bei PCB-exponierten Ratten verändert sind.

Die Versuchstiergruppen wurden mit drei unterschiedlichen PCB-Konzentrationen belastet, um den NOEL zu ermitteln. Diese tierexperimentellen Daten sollen die Wissensgrundlage zur PCB-Belastung erweitern und dazu beitragen, eine bessere Risikoabschätzung bezüglich der PCB-Belastung in der Umwelt vornehmen zu können.

### 3. Methoden

#### 3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden teilpigmentierte Long Evans Ratten (Auszucht) (Møllegaard, Dänemark) verwendet. Die Tiere lebten in Mehrfachhaltung mit bis zu 4 Tieren pro Käfig. Die Käfige des Typ IV (56 cm lang, 35 cm breit 20 cm hoch) enthielten grobes Holzeinstreu (Weichholzgranulat). Wasser (unbehandeltes Leitungswasser) und Futter in pelletierter Form (Ssniff, Soest) wurde ad libitum gereicht. Die Tiere wurden zweimal wöchentlich umgesetzt. Externe Faktoren, die die Aktivität der Tiere beeinflussen, wurden konstant gehalten. Die Tiere waren künstlichem Neonlicht mit einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt. Die Lichtphase dauerte von 6 Uhr bis 18 Uhr. Das Raumklima wurde mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und 23°C Raumtemperatur konstant gehalten. Das empfohlene Haltungsklima liegt bei 18-24°C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70% (Nebendahl et al., 1996). Zur Adaptation an haltungsbedingte Umgebungsgeräusche und plötzliche Geräuschveränderungen wurden die Tiere während der Lichtphase mit Radiomusik in Zimmerlautstärke (58dB) beschallt.

Eine Woche vor den Experimenten wurden die Versuchstiere zur Adaptation an die Haltungsbedingungen im Experiment in Einzelhaltung umgesetzt. Hierfür wurden durchsichtige Makrolankäfige mit Metalldeckel des Typs III (42 cm lang, 26 cm breit 15 cm hoch) verwendet.

Weibliche Long Evans Ratten (Møllegaard, Dänemark) wurden 50 Tage vor der Verpaarung und während der Trächtigkeit mit PCB-haltigem Futter exponiert. Ab dem Tag der Geburt erhielten die Tiere wieder unbelastetes Standard-Futter. Die Kontrolltiere erhielten durchgehend Standard-Futter, das nur Olivenöl als Vehikel enthielt (Olivenöl: DAB 10, Henry Lamotte, Bremen).

Es wurden jeweils ein männliches Tier und zwei weibliche Tiere zur Verpaarung in einen Käfig gesetzt. Nach 5 Tagen wurde dem Östruszyklus der Weibchen entsprechend die Männchen einer Gruppe untereinander ausgetauscht und noch einmal für 5 Tage verpaart. Die männlichen Tiere wurden nicht mit PCB belastet, bekamen aber während der Verpaarungszeit das gleiche Futter wie die weiblichen Tiere. Aus jeder Gruppe wurden 26 weibliche Tiere mit männlichen Tieren verpaart.

Die Tiere wurden im Alter von vier bis fünf Wochen geliefert und hatten ein Ausgangsgewicht von 60 bis 70 g. Nach einer vierwöchigen Eingewöhnungsphase hatten die Tiere ein Gewicht von ca. 120 g erreicht. Es wurden drei randomisierte Expositionsgruppen gebildet (siehe Tab. 6), die je nach Expositionsgruppe 5 mg, 20 mg oder 40 mg des rekonstituierten Gemisches pro kg Futter erhielten. Das PCB-Gemisch (PCB: Promochem, Wesel; Reinheitsgrad > 99,8%) war in Olivenöl als Vehikel gelöst und wurde vom Futterhersteller (Ssniff GmbH, Soest) in das Futter eingearbeitet. Der Hersteller garantiert einen Reinheitsgrad der PCB Kongenere von 99,8%. Eine 250 g schwere Ratte frißt täglich ca. 20 g Futter. Hieraus ergibt sich eine tägliche PCB-Belastung durch das Futter von 0,4 g für die RG5-Gruppe, 1,6 g für die RG20-Gruppe und 3,2 g für die RG40-Gruppe. Anhand dieser drei unterschiedlichen Belastungsgruppen sollte eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt werden.

**Tab. 6:** Expositionsgruppen und verabreichte PCB-Menge.

Gruppe	PCB-Menge im Futter [mg PCB-Gemisch pro Kg Futter]	Tägliche PCB Aufnahme [g]
Kontrollen	-	-
G5-Gruppe	5	0,4
G20-Gruppe	20	1,6
G40-Gruppe	40	3,2

Die Muttertiere wurden während der Trächtigkeit regelmäßig gewogen. Die Nachkommen wurden an den postnatalen Tagen (PND) 1, 5, 10, 15, 21, 50 und 70 gezählt und gewogen. Die Tiere wurden regelmäßig auf sichtbare toxische Symptome untersucht. Zum Ende der Säugephase an PND 21 wurden die Jungtiere von den Muttertieren getrennt und nach gleichgeschlechtlichen Geschwistern sortiert in Typ IV-Käfigen gehalten (4 Tiere pro Käfig). Für die späteren Verhaltensversuche war es wichtig, nach Möglichkeit jeweils nur ein Tier pro Wurf einzusetzen, wodurch die genetische Variabilität erhöht wurde.

In den Verhaltensversuchen wurden die pränatal mit einem PCB-Gemisch belasteten Nachkommen sowie die Kontrolltiere eingesetzt. Ein Teil der Mütter und Nachkommen wurde zur Blut- und Organentnahme getötet, um die innere Exposition und die Sexualhormone Testosteron und 17- $\beta$ -Östradiol zu bestimmen.



aus Humanstudien ermittelt (Lilienthal et al., 1998). Das PCB-Gemisch wurde in Olivenöl gelöst (Olivenöl DAB 10 Henry Lamotte, Bremen) und vom Futterhersteller dem Futter (Ssniff, AM, R-Z) zugesetzt (Ssniff GmbH, Soest). Der Reinheitsgrad der Kongenere betrug ca. 99,8% (Promochem, Wesel). Die Konzentration im Futter wurde analytisch überprüft und ergab eine Abweichung vom angestrebten Wert von weniger als 1%.

Die höher chlorierten Kongenere PCB 138, PCB 153 und PCB 180 gehören zu den 6 sogenannten Indikatorkongeneren, die ca. 60% der gesamten PCB-Menge in Humanproben ausmachen (Lilienthal et al., 1998).

**Tab. 8:** Zusammensetzung des rekonstituierten PCB-Gemisches (nach Lilienthal et al., 1998). Angaben in mg/g Gemisch mit Ausnahme von PCB 77, PCB 126 und PCB 169 Angaben in µg/g Gemisch.

<u>PCB Nummern</u> (Ballschmiter und Zell, 1980)	<u>IUPAC-Bezeichnung</u> (International Union of Pure and Applied Chemistry)	<u>Menge PCB (mg/g Gemisch)</u> PCB 77, PCB 126 und PCB 169 in µg/g Gemisch
PCB 28	2,4,4' Trichlorbiphenyl	59
PCB 101	2,2'4,5,5' Pentachlorbiphenyl	14
PCB 105	2,3,3',4,4' Pentachlorbiphenyl	25
PCB 118	2,3',4,4',5 Pentachlorbiphenyl	70
PCB 138	2,2',3,4,4',5' Hexachlorbiphenyl	221
PCB 146	2,2',3,4',5,5' Hexachlorbiphenyl	31
PCB 153	2,2',4,4',5,5' Hexachlorbiphenyl	276
PCB 156	2,3,3',4,4',5 Hexachlorbiphenyl	38
PCB 170	2,2',3,3',4,4',5 Heptachlorbiphenyl	74
PCB 180	2,2',3,4,4',5,5' Heptachlorbiphenyl	140
PCB 187	2,2',3,4',5,5',6 Heptachlorbiphenyl	48
PCB 77	3,3',4,4' Tertrachlorbiphenyl	17.9
PCB 126	3,3',4,4',5 Pentachlorbiphenyl	82.8
PCB 169	3,3',4,4',5,5' Hexachlorbiphenyl	37.3

### 3.3 Präparationen

Für die Messung der inneren PCB-Belastung und die Serum-Hormonkonzentration wurden zu bestimmten Zeitpunkten Muttertiere und Nachkommen getötet und präpariert (Tab.9). Die Präparationen wurden zwischen 8 und 13 Uhr durchgeführt. Die Tiere wurden mit CO<sub>2</sub> getötet. Die Gewebs- und Organproben mußten bis zur Aufarbeitung bei -20 °C tiefgefroren werden. Es wurden 50 ml Braunglas-Pulverflaschen (Klees, Düsseldorf) verwendet, die vorher je dreimal mit Hexan, Aceton und Milli Q Reinstwasser gespült und vier Stunden bei 200°C ausgeheizt wurden, um mögliche PCB-Hintergrundkontaminationen zu entfernen. Für die PCB-Bestimmung der Nachkommen wurden die Proben von einem Wurf gepoolt (5 bis 7 pro Wurf). Der Östruszyklus der weiblichen Tiere führt zu starken Schwankungen im Verhalten. Aus diesem Grund wurden nur männliche Nachkommen in den Verhaltensversuchen eingesetzt (Ausnahme: Süßpräferenz) und die weiblichen Nachkommen als Jungtiere (PND 0 und PND 21) präpariert.

**Tab. 9:** Zeitpunkt der Präparation zur Messung der inneren PCB-Belastung und der Hormonkonzentration.

PND 0	PND 21	PND 310
Innere PCB Belastung Muttertiere und Fötus, n = 3	Innere PCB Belastung Muttertiere und F1-Nachkommen , n= 3	
Hormonmessung Muttertiere, n = 3	Hormonmessung Muttertiere (n = 8) und weibliche Nachkommen, n= 4-8	Hormonmessung männliche Nachkommen, n= 8

### 3.4 PCB Bestimmung

Die Organproben (Gehirn und Fettgewebe) für die Bestimmung der PCB-Konzentrationen wurden nach dem Auftauen in einem Potter homogenisiert (800-1000 Umdrehungen, Braun, Melsungen). Der Potter mit den Gewebeproben wurde während des Homogenisierens in Eiswasser gekühlt. Alle verwendeten Geräte wurden vorher je dreimal mit Hexan, Aceton und Milli Q Reinstwasser gespült und wenn sie hitzestabil waren, vier Stunden bei 200°C ausgeheizt, um mögliche PCB-Hintergrundkontamination zu entfernen. Die Bestimmung der PCB-Organkonzentration mittels GC/ECD wurde anschließend von der Abteilung Analytische Chemie von Annemarie Fastabend durchgeführt (Fastabend, 2000).

Zunächst wurden die Gewebeproben wie folgt für die Gaschromatographie vorbereitet:

#### 1. Flüssig/ Flüssigextraktion und Festphasenextraktion

Im Reagenzglas wurden 100 mg Probenmaterial eingewogen und mit 2 ml Ameisensäure versetzt. Die Gewebeproben wurden zum Homogenisieren und Denaturieren eine Stunde im Rock and Roll-Schüttler geschüttelt. Für die anschließende Lösungsmittelextraktion wurde 1 ml n-Heptan zugegeben. Das Extraktionsgemisch wurde nach einer Stunde für eine Minute gevortext und 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert. 750 µl der organischen Phase wurden auf einer Kieselsäule mit 10 ml Petrolether als mobile Phase eluiert. Das Eluat wurde mit 1 ml n-Decan („Keeper“) versetzt. Zum Lösungsmittelaustausch wurde das Eluat im Vortex-Evaporator bei 45°C und 100 mbar auf 1 ml eingengt.

#### 2. Gaschromatographie (GC) mit Elektroneneinfangdetektor (ECD)

Die Konzentration der 14 PCB-Kongenere aus dem verabreichten PCB-Gemisch wurde über die Gaschromatographie gemessen (GC-ECD-System, HRGC Mega 2, Fisons, Mainz). Zur Reduktion von Co-Elutionen wurde in 2 parallel geschalteten Säulen mit unterschiedlicher Polarität chromatographiert (DB5, 30 m \* 0,32 mm \* Filmdicke: 0,25 µm und DB 1701, 30 m \* 0,32 mm \* Filmdicke: 0,25 µm, J. & W. Scientific, USA). Das Injektionsvolumen betrug 1 µl. Die Nachweisgrenzen der PCB aus dem Gehirn lag bei 0,005 - 0,01 mg/kg Gehirn (PND 0 und PND 21). Die Nachweisgrenzen für die Proben aus dem Fettgewebe lagen bei 0,05 - 0,1 mg/kg Fettgewebe für den Meßzeitpunkt PND 0 und 0,13 - 0,25 mg/kg Fettgewebe zum Zeitpunkt PND 21.

### **3.5 Verhaltensversuche**

Alle Verhaltensversuche wurden mit den Nachkommen (F1-Generation) der mit PCB belasteten Mütter durchgeführt. Mit Ausnahme der Süßpräferenz, in der beide Geschlechter getestet wurden, wurden die Verhaltensversuche mit vorwiegend naiven männlichen Ratten durchgeführt, da die Östrogenzyklus-bedingten hormonellen Schwankungen der weiblichen Tiere die Variation des Verhaltens erhöhen und die Aktivität der Tiere beeinflussen können.

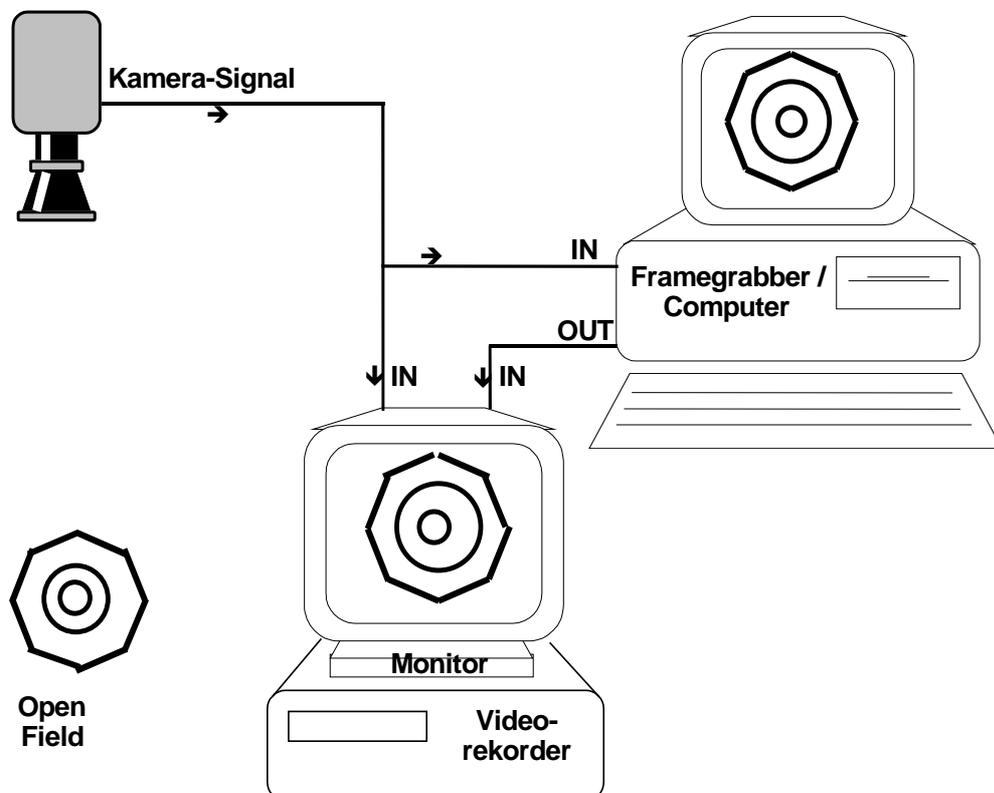
In den Verhaltensversuchen wurde pro Wurf jeweils nur ein Tier eingesetzt. Es wurden Tiere mit annähernd gleichem Körpergewicht ausgewählt.

Um circadiane Einflüsse zu reduzieren, wurden die nach Zufall ausgewählten Tiere im Laufe des Versuchstages in wechselnder Reihenfolge im Versuch getestet. Die Ratten wurden Nachmittags zwischen 14 und 18 Uhr in randomisierter Reihenfolge getestet, um Schwankungen in der Aktivität, bedingt durch den circadianen Rhythmus der Tiere, so gering wie möglich zu halten. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten und an die Hand gewöhnt (Ausnahme: „Open Field“). Es wurde pro Wurf nur ein Tier für einen Versuch

ausgewählt, um die genetische Variabilität zu berücksichtigen. Zusätzlich wurde darauf geachtet, möglichst Tiere mit vergleichbarem Körpergewicht für einen Verhaltensversuch zusammen zu stellen. Tiere mit einer sichtbaren körperlichen Beeinträchtigung wurden nicht eingesetzt. Die Altersangaben in PND (postnataler Tag) beziehen sich auf die F1-Generation. Sie werden aus Gründen der Vereinheitlichung auch für die Zeitangaben der Muttertiere verwendet.

**Tab. 14:** Zeitplan für die Verhaltensversuche.

Alter	Verhaltensversuch
PND 30	„Open Field“ mit Jungtieren
PND 100	„Open Field“ mit adulten Tieren
PND 110	Süßpräferenz
PND 140	Konditionierte Ultraschall-Vokalisation
PND 160	Konditionierte Platzpräferenz, (CPP)
PND 210	„Step-Down“, Passive Vermeidung
PND 300	Katalepsie mit Haloperidol



**Abb. 7:** Apparaturanordnung für die digitale Bildverarbeitung. Verschaltung von Videokamera, Videorekorder und Personalcomputer mit Framegrabber.

### 3.5.1 „Open Field“

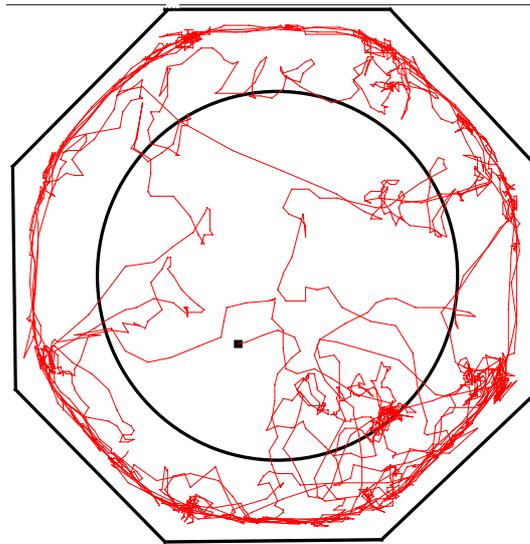
Das “Open Field” ist eine gängige Untersuchungsmethode, mit der sich die generelle lokomotorische Aktivität, das Explorationsverhalten und das emotionale Verhalten von Ratten untersuchen läßt (Denenberg, 1969, Walsch 1976).

Das „Open Field“ ist eine hell erleuchtete oktagonale Box aus weißem Kunststoff. Das Feld wurde aus 1 Meter Höhe von einer 60 Watt Neonröhre gleichmäßig erleuchtet. Die Versuchsanordnung für die Jungtiere (PND 30) hatte einen Durchmesser von 35 cm und die Apparatur für die adulten Tiere (PND 100) einen Durchmesser von 75 cm.

Die Tiere wurden für eine Versuchsdauer von 9 Minuten in die Apparatur gesetzt, die auf dem Boden mit einer Markierung zur Einteilung in eine innere zentrale Zone und eine äußere wandnahe Zone versehen war. Die lokomotorische Aktivität der Tiere (zurückgelegte Strecke) wurde in 3 Minuten Intervallen analysiert. Aufgezeichnet wurden die Versuche mit einem Video-Image-System. Die Apparaturanordnung für die digitale Bildverarbeitung ist in Abbildung 7 wiedergegeben. Die Bewegungen der Tiere wurden mit einer über dem Feld hängenden Videokamera (Panasonic BP 110) auf einem Videorekorder (Panasonic NV-FS88 HQ) aufgezeichnet. Das Kamera-Signal wurde parallel in einen Personalcomputer (Dell 466V) mit Framegrabber überspielt. Das analoge Signal aus der Kamera wurde mit einem Computerprogramm (Noldus Ethovision®, Wageningen, Niederlande) in ein digitales Signal umgewandelt. Das lokomotorische Verhalten der Ratte in der Gesamtarena und den definierten Zonen wurde auf dem Computermonitor als Liniengrafik dargestellt (siehe Abb. 8). Verhaltensparameter wie zurückgelegte Strecke der Tiere und die Aufenthaltsdauer in den einzelnen Zonen wurden mit den gespeicherten Daten im Ethovision Computerprogramm analysiert.

Die lokomotorische Aktivität der Ratten (zurückgelegte Strecke während des Versuches) wurde als Gesamtaktivität ermittelt. Die hell erleuchtete Box stellte für die Tiere einen aversiven Reiz dar, so daß der lokomotorischen Aktivität mehr eine emotionale Reaktion als eine Grundaktivität der Tiere zugrunde lag. Das Angstverhalten der Tiere äußert sich in der Aufenthaltsdauer in der äußeren Zone des “open field” und in der Anzahl der Boli.

Als weiterer Parameter für das Explorationsverhalten wurde das Aufrichten der Tiere auf die Hinterpfoten gezählt. Das Aufrichten der Tiere auf die Hinterpfoten ist ein typisches Erkundungsverhalten der Ratten in einer neuartigen Umgebung.



**Abb. 8:** Die Apparatur des Open Field als digitalisierte Monitorabbildung mit eingezeichnetem Weg, den die Ratte während des Versuches zurückgelegt hat. Unterteilung des Areal in eine zentrale innere Zone und eine äußere Zone entlang der Wand der Arena.

### 3.5.2 „Step Down“, Passive Vermeidung

Die Passive Vermeidung beruht darauf, daß ein Verhalten, das zu einer unangenehmen Erfahrung geführt hat, zukünftig vermieden wird. Bei diesem Versuch sollte die Ratte lernen, einen elektrischen Fußschock durch passives Verhalten zu vermeiden. Das Verhalten in dieser Versuchsanordnung wird zum einen bestimmt durch kognitive, emotionale und sensorische (Schmerzempfinden) Verhaltenskomponenten und zum anderen durch die Fähigkeit zur Verhaltensinhibition.

Jedes Tier wurde einen Tag vor Versuchsbeginn zur Gewöhnung an die Versuchsbedingungen für 2 Minuten in die Apparatur gesetzt. Die Versuchsapparatur bestand aus einem quadratischen, dunkelgrauen Kunststoffkasten (Seitenlänge: 48,5 cm, Höhe: 35 cm) mit einem Metallgitterboden. Die Ausgangsposition für die Tiere war eine runde Kunststoffplatte 4,5 cm ( $\varnothing$  14 cm) über dem Gitterboden. Der Metallgitterboden konnte über einen Generator (animal test cage grid floor shocker, Coulborn Instruments) für eine Sekunde mit 1 mA unter Strom gesetzt werden. Eine Plastikröhre wurde auf die Plattform gestülpt. Die Ratte wurde durch die Röhre hindurch auf der Plattform positioniert. Die Röhre wurde nach 5 Sekunden entfernt, so daß die Ratte sich frei bewegen und auf den Gitterboden hinunterlaufen konnte. Nach vollständigem Betreten des Gitterbodens mit allen vier Pfoten wurde für eine Sekunde ein Stromreiz von 1 mA appliziert. Die maximale Verweildauer auf der Plattform betrug 3 Minuten. Das Tier wurde nach

Betreten des Gitterbodens wieder auf die Plattform gesetzt. Beim dritten Mal wurde die Verweildauer des Tieres auf der Plattform gemessen (0-Wert = Start).

Die Latenz bis zum Verlassen der Plattform wurde nach 5 Minuten, 4 Stunden und 24 Stunden erneut gemessen. Stromreize wurden nicht mehr appliziert. Durch das Wiederholen der Aufgabe zu verschiedenen Zeitpunkten wurde u.a. die Gedächtnisleistung der Ratte überprüft, den Gitterboden mit dem Fußschock zu assoziieren.

### **3.5.3 Konditionierte Ultraschall-Vokalisation**

Mit der konditionierten Ultraschall-Vokalisation an PND 140 sollte untersucht werden, ob generell emotionale Komponenten des Verhaltens empfindlich auf PCB-Belastung ansprechen. Die Ratten geben Laute im menschlichen Hörbereich und im Ultraschallbereich von sich. Die Vokalisationen wurden mittels eines Fledermausdetektors (25 kHz) auf DAT-Kassetten aufgenommen und gezählt. Aufgezeichnet wurden „long calls“, deren Frequenz zwischen 20 und 30 kHz liegt. Diese „long calls“ geben Ratten bei Erregungszuständen von sich. Diese können sowohl von unangenehmen Reizen (Strom) wie auch von angenehmen Reizen (Paarung) ausgelöst werden.

Bei der konditionierten Vokalisation wurde in der Shuttlebox an zwei aufeinanderfolgenden Tagen ein Signalton gepaart mit einem Stromreiz gegeben (Schocksequenz: 4 sec 1mA gescrambelt, unvermeidbar + 10 sec Pause). Der Signalton wurde für 5 Sekunden mit 4 kHz und 70 dB kurz vor dem Stromreiz angeboten. Am dritten Tag wurde nur der Ton angeboten und anschließend die Vokalisation für 5 Minuten gemessen.

Versuchsaufbau:

- 1.Tag: 5 Schocksequenzen, anschließend Messung der Vokalisation für 5 min
- 2.Tag: 1x Schocksequenz, anschließend Messung der Vokalisation für 5 min
- 3.Tag: ohne Schocksequenz, nur Messung der Vokalisation für 5 min
- 10.Tag: ohne Schocksequenz, nur Messung der Vokalisation für 5 min

### 3.5.4 Katalepsie

Dieser Test ist in der Verhaltenspharmakologie zur Prüfung der Wirkung von klassischen und atypischen Neuroleptika auf die extrapyramidale Motorik etabliert. In diesem Versuch wurde die Funktion der Basalganglien nach Injektion von Haloperidol untersucht (Haloperidol-ratiopharm<sup>®</sup>, Injektionslösung). Haloperidol ist ein D<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist und blockiert als Neuroleptikum, striatopallidale Neurone durch Blockade von Dopamin (D<sub>2</sub>)-Rezeptoren (Schwarz et al., 1992). Hierdurch wird über eine Reihe von Zwischenschritten die Willkürmotorik gehemmt. Es resultiert eine Bewegungsarmut mit starrem Verharren in einer Position. Abweichungen in der Dauer des kataleptischen Zustandes (Bewegungsstarre) weisen auf Veränderungen v.a. der dopaminergen Prozesse hin, wobei auch serotonerge, glutamaterge und adrenerge Prozesse beteiligt sind.

In dem Katalepsie-Test wurden pro Gruppe 10 adulte männliche Tiere eingesetzt (PND 300). Haloperidol wurde in einer Dosierung von 0,25 mg Haloperidol pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Injektionslösung wurde durch Verdünnen der Ausgangslösung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Die Dauer des katatonischen Zustandes wurde 30 und 60 Minuten nach der Injektion überprüft, nachdem die Tiere passiv in eine Position gebracht worden waren.

Zur Quantifizierung der Katalepsie wurden die Ratte in 3 ungewöhnliche Positionen gebracht:

- 1.) aufrecht stehend mit beiden Vorderpfoten auf einer horizontalen Stange (Höhe 10 cm),
- 2.) an einem vertikalen Maschengitter hängend (Höhe 37 cm, Breite 23 cm)
- 3.) auf dem Bauch liegend mit beiden Vorder- und Hinterpfoten in einem Lochbrett.

Gemessen wurde die Zeit bis zum aktiven Bewegungsbeginn der Ratte bzw. bis zur Rückkehr in die normale Haltung. In der dritten Position wurde die Zeit gemessen, bis die Ratte eine Pfote aus dem Lochbrett herauszog und auf das Brett aufstellte. Die maximale Versuchsdauer für die jeweilige Position war auf drei Minuten beschränkt.

## 3.6 Geschlechtsspezifische Verhaltensversuche

### 3.6.1 Süßpräferenz

Im Alter von PND 110 wurden die Ratten in der Süßpräferenz auf geschlechtstypisches Verhalten untersucht. Die Präferenz weiblicher Ratten für Trinkwasser mit Saccharin wurde ursprünglich von Valenstein und Shapiro beobachtet (Shapiro et al., 1973, Valenstein et al., 1967).

Die Süßpräferenz ist eine sexuell dimorphe Verhaltensweise, weil weibliche Ratten bei freier Wahl zwischen einer süß schmeckenden Lösung und Leitungswasser größere Mengen der süß schmeckenden Lösung konsumieren als männliche Ratten (Lichtensteiger et al., 1985).

Im Versuch wurden pro Gruppe 10 weibliche und 10 männliche Tiere (80 Tiere) getestet, die eine Woche vor Versuchsbeginn in Einzelkäfige (Typ III) gesetzt wurden. Zunächst wurde für zwei Tage der basale Wasserverbrauch gemessen. Zur Gewöhnung an die Versuchsbedingungen erhielten die Tiere zwei Flaschen mit Leitungswasser. Während der gesamten Versuchszeit wurde das Futter ad libitum zur Verfügung gestellt. Zur Gewichtskontrolle wurden die Tiere vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende am 7. Tag gewogen.

Die Ratten bekamen je eine abgewogene Flasche Leitungswasser ( $\approx 300\text{ml}/\text{Flasche}$ ) und eine Flasche mit 0,25%-iger Saccharinlösung (m/v, o-Benzoesäuresulfimid-Natriumsalz-Hydrat; Fluka) zur Auswahl. Der einen Hälfte der Tiere in einer Gruppe wurde die Flasche mit der Saccharinlösung auf der rechten Seite des Käfigs und die Flasche mit dem Leitungswasser auf der linken Seite angeboten. Die andere Hälfte der Tiere in einer Gruppe erhielt die Flaschen in umgekehrter Anordnung. Die Flaschenposition wurde täglich nach dem Auswiegen gewechselt, um mögliche Präferenzen für eine bestimmte Flaschenposition auszuschließen. Das Futter stand während der gesamten Versuchsdauer ad libitum zur Verfügung.

Der Flüssigkeitsverbrauch wurde über 5 Tage täglich gegen 13 Uhr bestimmt. Nach dem Auswiegen wurden die Flaschen mit frischem Leitungswasser oder Saccharinlösung neu aufgefüllt.

### **3.6.2 Konditionierte Platzpräferenz**

Die konditionierte Platzpräferenz wurde an PND 160 in einer rechteckigen Box (40 cm lang, 90 cm breit) durchgeführt, die in zwei Abschnitte untergliedert war. Die Wände der beiden Abschnitte waren horizontal oder vertikal schwarz/weiß gestreift. Die Box konnte durch Einsetzen einer Trennwand in zwei gleichgroße separate Räume und einen kleineren mittleren Raum unterteilt werden. Der mittlere Raum war neutral graufarbig. Der Versuch dauerte 10 Tage. Am Tag vor der Konditionierung konnte sich die Ratte für 20 Minuten in der gesamten Box frei bewegen. Gemessen wurde die Aufenthaltsdauer und der zurückgelegte Weg in den einzelnen Abschnitten der Box.

In den folgenden acht Konditionierungstagen wurde jedem Tier randomisiert einer der Räume, vertikal oder horizontal gestreift als Testosteron-gepaarte Seite zugeteilt (gepaarte Raum). Das Tier bekam 15 Minuten vor Versuchsbeginn Testosteron intraperitoneal gespritzt ( $70 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ ;

70 µg in 500 µl), bevor es in den gepaarten Raum gesetzt wurde (Alexander et al., 1994). Das Tier wurde 30 Minuten in dem Raum belassen. Am folgenden Tag wurde das Vehikel (5% HBC) gespritzt und das Tier in den ungepaarten Raum gesetzt. Insgesamt bekam jede Ratte während der 8 Konditionierungstage alternierend 4 mal Testosteron und 4 mal das Vehikel injiziert.

Am Testtag wurde weder Testosteron noch das Vehikel injiziert und die Ratte konnte sich wieder für 30 Minuten in der gesamten Box frei bewegen. Das Testosteron (Sigma, Deisenhofen) wurde mit dem Lösungsvermittler HBC (2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin, H-107; RBI, MA, USA) in Lösung gebracht.

Bestimmt wurde die Aufenthaltsdauer und die zurückgelegte Strecke auf jeder der beiden Seiten, d.h. auf der vorher mit Testosteron gepaarten Seite, auf der die Ratte zuvor das Testosteron bekommen hatte, und auf der Vehikel-Seite.

### 3.7 Hormonmessung

Zu bestimmten Zeitpunkten wurde der Serum-Hormongehalt der Muttertiere und der Nachkommen gemessen. Am postnatalen Tag, PND 0 und am Ende der Stillzeit (PND21) wurden Muttertiere für die Hormonmessungen präpariert (Tab. 10). Weibliche Nachkommen wurden an PND 21 präpariert. Im adulten Stadium (PND 310) wurden nur männliche Nachkommen präpariert. Der Östrus-Zyklus der weiblichen Tiere (4 bis 5 Tage) macht eine Hormonmessung schwierig, da der Hormonhaushalt größeren zyklusbedingten Schwankungen unterliegt.

Für die Konzentrationsbestimmung von Sexualhormonen im Serum wurde das Blut aus der rechten Herzkammer punktiert. Das Blut wurde 2 mal 15 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415). Das gewonnene Serum wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt. Die Sexualsteroid Testosteron und 17-β Östradiol wurden mit kommerziellen Steroidassays (ELISA-Kit, DRG, Marburg) bestimmt. Hany etablierte eine Methode zur Bestimmung der Hormonkonzentration aus Rattenserum (Hany et al., 1999). Die Steroidhormon-Struktur weist keine speziesspezifischen Unterschiede auf, so daß aus dieser Sicht Steroidassays verwendet werden konnten, die für Humanproben konzipiert worden waren. Zwei Gründe machten es dennoch notwendig, die Hormonmessung mit ELISA-Kits für Rattenserum zu validieren.

1. Der Hormongehalt im Rattenserum liegt weit unterhalb der physiologischen Normwerte von menschlichen Serumproben, für die die ELISA-Kits konzipiert und optimiert wurden. Die Hormone müssen somit vor der Messung zunächst extrahiert und angereichert werden.
2. Die hormonbindenden Proteine im Blut von Ratte und Mensch unterscheiden sich speziestypisch. Der überwiegende Anteil der Steroide (Östradiol zu 97%) ist im Blut an

Albumine oder Globuline (CBG = Cortisol Binding Globuline, SHBG = Sex-Hormone Binding Globuline, ABP = Androgen Binding Protein) gebunden (Markin et al., 1995). Die Hormon-Proteinbindung muß somit vor der Hormonmessung aufgehoben werden, damit die speziestypische Proteinmatrix aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaffinität zu den Hormonen nicht zu falschen Ergebnissen führt. Die nach dem Extraktionsverfahren angereicherten Hormone wurden in Steroid-freiem Humanserum (Nullserum) aufgenommen und konnten wie unter Kapitel „Testdurchführung“ beschrieben im Enzymimmunoassay eingesetzt werden.

**Tab. 10:** Zeitpunkte für die Hormonmessung der Muttertiere und der Nachkommen.

Zeitpunkt	Muttertiere	Weibliche Nachkommen	Männliche Nachkommen
PND 0	Testosteron Östradiol		
PND 21	Testosteron Östradiol	Testosteron Östradiol	
PND 310			Testosteron

### 3.7.1 Enzymgekoppelter Immunnachweis

Der enzymgekoppelter Immunnachweis (ELISA, enzyme-linked immunosorbant assay) beruht auf folgenden Prinzipien:

1. Der Antikörper (anti-Östradiol-Antikörper) gegen das gesuchte Steroid (17- $\beta$  Östadiol) ist auf einer polymeren Matrix (inerte Festphase: Polystyrol) verankert.
2. Die Lösung (Serumprobe), die auf das gewünschte Protein (anti-Östradiol-Antikörper) hin untersucht werden soll, wird auf die mit Antikörpern besetzte Fläche (Mikrotiterplatte) aufgetragen, so daß der immobilisierte Antikörper (anti-Östradiol-Antikörper) das Steroid (17- $\beta$  Östradiol) binden kann.
3. Der entstandene Antikörper-Protein-Komplex wird mit einem zweiten proteinspezifischen Antikörper (Östradiol) inkubiert. Dieser Zweitantikörper ist mit einem leicht nachweisbaren Enzym (Meerretich Peroxidase gebunden, HRP) kovalent verknüpft (Antikörper-Enzym-Konjugat). Das Enzym kann mit großer Geschwindigkeit ein zugegebenes farbloses Substrat zu einem farbigen Produkt umwandeln und kann daher mit hoher Empfindlichkeit photometrisch nachgewiesen werden. Weniger als ein Nanogramm ( $10^{-9}$ g) eines Proteins kann mit einem solchen enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA), bestimmt werden.

4. Der überschüssige, nicht gebundene Zweitantikörper (Östradiol, kovalent mit Meeretich peroxidase gebunden, HRP) wird durch wiederholtes waschen entfernt. Dann wird das Enzym des fixierten Antikörper-Protein-Antikörper-Enzym-Komplexes nachgewiesen, woraus die Menge des gebundenen Proteins berechnet werden kann.

Die an die Platte gebundene Menge des Antikörpers (Anti-Östradiol Antikörper) ist der des Antigens in der Probe (17- $\beta$  Östradiol) proportional.

- Testprinzip ELISA:
1. Bindung des ersten Antikörpers an die Matrix.(Mikrotiterstrips beschichtet mit Kaninchen anti-Östradiol-Antikörpern).
  2. Zugabe der proteinhaltigen Probe und Inkubation (Rattenserum mit Hormonen).
  3. Zugabe eines zweiten Antikörpers, der kovalent mit einem Detektionsenzym verknüpft ist (z.B. Östradiol, kovalent mit Meeretich peroxidase gebunden, HRP).
  4. Waschen und Nachweis des Enzyms.

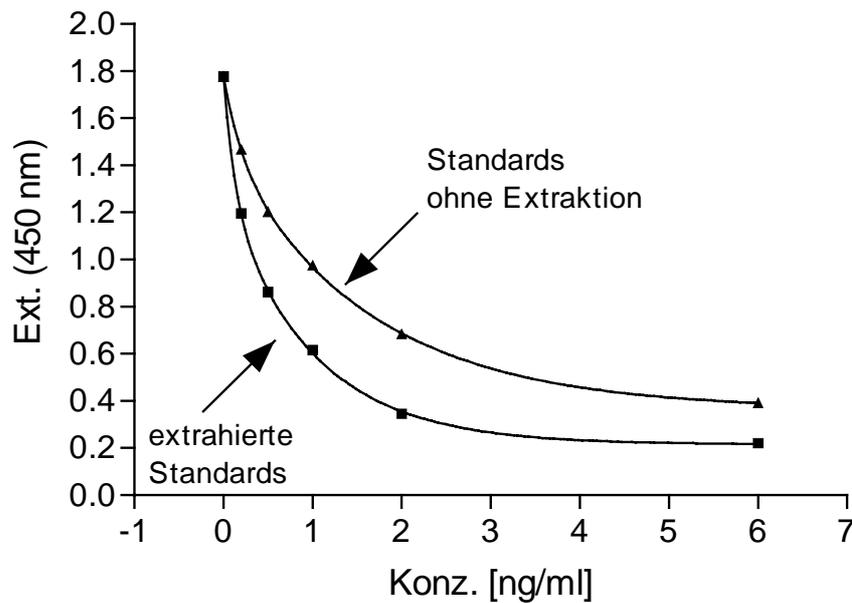
### **3.7.2 Extraktions-/Anreicherungsverfahren für die Östradiol/Testosteron-Bestimmung aus Rattenserum**

1. 230  $\mu$ l Serum mit 1 ml Diethylether 15 min schütteln
2. Bei höchster Stufe 20 sec vortexen
3. Zur Trennung der Phasen 5 min bei 3800 rpm zentrifugieren
4. Teströhrchen 20 min einfrieren, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  anschließend Ether-Überstand dekantieren  
Die Etherextraktion in Schritt 1. bis 4. wurde mit dem verbleibenden Serum wiederholt, um die Hormon-Proteinbindungen zu zerstören.
5. Etherextrakt auf 100  $\mu$ l eindampfen und Gefäßwand mit 150  $\mu$ l spülen
6. An den Gefäßwänden adsorbierte Partikel wurden durch kurzes Vortexen und einem 10-minütigen Ultraschallbad wieder in Lösung gebracht.
7. Das Extrakt auf etwa 20  $\mu$ l eindampfen
8. Wiederaufnahme des Extraktes in 75 $\mu$ l steroidfreiem Humanserum (Nullserum).  
Der Anreicherungsfaktor beträgt somit 3,07.
9. Kurz vortexen und 3 min zentrifugieren bei 3800 rpm
10. Restlichen Ether von der Probe abdampfen lassen
11. 12 min Ultraschallbad und 3 min zentrifugieren bei 3800 rpm
12. Messung der Hormonkonzentration im ELISA, wie unter „Testdurchführung beschrieben

### 3.7.3 Berechnung der Extraktionseffizienz beim ELISA

Die Extraktionseffizienz wurde berechnet, um ein Maß für die Güte der Probenvorbereitung zu erhalten. Die im ELISA-Kit mitgelieferten Standards wurden hierzu wie unter Extraktions- und Anreicherungsverfahren (Kapitel 3.7.2) beschrieben extrahiert. Diese extrahierten Standards wurden parallel zu den nicht extrahierten Originalstandards gemessen. Im Idealfall stimmten die beiden Nullwerte wie in Abbildung 6 (extrahierte und nicht extrahierte Originalstandardreihe) überein. Die extrahierten Eichwerte konnten in diesem Fall von der nicht-extrahierten Eichkurve abgelesen werden. Die eingesetzte Konzentration jedes Eichpunktes wurde mit dem Anreicherungsfaktor multipliziert. Daraus ergaben sich die Erwartungswerte. Die Extraktionseffizienz wurde ausgedrückt als die an der Kurve abgelesene Konzentration (Meßwert) in Prozent vom Erwartungswert. Im Fall einer Abweichung der beiden Nullwerte der Standardreihen wurde die nach Extraktion ermittelte Hormonkonzentration, entsprechend dem Anreicherungsfaktor, als Hintergrundkonzentration von den Proben subtrahiert.

Das Hormon aus dem Standard konkurriert mit dem Hormon-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf der Festphase. Somit ist die Menge an gebundenem Enzymkonjugat umgekehrt proportional zur Hormon-Konzentration der Probe. Mit zunehmender Hormonkonzentration in der Probe können weniger Enzymkonjugate an die Bindungsstellen der Festphase binden, wodurch die anschließende Farbreaktion geringer ausfällt. Daher fallen die Standardkurven mit zunehmender Hormon-Konzentration in den Standards ab (Abb.6).



**Abb. 6:** Berechnung der Extraktionseffizienz beim Testosteron/17- $\beta$ -Östadiol-ELISA. Vergleich der Standardkurven bei einer Serum-Testosteronbestimmung. Obere Kurve: Direkte Messung der Testosteron-Standards aus dem ELISA-Kit. Untere Kurve: Testosteron-Standards aus dem ELISA-Kit nach Extraktion und Anreicherung.

### 3.7.4 Bestimmung der Serumhormon-Konzentration im ELISA: Testdurchführung

Die Sensitivität der ELISA Methode war mit einer Nachweisgrenze von 16 pg/ml für Östradiol und (58,7 pmol/L) und 0,1 ng/ml für Testosteron (0,35 nmol/L) angegeben.

Die Messung der Hormonkonzentration erfolgte entsprechend dem Pipetierschema in Tabelle 13 für 17- $\beta$  Östrogen bzw. Tabelle 12 für Testosteron. Auf einer 96 Well-Mikrotiterplatte wurden 28 Rattenserumproben, 4 Wiederfundproben und die Standardreihen bestimmt. Die eingesetzten Konzentrationen der Standardreihe und der Wiederfundproben sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Die beiden niedrigsten Standardkonzentrationen wurden aus den gelieferten Standardkonzentrationen des Kits durch Verdünnung hergestellt. Zur Konzentrationsbestimmung in den Proben wurden die Proben-Meßwerte an der extrahierten Eichkurve abgelesen. Mit Hilfe des PC-Programms GraphPad Prism V2.00 (GraphPad Software Incorporated) wurden die Probenmeßwerte automatisch an der Standardkurve extrapoliert und ergaben die entsprechende Hormonkonzentration.

**Tab. 11:** Konzentration der Standardreihe und der Wiederfundproben in pg/ml

Eingesetzte Standardreihe		Konzentration der Wiederfundproben	
Testosteron	Östradiol	Testosteron	Östradiol
0	0	100	10
100	10	210	50
200	25	560	100
500	100	1120	
1000	250		
2000	500		

**Tab. 12:** Pipettierschema für Testosteron-ELISA. RT = Raumtemperatur, HRP = horse-radish peroxidase-Konjugat

Proben-Bezeichnung	Probenmenge	Schritt 1	Enzym-Konjugat	Schritt 2	Substrat-Lösung	Schritt 3	Stopp-Lösung	Schritt 4
Original-Standardreihe	25 µl	5 min. bei RT inkubieren	200 µl	10 sec. schütteln, 60 min. bei RT inkubieren, Wells 3* mit verdünnter Waschlösung waschen (400 µl/ Well), dekantieren, Wells umgedreht auf saugfähigem Papier fest abklopfen	200 µl	15 min. bei RT inkubieren	100 µl	Innerhalb von 30 min. Extinktion bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmen
extrahierte Standardreihe	25 µl		200 µl		200 µl		100 µl	
28 Ratten-Serumproben	25 µl		200 µl		200 µl		100 µl	
4 Wiederfundproben	25 µl		200 µl		200 µl		100 µl	

Bestandteile des Kits: Mikrotiterwells (12\*8 Wells), beschichtet mit Kaninchen Anti-Testosteron Antikörpern

Nullstandard (0 ng/ml Testosteron)

Testosteron Serum-Standard (0,2; 0,5; 1; 2; 6 und 16 ng/ml)

HRP-Testosteron Konjugat (Testosteron konjugiert mit Meeretich peroxidase (HRP) in Pufferlösung)

Waschlösung (20-fach konzentriert). Vor dem Gebrauch mit reinem Aqua dest. verdünnt

Substratlösung (TMB) - HS

Stopplösung, 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Tab. 13:** Pipettierschema für 17- $\beta$  Östradiol-ELISA. RT = Raumtemperatur, HRP = horse-radish peroxidase-Konjugat

Proben-Bezeichnung	Probenmenge	Enzym-Konjugat	Schritt 1	Substrat-Lösung	Schritt 2	Stopp-Lösung	Schritt 3
Original-standardreihe	25 $\mu$ l	200 $\mu$ l	10 sec. schütteln,	100 $\mu$ l	15 min. bei RT inkubieren	100 $\mu$ l	Innerhalb von 30 min. Extinktion bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmen
extrahierte Standardreihe	25 $\mu$ l	200 $\mu$ l	120 min. bei 37°C inkubieren,	100 $\mu$ l		100 $\mu$ l	
28 Ratten-serumproben	25 $\mu$ l	200 $\mu$ l	Wells 3* mit verdünnter Waschlösung waschen	100 $\mu$ l		100 $\mu$ l	
4 Wiederfundproben	25 $\mu$ l	200 $\mu$ l	(400 $\mu$ l/ Well), dekantieren, Wells umgedreht auf saugfähigem Papier fest abklopfen	100 $\mu$ l		100 $\mu$ l	

Bestandteile des Kits: Mikrotiterwells (12\*8 Wells), beschichtet mit Kaninchen Anti-Östradiol Antikörpern  
 Östradiol Serum-Standard (25, 100, 250, 500, 100, 2000 pg/ml)  
 HRP-Östradiol-Konjugat (Östradiol konjugiert mit Meeretichperoxidase (HRP) in Pufferlösung)  
 Waschlösung (10-fach konzentriert). Vor dem Gebrauch mit reinem Aqua dest. verdünnt  
 Substratlösung (TMB) - HS  
 Stopplösung, 0,3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 3.7.5 Sensitivität des ELISA

Die Sensitivität des ELISA war vom Hersteller mit einer Nachweisgrenze von 16 pg/ml (58,7 pmol/L) für Östradiol und die von Testosteron war mit 0,1 ng/ml (0,35 nmol/L) angegeben.

Die Hormone wurden im Extraktionsverfahren um den Faktor 3 angereichert. Die Bestimmungsgrenze des Assays konnte somit für Östradiol auf 5 pg/ml und für Testosteron auf 35 pg/ml gesenkt werden.

### 3.7.6 Spezifität des ELISA

Nach Angaben des Herstellers beträgt die Kreuzreaktivität der Östradiol ELISA-Kits für Östradiol 100%, die Kreuzreaktivität von Östron 2,1%, Östriol 1,5%, 17- $\alpha$  Östradiol 0,3% und mit anderen Steroiden < 0,01% (Cortisol, Cortison, Progesteron, Testosteron, DHEA-Sulfat und 5- $\alpha$  Dihydrotestosteron).

Die Kreuzreaktivität der Testosteron ELISA-Kits beträgt für Testosteron 100%. Die Kreuzreaktivität mit anderen Steroiden war mit 0,9% für Androstendion, Androsteron und DHT angegeben. Die Kreuzreaktivität mit 17- $\beta$  Östradiol, Östron, Östriol, Epitestosteron, 17-OH-Progesteron und Progesteron ist mit < 0,05% angegeben. Für Cortisol und DHEA-Sulfat ist eine Kreuzreaktivität von <0,005% angegeben.

Als eigene Qualitätskontrolle der Spezifität wurden im Assay Wiederfundproben mit definierter Hormonkonzentrationen gemessen. Die Wiederfundproben wurden aus gepooltem Rattenserum mit Hormondotierung hergestellt. Bei prozentual hohen Wiederfundraten der Proben mit definierter Hormonkonzentration konnte davon ausgegangen werden, daß auch die Messung der Proben mit unbekannter Hormonkonzentration präzise Ergebnisse lieferte.

### 3.7.7 Extraktionsgüte

Die Extraktionsgüte wurde berechnet, um ein Maß für die Qualität der Probenvorbereitung zu erhalten.

Im Idealfall lagen die beiden Nullwerte für die extrahierte und die nicht-extrahierte Standardkurve auf einem Punkt (siehe Abb. 6). In diesem Fall konnten die extrahierten Standardwerte an der nicht-extrahierten Standardkurve abgelesen werden. Im ungünstigen Fall wichen die beiden Nullwerte voneinander ab. In diesem Fall war der Nullwert bereits ab Werk mit einer geringen Menge Hormon kontaminiert, die erst nach der Extraktions- und Anreicherungsprozedur sichtbar wurde. Hier mußte zunächst die nach Extraktion ermittelte

Hormonkonzentration mit Berücksichtigung des Anreicherungsfaktors als Hintergrundkonzentration von der gemessenen Probe subtrahiert werden.

Im Verlauf der Extraktion wurden die Hormone aus 230 µl Serum in 75 µl Nullserum aufgenommen. Der Anreicherungsfaktor für die zu messenden Hormone betrug somit 3,07. Als Kontrolle dieser Anreicherungsprozedur wurden parallel zur Originalstandardreihe auch eine Standardreihe mit zuvor extrahierten Standards gemessen (z.B. 100 pg/ml Testosteron). Die tatsächlich gemessenen Werte eines extrahierten Standards konnten mit dem theoretischen Erwartungswert verglichen werden. Hierzu wurde der extrahierte Standardwert an der nicht-extrahierten Eichkurve (Standardkurve) abgelesen. Die Konzentrationen für den extrapolierten Standard mußten mit dem Anreicherungsfaktor von 3,07 multipliziert werden und ergaben den theoretischen Erwartungswert für die Extrapolation an der nicht-extrahierten Standardkurve (307 pg/ml Testosteron). Die Extraktionseffizienz für die Vollständigkeit der Extraktion dieser Probe ließ sich nun ausdrücken als an der Kurve abgelesene Konzentration des tatsächlichen Meßwertes (303 pg/ml Testosteron) in Prozent vom theoretisch festgelegten Erwartungswert (307 pg/ml Testosteron). Im vorliegenden Beispiel ( $303 * 100 / 307$ ) ergab sich die Extraktionseffizienz für die Vollständigkeit der Probe von 98,7%.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Entwicklungsdaten

Der Wurftermin der trächtigen Tiere war in allen Gruppen mit 22 Tagen zeitgerecht. Auch die Gewichtsentwicklung der trächtigen Weibchen verlief unauffällig und termingerecht. In der Kontrollgruppe und der RG20-Gruppe sind 17 weibliche Tiere trächtig geworden, was einer Wurfrate von 65% und damit dem Erwartungswert für diesen Rattenstamm entspricht. In der RG5-Gruppe und in der RG40-Gruppe haben je 20 weibliche Tiere Nachwuchs bekommen. Die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen pro Wurf und die Geschlechterverteilung ist in der Tabelle 15 wiedergegeben. Mit 10 Tieren pro Wurf war die durchschnittliche Nachkommenzahl in der Kontrollgruppe normal und entspricht nach den vorliegenden Erfahrungen dem stammspezifischen Durchschnitt. Die Anzahl der Nachkommen pro Wurf war durch die pränatale PCB-Belastung dosisabhängig signifikant verändert [ $F(1,70)=9.94$ ;  $p<0,005$ ]. Die höchste Belastungsgruppe zeigt mit durchschnittlich 8,5 Tieren pro Wurf eine signifikante reduzierte Wurfgröße [ $F(1,70)=10.79$ ;  $p<0,005$ ]. Die Kontrolltiere hatten insgesamt 174 Nachkommen, von denen 46 präpariert wurden und 22 gestorben sind. Die Sterberaten der Kontrolltiere in der Säugephase entsprach mit 17% den vorliegenden Erfahrungen der letzten Jahre. Die Sterberate der RG20-Gruppe und der RG40-Gruppe ist mit 44% bzw. 38% deutlich erhöht (Tab 15).

In der Abb.9A ist der lineare Dosiswirkungszusammenhang der Wurfgröße (Tiere/Wurf) in Abhängigkeit von der Belastungsgruppe dargestellt. Es besteht ein signifikanter linearer Dosis-Wirkungszusammenhang mit der Wurfgröße [ $F(1,70)=9,94$ ;  $p<0,005$ ]. In der höchsten Belastungsgruppe ist die durchschnittliche Nachkommenzahl pro Wurf mit 17% signifikant zur Kontrollgruppe reduziert [ $F(1,70)=10.79$ ;  $p<0,005$ ]. Im Gegensatz hierzu liegen keine Unterschiede in der Anzahl der Implantationsstellen zwischen den Gruppen vor.

Tab. 15: Entwicklungsdaten: Übersicht über die Überlebensrate der Nachkommen in der F1-Generation, n = 26 Muttertiere pro Gruppe.

Gruppe n = 26	Anzahl Nachkommen PND 0	Anzahl toter Tiere PND 21	Anzahl Nachkommen PND 21	% Überlebende PND 21
Kontrolle	174	22	107	83,5
RG05	203	19	136	87,7
RG20	160	55	69	55,6
RG40	170	50	81	61,8

Nach Angaben des Züchters liegt die durchschnittliche prozentuale Geschlechterverteilung bei 53% männlichen Tiere und 47% weiblichen Tieren. In der höchsten Belastungsgruppe war das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Tiere mit 45% zu 55% umgekehrt, aber blieb statistisch unterhalb der Signifikanzgrenze.

Tab. 16: Wurfgröße, Geschlechterverteilung und Gewicht der Tiere pro Wurf an PND 21 (MW $\pm$ SD), Implantationsstellen (MW $\pm$ SEM), % m:w = prozentuale Verteilung männliche zu weibliche Nachkommen.

Gruppe	Implantations- stellen	Wurfrate	Tiere pro Wurf	% m:w	Gewicht [g]
KO	9,0 $\pm$ 0,8	17 (65%)	10,2 $\pm$ 0,9	58:42	36.25 $\pm$ 2.88
RG5	9,3 $\pm$ 0,7	20 (77%)	10,1 $\pm$ 1,5	52:48	35.04 $\pm$ 4.83
RG20	8,3 $\pm$ 0,8	17 (65%)	9,4 $\pm$ 2,1	58:42	34.27 $\pm$ 4.40
RG40	10,0 $\pm$ 0,7	20(77%)	8,5 $\pm$ 2,2	45:55	32.88 $\pm$ 3.57

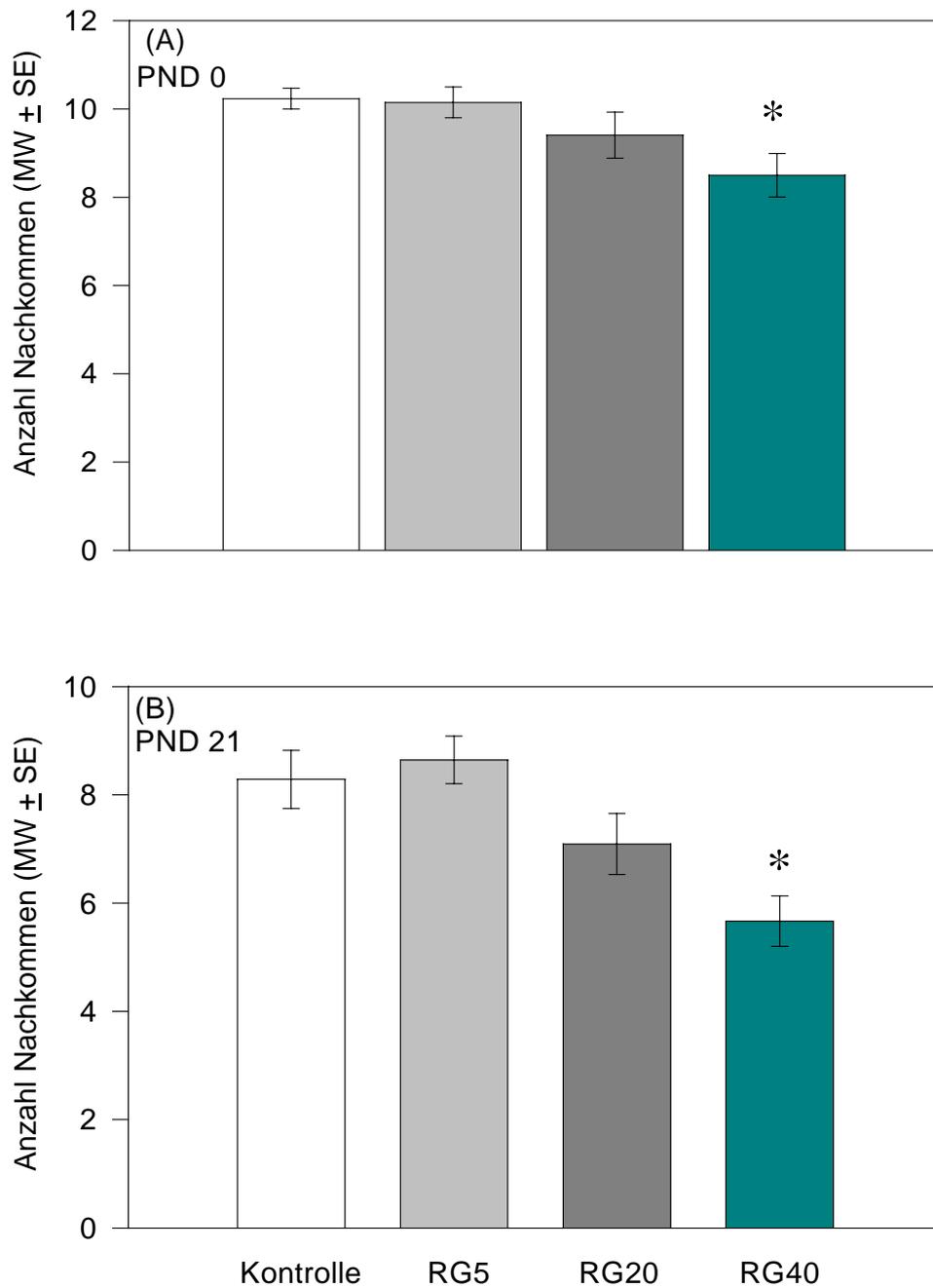


Abb.9: Anzahl der F1 Nachkommen pro Wurf (Mittelwerte  $\pm$  SE). Überlebende (A) zum Zeitpunkt der Geburt (PND 0) und (B) am Ende der Säugephase (PND 21). \* $p < 0.05$ .

## 4.2 Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung der Nachkommen zeigt einen signifikanten Dosis-Wirkungs-Zusammenhang. Die Gewichtsentwicklung der Nachkommen aus der Kontrollgruppe und der niedrigsten Belastungsgruppe (RG5-Gruppe) verlief termingerecht und war unauffällig. Dagegen war die Gewichtsentwicklung im Verlauf der Säugephase signifikant dosisabhängig verändert [ $F(1,68)=9.37$ ;  $p<0,005$ ]. Die Tiere aus den beiden höheren Belastungsgruppen blieben in ihrer Gewichtsentwicklung deutlich hinter den Kontrolltieren zurück (Tab.17). In den Gruppen RG20 und RG40 ist das Geburtsgewicht und das durchschnittliche Gewicht der Nachkommen an PND 5 zunächst unverändert zur Kontrollgruppe. Ab PND 10 zeigen die beiden höheren Belastungsgruppen eine Gewichtsreduktion. Die Gewichtsentwicklung der RG40-Gruppe ist in der Säugephase (PND0 bis PND21) signifikant gegenüber den Kontrolltieren reduziert [ $F(1,53) = 5.06$ ;  $p<0,05$ ]. Die durchschnittliche Gewichtsreduktion der RG40-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle entspricht den bisherigen Werten der maternal mit dem rekonstituierten PCB-Gemisch belasteten Nachkommen (40 mg/kg KG). Das individuelle Gewicht der Nachkommen aus der RG40-Gruppe ist zur Geburt unverändert gegenüber den Kontrollen. An allen späteren Messzeitpunkten sind die Körpergewichte der Nachkommen aus dieser Gruppe signifikant reduziert ( $p<0,05$ ). Die Körpergewichte der RG40-Gruppe sind um 16% niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Differenz bleibt bis PND 70 mit 12% Gewichtsreduktion bestehen. Die Gewichtsreduktion der RG20-Gruppe ist im Vergleich hierzu etwas schwächer ausgeprägt (Tab.17). Die Tiere aus der höchsten Belastungsgruppe zeigen größere Streuungen in der Gewichtsentwicklung bis ins adulte Stadium aufgrund einer ungleichen Gewichtsverteilung innerhalb eines Wurfes.

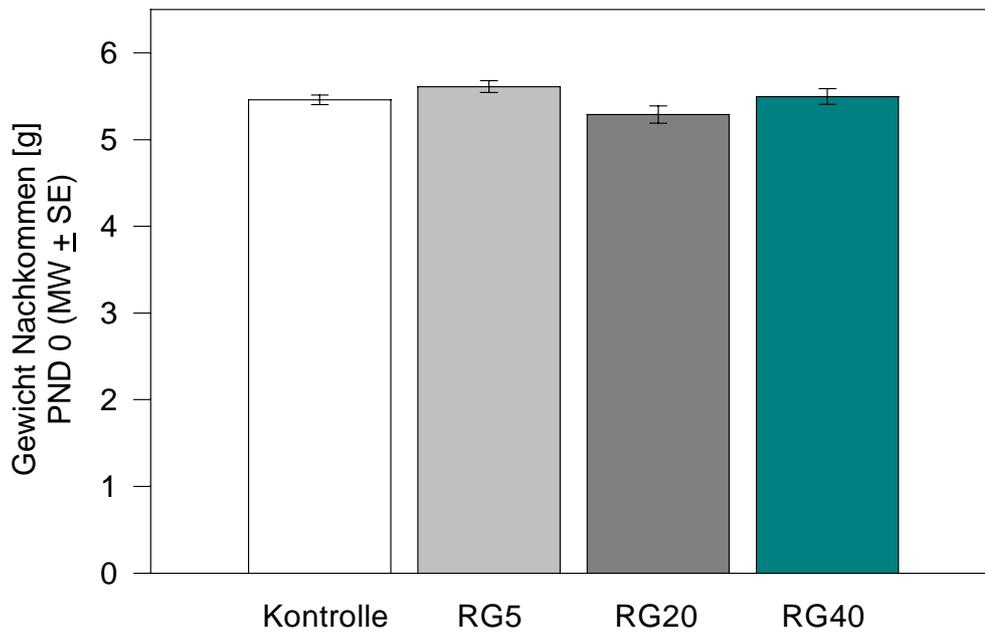


Abb.10: Körpergewicht der Nachkommen zum Zeitpunkt der Geburt (PND 0) (Mittelwerte  $\pm$  SE).

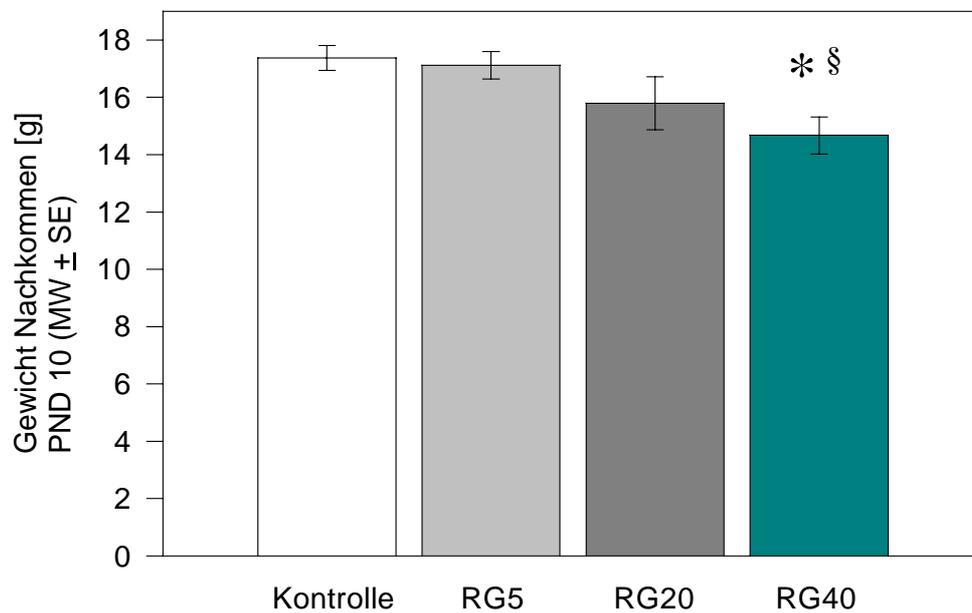


Abb.11: Körpergewicht der Nachkommen an PND 10 (Mittelwerte  $\pm$  SE),  
\* =  $p < 0,05$  vgl. Ko, § =  $p < 0,05$  vgl. RG5.

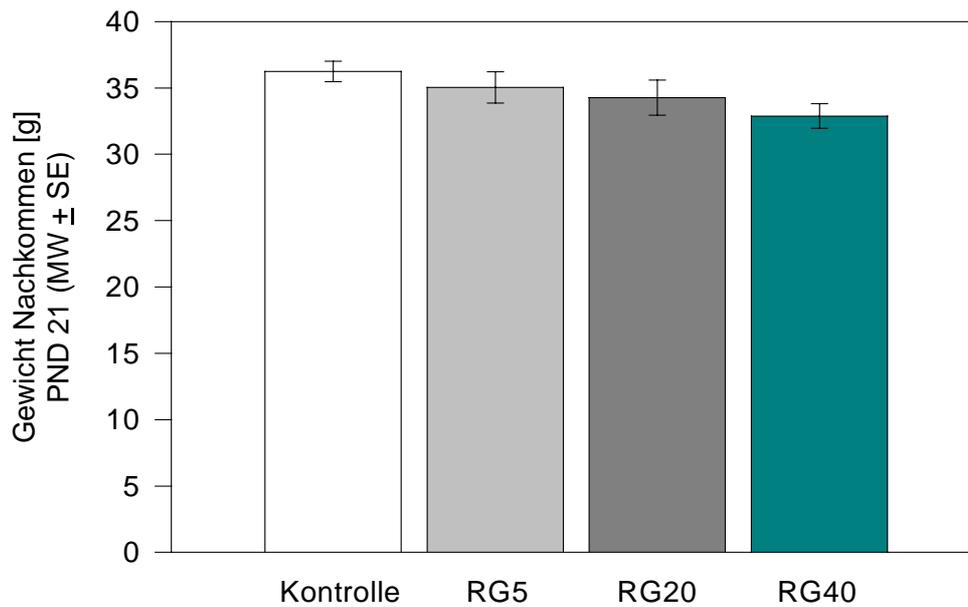


Abb.12: Körpergewicht der Nachkommen an PND 21 (Mittelwerte  $\pm$  SE).

Tab. 17: Gewichtsentwicklung der Nachkommen zu verschiedenen Wägezeitpunkten, (PND = postnataler Tag), MW  $\pm$  SD.  $\downarrow$  = prozentuale Reduktion im Vergleich zur Kontrolle.

Wäge Zeitpunkt	Kontrolle	RG5	RG20	RG40
PND 0	5,5 + 0,2	5,6 + 0,3	5,3 + 0,4	5,5 + 0,4
PND 5	9,4 + 0,9	9,8 + 1,0	8,7 + 1,4	8,3 + 0,8
PND 10	17,4 + 1,6	17,1 + 2,0	15,8 + 3,2 $\downarrow$ 10%	14,7 + 2,6 $\downarrow$ 16%
PND 15	26,6 + 2,5	25,2 + 2,8	24,8 + 3,0 $\downarrow$ 7%	23,3 + 2,8 $\downarrow$ 13%
PND 21	36,3 + 2,9	35,0 + 4,8	34,3 + 4,4 $\downarrow$ 6%	32,9 + 3,6 $\downarrow$ 10%
PND 50	153,4 + 22,7	154,3 + 23,3	146,4 + 25,7 $\downarrow$ 5%	133,7 + 30,2 $\downarrow$ 13%
PND 70	236,9 + 51,2	234,7 + 54,7	228,5 + 53,4 $\downarrow$ 4%	208,7 + 58,4 $\downarrow$ 12%

Insgesamt führte die PCB-Belastung zu einigen PCB-dosisabhängigen signifikanten Veränderungen: reduzierte Wurfrate, geringere Gewichtsentwicklung, ungleiche Größenverteilung und höhere Sterberaten innerhalb der Würfe. Ansonsten traten weder bei den Muttertieren noch bei den Nachkommen Mißbildungen oder andere Anzeichen einer äußerlich erkennbaren PCB-Intoxikation auf.

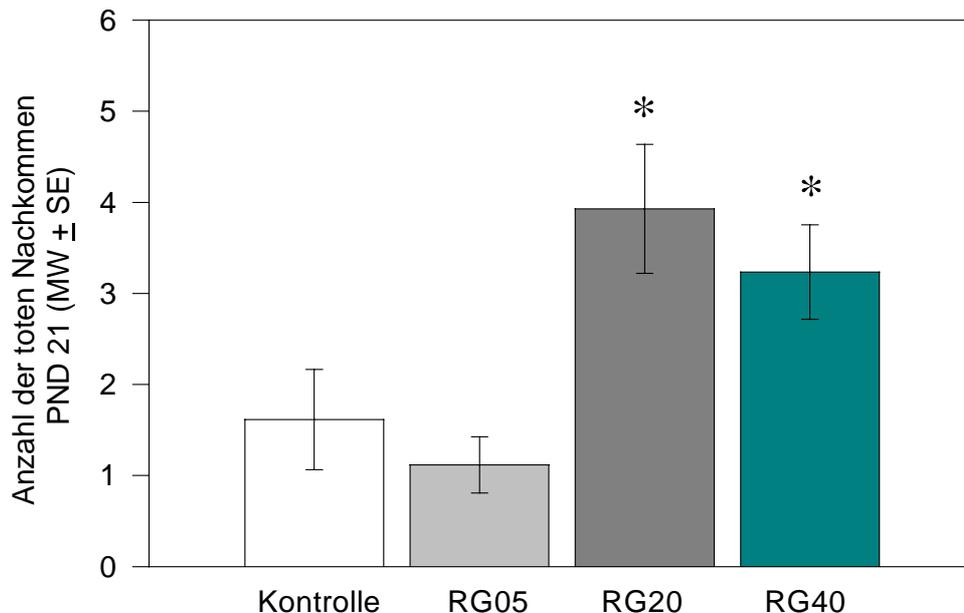


Abb.13: Sterberate der Nachkommen. Anzahl der toten Nachkommen zum Zeitpunkt des Absetzens an PND 21 (Mittelwerte  $\pm$  SE).

### 4.3 Innere PCB Belastung

Am Tag der Geburt (PND 0 = postnataler Tag) und am Tag des Absetzens vom Muttertier (PND 21) wurde ein Teil der Mütter und Nachkommen zur Blut -und Organentnahme (Fettgewebe und Gehirn) getötet, um die innere Exposition und die Sexualhormone Testosteron und Östradiol zu bestimmen. Für die Hormonmessungen sind zusätzlich auch adulte männliche Nachkommen an PND 250 und PND 310 präpariert worden.

Die innere PCB-Belastung ist in Tabelle 18 zusammengefaßt. Die Werte zeigen sehr deutlich den fast linearen Zusammenhang zwischen der PCB Konzentration im Futter und in den Gewebeproben. Weiterhin zeigen die Werte der F1 Generation, daß die maternale PCB-

Belastung über die Muttermilch am Ende der Säugephase (PND 21) zu einem starken Anstieg der PCB Belastung im Gehirn der Nachkommen führt (Anstieg von PND 0 bis PND 21 um den Faktor 1,6 bis 7,0). Dagegen sinkt die PCB-Konzentration im Gehirn der Muttertiere während der Laktation um ca. 30-57%.

Erwartungsgemäß ist die PCB Belastung im Gehirn der Muttertiere niedriger als im Fettgewebe. Die PCB sind im Fettgewebe um den Faktor 53 bis 60 mal stärker akkumuliert als im Gehirn. Durch einen technischen Fehler konnten keine PCB-Konzentrationen im Fettgewebe der Nachkommen der RG05 und RG20 Gruppe bestimmt werden. Bei PND 21 lag die mittlere PCB-Konzentrationen im Fettgewebe der Nachkommen aus der höchsten Belastungsgruppe bei  $60,08 \mu\text{g/g} \pm 10,02$ . Bei den Müttern tritt der erwartete Rückgang der PCB Gewebekonzentration während der Säugephase nur im Gehirn ein. In der niedrigsten Belastungsgruppe ist sogar ein leichter Anstieg der PCB-Konzentration im Fettgewebe zu beobachten. Nur in der RG20 Gruppe wird während der Säugephase ein leichter Rückgang der PCB Konzentration im Fettgewebe beobachtet.

Die PCB-Konzentrationen im Gehirn der Mütter sind zum Zeitpunkt der Geburt annähernd gleich den PCB Werten der Nachkommen. Die PCB Konzentrationen im Gehirn betragen 0,44, 2,21 und 5,65  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht für die Muttertiere der RG5, RG20 und RG40 Gruppe und 0,15, 2,19 und 4,63  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht für die Nachkommen der entsprechenden Muttertiere (Tab.18). Am Ende der Säugephase sind die PCB Konzentrationen im Gehirn der Muttertiere um 50% abgefallen, während die innere PCB Belastung der Nachkommen um den Faktor 3-4 über dem der Mütter lag. Bei den Kontrolltieren lagen alle PCB-Werte unterhalb der Nachweisgrenze von 0,01  $\mu\text{g/g}$  Fett.

Die PCB-Konzentrationen im Gewebe der adulten männlichen Nachkommen (PND 250) sind in Tabelle 19 wiedergegeben. Bei den adulten Nachkommen sind die PCB im Fettgewebe aller Gruppen noch nachweisbar, während sie im Gehirn nur noch in der RG20 Gruppe und RG40 Gruppe nachweisbar sind. Im Vergleich zur PCB Belastung an PND 21 ist die Konzentration im Gehirn um den Faktor 170 und 60 in der RG 20 Gruppe beziehungsweise RG 40 Gruppe abgefallen, während sich die PCB-Belastung im Fettgewebe der RG 40 Gruppe nur um den Faktor 6 reduziert hat.

Tab.18: Innere PCB-Belastung in Gehirn und Fettgewebe der Mütter und der Nachkommen in ( $\mu\text{g/g}$ ) Frischgewicht, Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3/\text{Gruppe}$ , RG40:  $n = 6/\text{Gruppe}$ , n.n.: nicht nachgewiesen, n.b.: nicht bestimmt, Bestimmungsgrenze:  $0,01 \mu\text{g/g}$  Frischgewicht.

Alter	Gruppe	Mütter		F1-Nachkommen	
		Fettgewebe	Gehirn	Fettgewebe	Gehirn
PND 0	Kontrollen	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	RG05	$26.8 \pm 5.5$	$0.44 \pm 0.28$	n.n.	$0.15 \pm 0.06$
	RG20	$155.8 \pm 76.7$	$2.81 \pm 0.16$	n.n.	$2.19 \pm 0.59$
	RG40	$300.2 \pm 87.7$	$5.65 \pm 0.29$	n.n.	$4.63 \pm 0.57$
PND 21	Kontrollen	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	RG05	$46.4 \pm 13.9$	$0.25 \pm 0.19$	n.b.	$1.05 \pm 0.42$
	RG20	$123.3 \pm 20.4$	$0.86 \pm 0.08$	n.b.	$3.42 \pm 0.57$
	RG40	$289.7 \pm 194.8$	$2.13 \pm 0.92$	$60.08 \pm 10.0$	$8.18 \pm 4.14$

Tab.19: Innere PCB-Belastung in Gehirn und Fettgewebe der Nachkommen, Fettgewebe in  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht, Gehirn in  $\text{ng/g}$  Frischgewicht, Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3/\text{Gruppe}$ , n.n.: nicht nachgewiesen, Bestimmungsgrenze:  $0,01 \mu\text{g/g}$  Frischgewicht Fettgewebe,  $5\text{ng/g}$  Frischgewicht Gehirn.

Alter	Gruppe	F1-Nachkommen	
		Fettgewebe	Gehirn
PND 250	Kontrollen	n.n.	n.n.
	RG05	$0.81 \pm 0.08$	n.n.
	RG20	$2.73 \pm 0.50$	$18.67 \pm 6.23$
	RG40	$10.22 \pm 1.92$	$143.67 \pm 73.87$

#### 4.4 Verhaltensversuche

## 4.4.1 Open Field

### 4.4.1.1 Explorationsverhalten im Open Field

Das Aufrichten auf die Hinterpfoten ist ein Maß für das Explorationsverhalten der Ratten im Open Field. An PND 30 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb.14A). Bei den adulten männlichen Ratten (PND 100) zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhtem Explorationsverhalten und der PCB-Belastung (Abb. 14B).

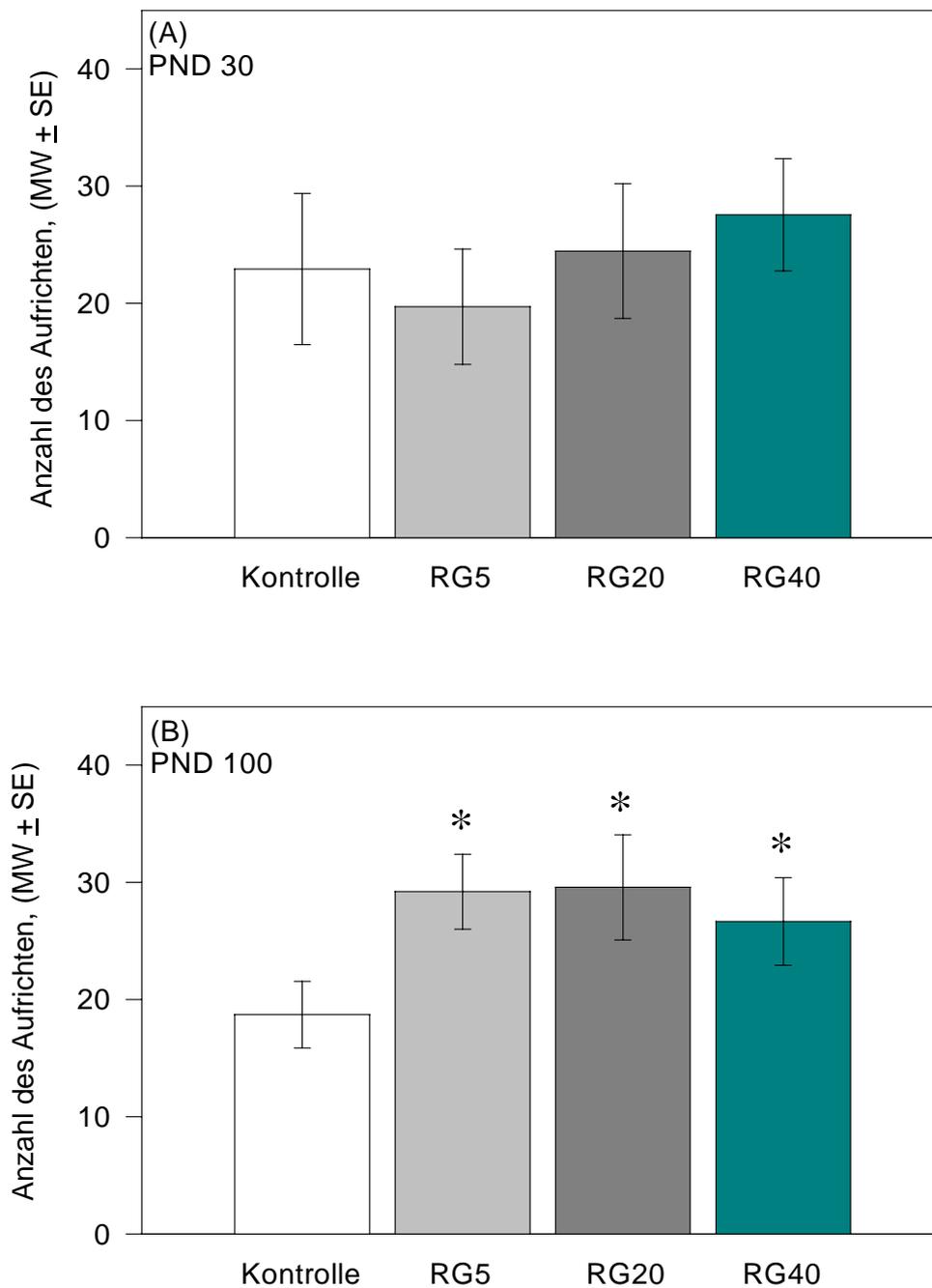


Abb.14: Aufrichten im Open Field (A) an PND 30 und (B) an PND 100. Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterpfoten der männlichen Tiere (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20, n = 12, RG40 n = 15.

#### 4.4.1.2 Defäkation im Open Field

Die Anzahl der Boli ist ein Maß für die Emotionalität und insbesondere die Ängstlichkeit der Tiere. Es wurde eine geringfügige Zunahme der Defäkation der Jungtiere aus der RG40-Gruppe an PND 30 im Open Field beobachtet, die aber unterhalb der Signifikanzgrenze blieb (Abb.15). Auch an PND 100 gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Boli (Abb.16).

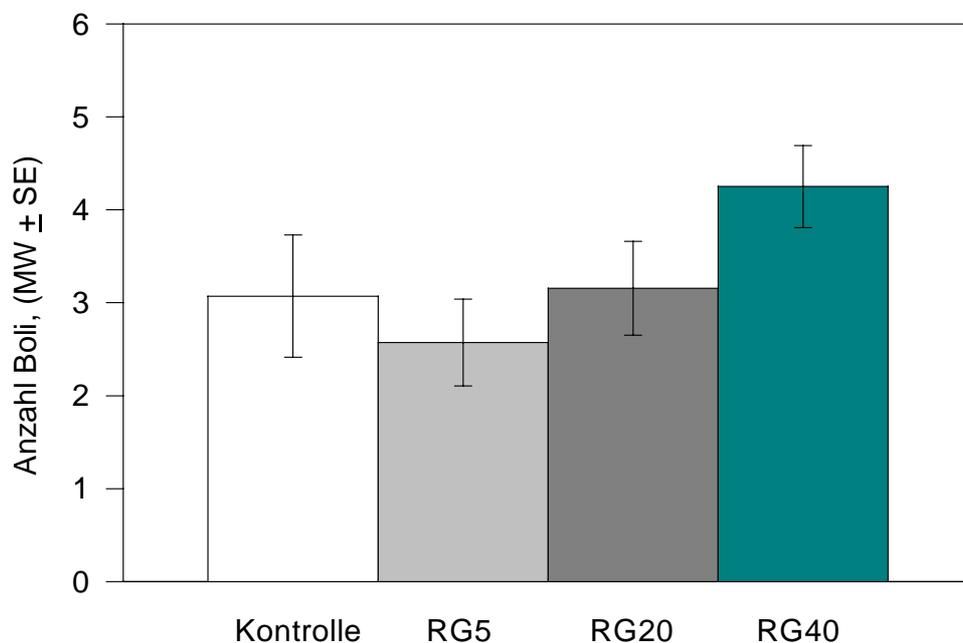


Abb.15: Emotionalität im Open Field an PND 30. Anzahl der Boli der männlichen Jungtiere (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20 n = 12, RG40 n = 15.

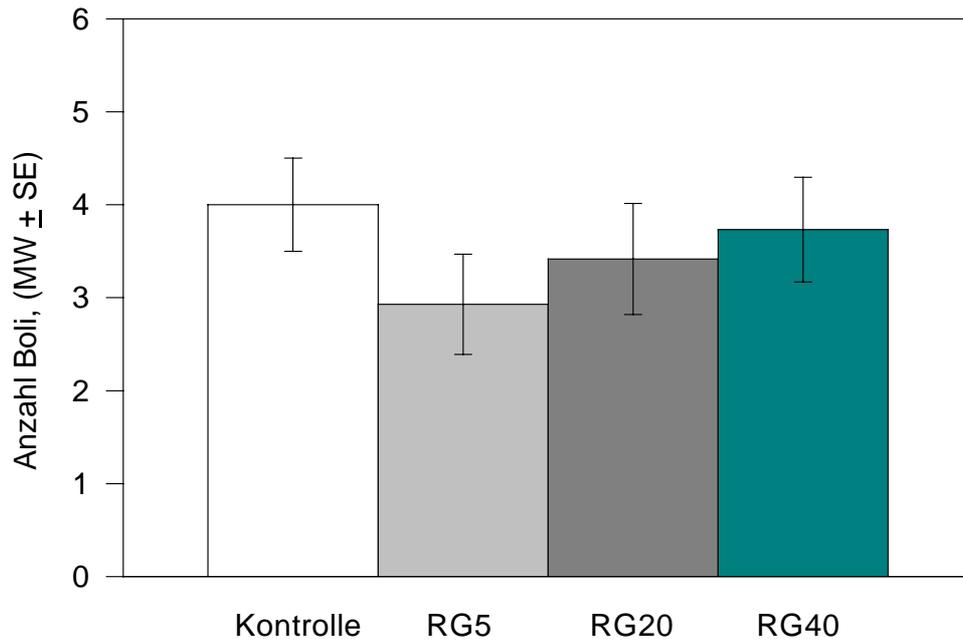


Abb.16: Emotionalität im Open Field an PND 100. Anzahl der Boli der adulten männlichen Tiere (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20 n = 12, RG40 n = 15.

#### 4.4.1.3 Messung der lokomotorischen Aktivität der Jungtiere im Open Field an PND 30

Die Messung ergab signifikant höhere lokomotorische Aktivität der männlichen Tiere an PND 30 in der RG40-Gruppe. Die Bestimmung der lokomotorischen Aktivität im Open Field an PND 30 ergab bei den Jungtieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit signifikanter Steigerung der Gesamtaktivität in der RG40-Gruppe ( $p < 0,05$ ) (Abb.17). Die Gruppenunterschiede waren besonders dann ausgeprägt, wenn nur die äußere Zone des Open Field betrachtet wurde (Abb.18). In dieser Zone weist die höchste Belastungsgruppe eine deutliche Zunahme der zurückgelegten Strecke auf (Abb.18). Die prozentuale Aufenthaltsdauer in der äußeren Zone war dagegen nicht verändert (Abb.19).

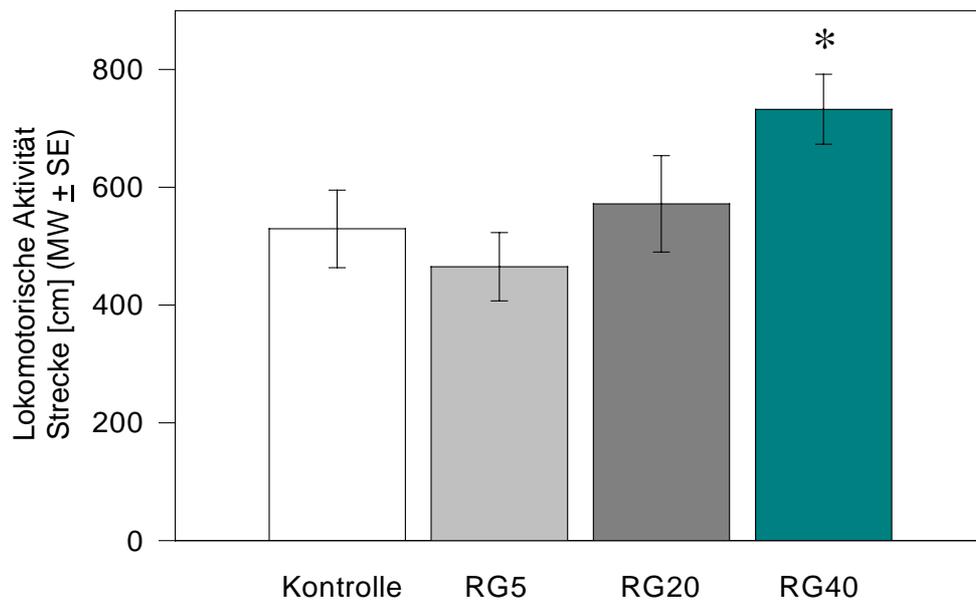


Abb.17: Zurückgelegte Strecke [cm] der männlichen Jungtiere (PND 30) im Open Field, (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20 n = 12, RG40 n = 16.

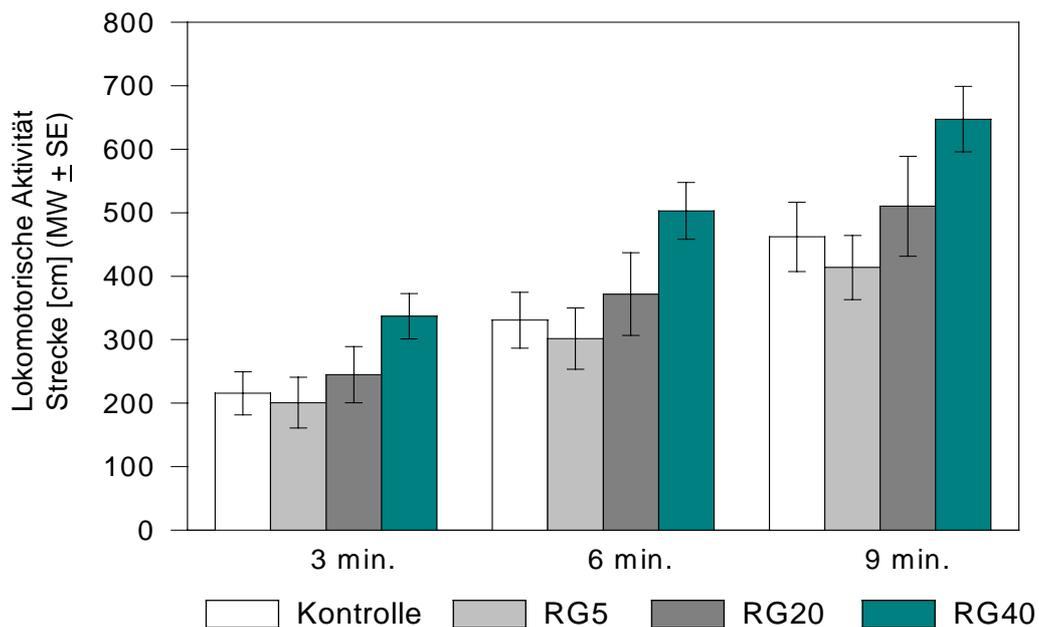


Abb.18: Kumulative lokomotorische Aktivität der männlichen Jungtiere (PND 30) in der äußeren Zone des Open Field. Zurückgelegte Strecke [cm] kumulativ in drei Minuten Intervallen (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20 n = 12, RG40 n = 16.

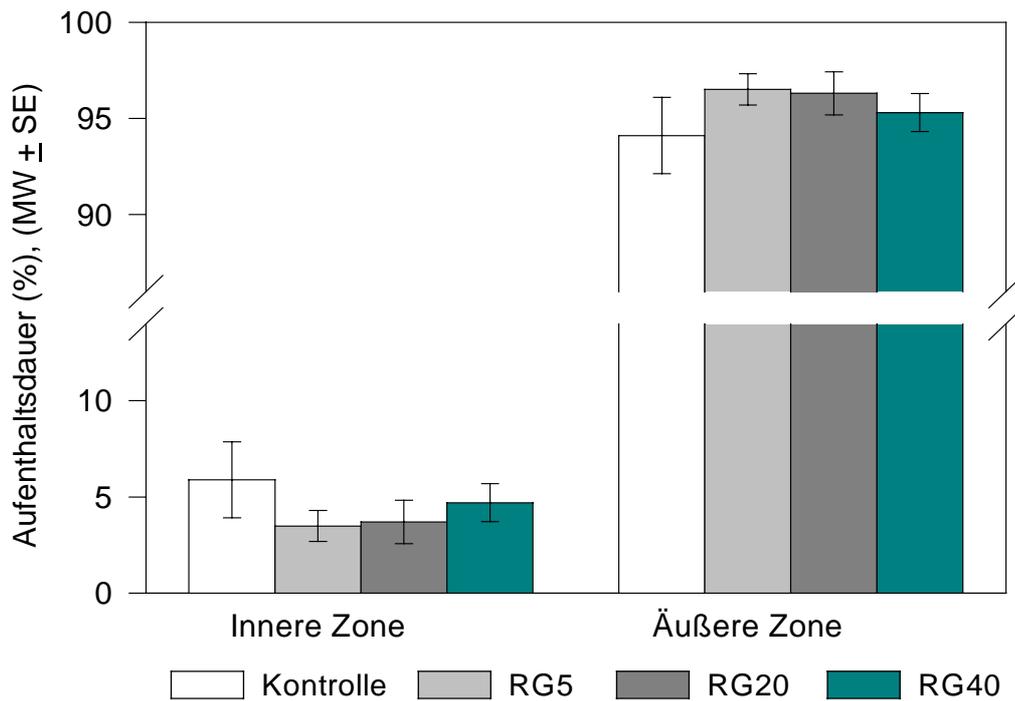


Abb.19: Prozentuale Aufenthaltsdauer der männlichen Jungtiere (PND 30) in den beiden Zonen des Open Field (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20 n = 12, RG40 n = 16.

#### 4.4.1.4 Aktivitätsmessung der adulten Tieren (PND 100) im Open Field

Die gesteigerte Gesamtaktivität der Jungtiere der RG40-Gruppe ist im adulten Stadium tendenziell noch nachweisbar, bleibt aber statistisch unterhalb der Signifikanzgrenze (Abb.20). Wiederum sind die Unterschiede ausgeprägter, wenn man die äußere Zone betrachtet (Abb.21). Die Tiere der höchsten Belastungsgruppe halten sich im Vergleich zu den Kontrolltieren etwas weniger in der ansonsten bevorzugten äußeren Zone des Open Field auf, doch ist auch dieser Unterschied nicht signifikant (Abb.22).

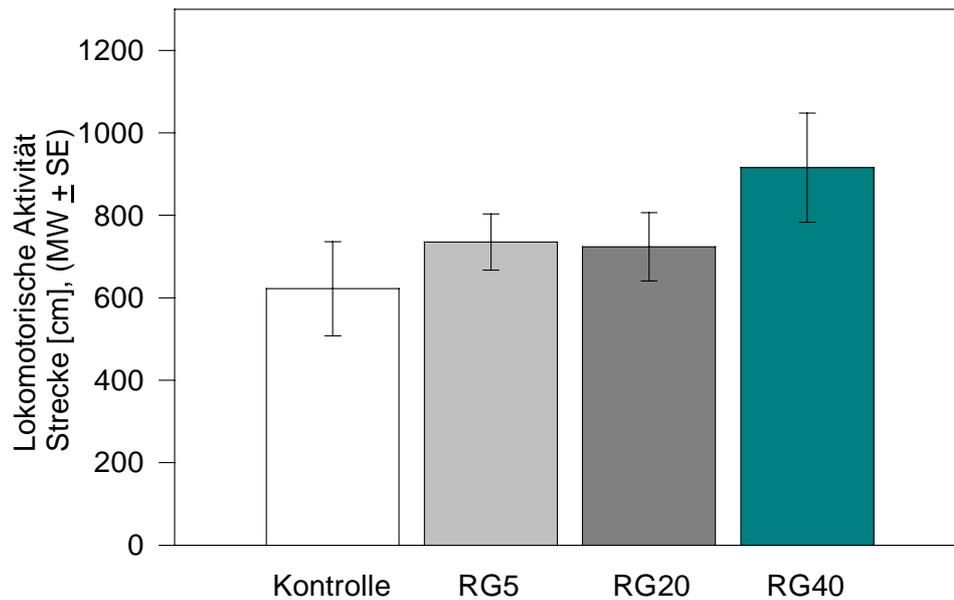


Abb.20: Zurückgelegte Strecke [cm] als lokomotorische Aktivität der adulten männlichen Tiere (PND 100) im Open Field, (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20 n = 12, RG40 n = 15.

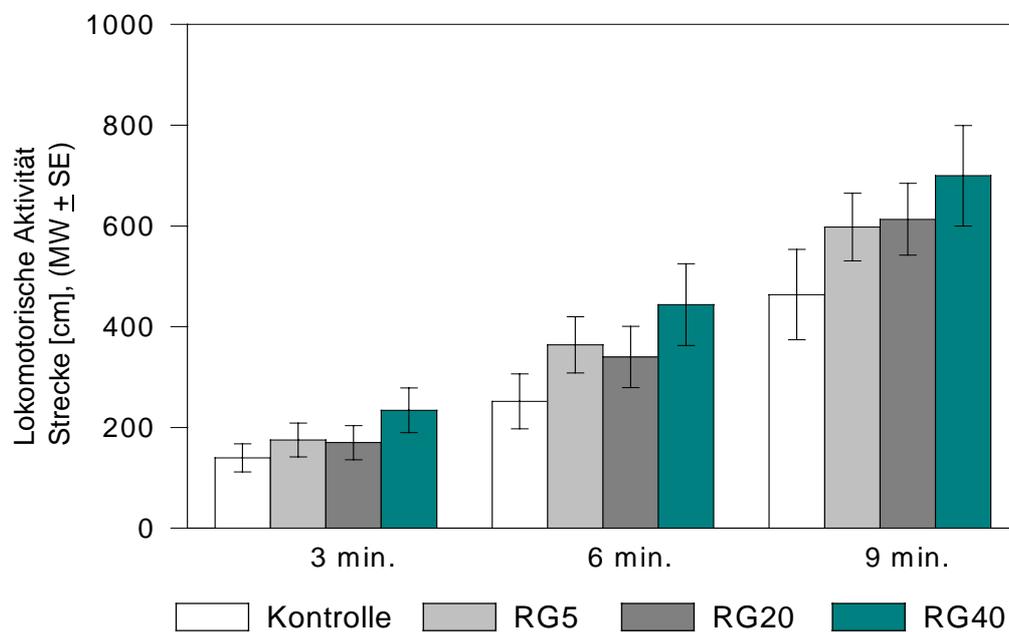


Abb.21: Locomotorische Aktivität der adulten männlichen Tiere (PND 100) in der äußeren Zone des Open Field. Zurückgelegte Strecke [cm] kumulativ in drei Minuten Intervallen (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20 n = 12, RG40 n = 15.

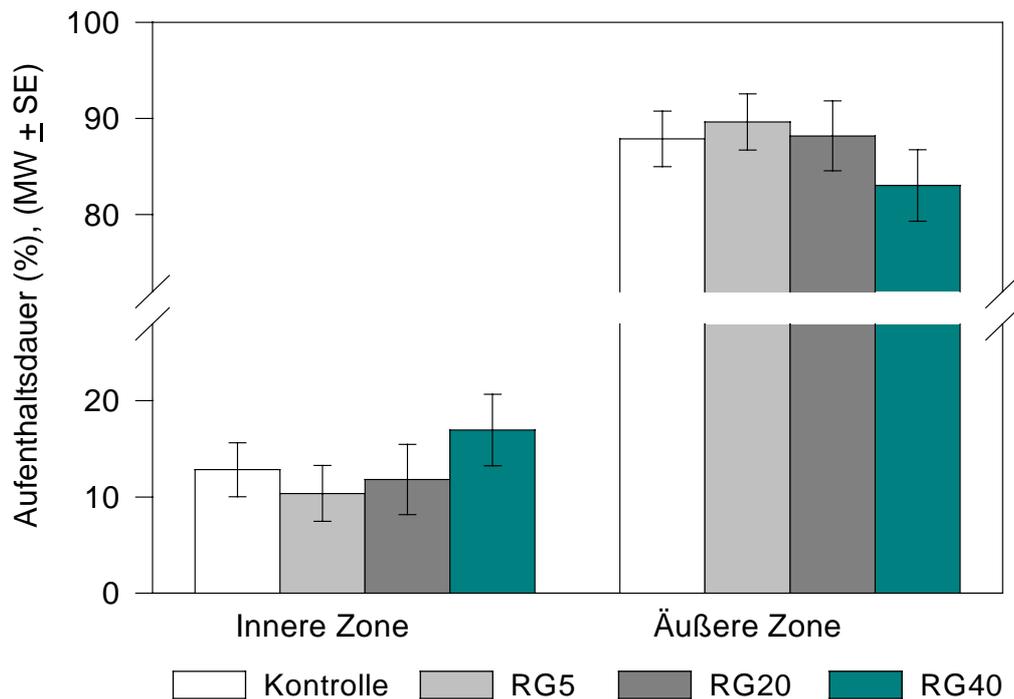


Abb.22: Prozentuale Aufenthaltsdauer der adulten männlichen Tiere (PND 100) in den beiden Zonen des Open Field (Mittelwerte  $\pm$  SE). Kontrolle und RG5 n = 14, RG20 n = 12, RG40 n = 15.

#### 4.4.2 Passive Vermeidung

An PND 210 wurde eine Bestimmung der passiven Vermeidung als ein Verhaltenstest zur Überprüfung von emotionalen Komponenten des Verhaltens durchgeführt.

Post hoc Vergleiche ergaben, daß bereits bei der niedrigsten Belastung die Latenzzeit gegenüber den Kontrollen beim 1. Zeitpunkt nach Konditionierung (5 min.) reduziert waren. Dies trifft auch für die mittlere Belastungsstufe zu, während bei der höchsten Belastung die Veränderungen nicht signifikant waren. Ebenso gab es beim 2. Zeitpunkt (4h) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen [F(3,51)=3,65;  $p < 0,05$ ], die aber bei post hoc Vergleichen nicht einzelnen Gruppen zugeordnet werden konnten. Ebenso ergaben sich signifikante Verlaufsunterschiede anhand der Interaktion zwischen der PCB-Belastung und den Zeitpunkten [F(6,100)=3,44;  $p < 0,005$ ].

Die Abbildung 23 zeigt die reduzierte Verweildauer auf der Plattform vor der Konditionierung und zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Konditionierungsdurchgang. Es wurde eine Kovarianzanalyse durchgeführt, bei der die Verweildauer auf der Plattform vor der Konditionierung als Kovariate berücksichtigt wurde. Es zeigte sich durch die verkürzte

Verweildauer auf der Plattform ein signifikanter Behandlungseffekt über alle PCB-Gruppen [F(3,5)=3,78; p<0,05], allerdings ohne prägnante Dosisabhängigkeit.

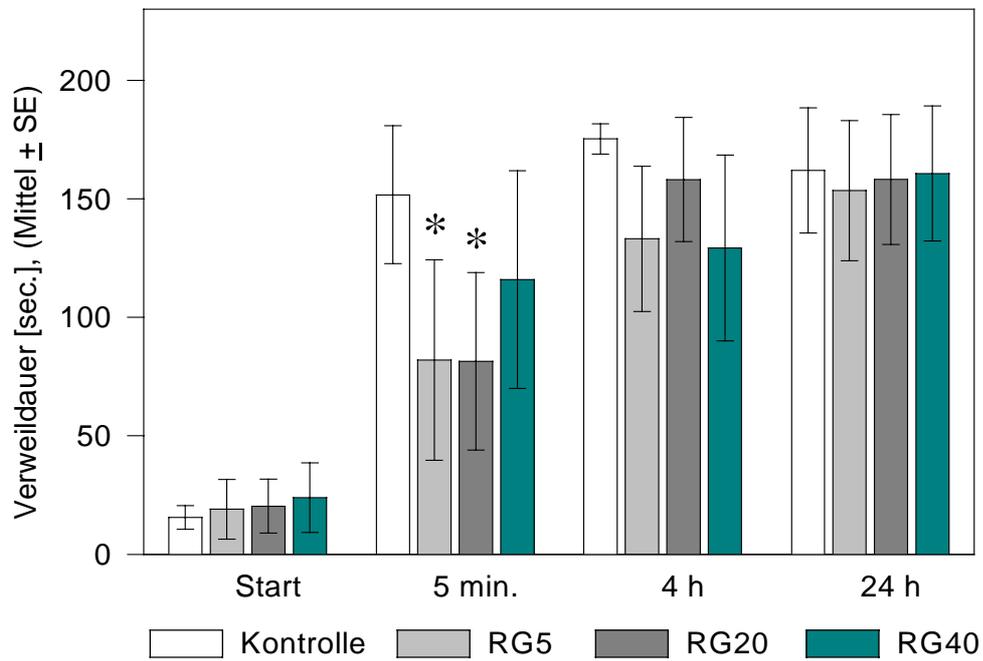


Abb.23: "Step Down"-Latenz in dem passiven Vermeidungslernen (PND 210). Verweildauer auf der Plattform in [sec.] vor der Konditionierung (Start) und 5 min, 4 h und 24 h nach dem Konditionierungsdurchgang, (Mittelwerte  $\pm$  SE). \*p < 0.05, n = 10/Gruppe.

### 4.4.3 Ultraschall Vokalisation

Bei der konditionierten Vokalisation ergab eine Varianzanalyse mit Meßwiederholung signifikante PCB-bedingte Unterschiede zwischen den Gruppen über alle Tage [ $F(3,55)=3,13$ ;  $p<0,05$ ]. In der höchsten Belastungsgruppe (RG40-Gruppe) wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe am 1.Tag signifikant weniger konditionierte Vokalisationen gemessen ( $p<0,05$ ). Dieser Effekt bestand auch noch am Tag 10 nach der Konditionierung. An diesem Tag wies auch die niedrigste Belastungsstufe signifikante Reduktionen gegenüber der Kontrollen auf ( $p<0,05$ ), nicht aber die mittlere Belastungsstufe.

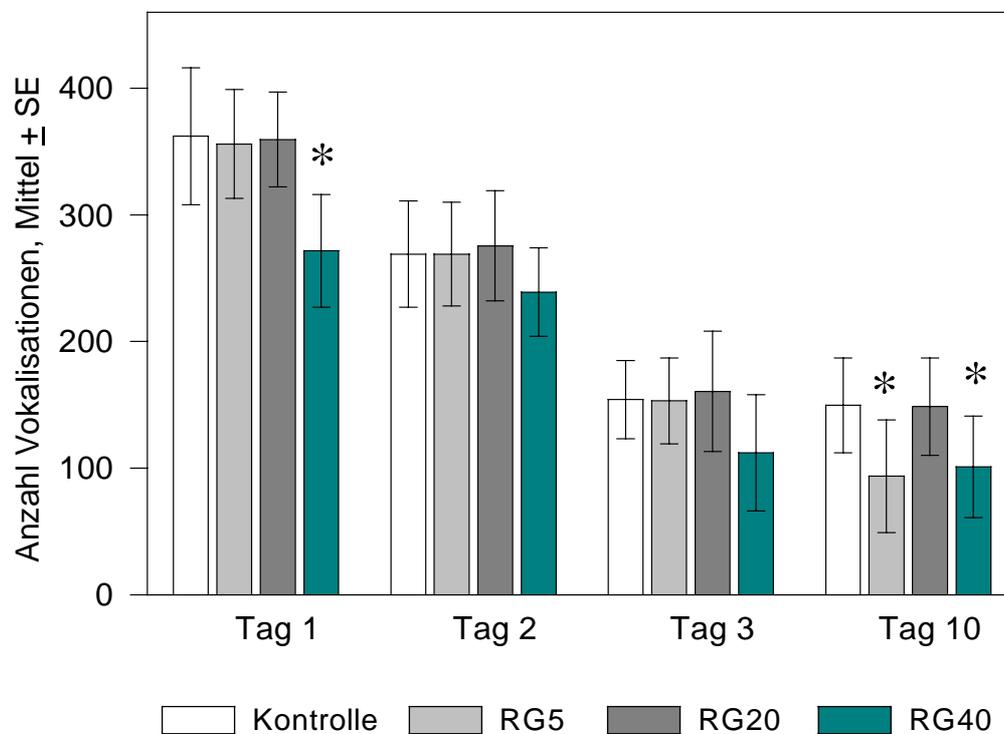


Abb.24: Anzahl Vokalisationen bei der konditionierten Ultraschall Vokalisation (PND 140) an verschiedenen Meßzeitpunkten (Mittelwerte  $\pm$  SE). \* $p < 0.05$ ,  $n = 10$ /Gruppe.

#### 4.4.4 Katalepsie

In dem Katalepsie-Test, bei dem Tiere im adulten Stadium (PND 300) getestet wurden, traten in den Positionen „Gitter“ und „Stange“ keine signifikanten PCB-Behandlungseffekte auf (Abb.25 und Abb.26).

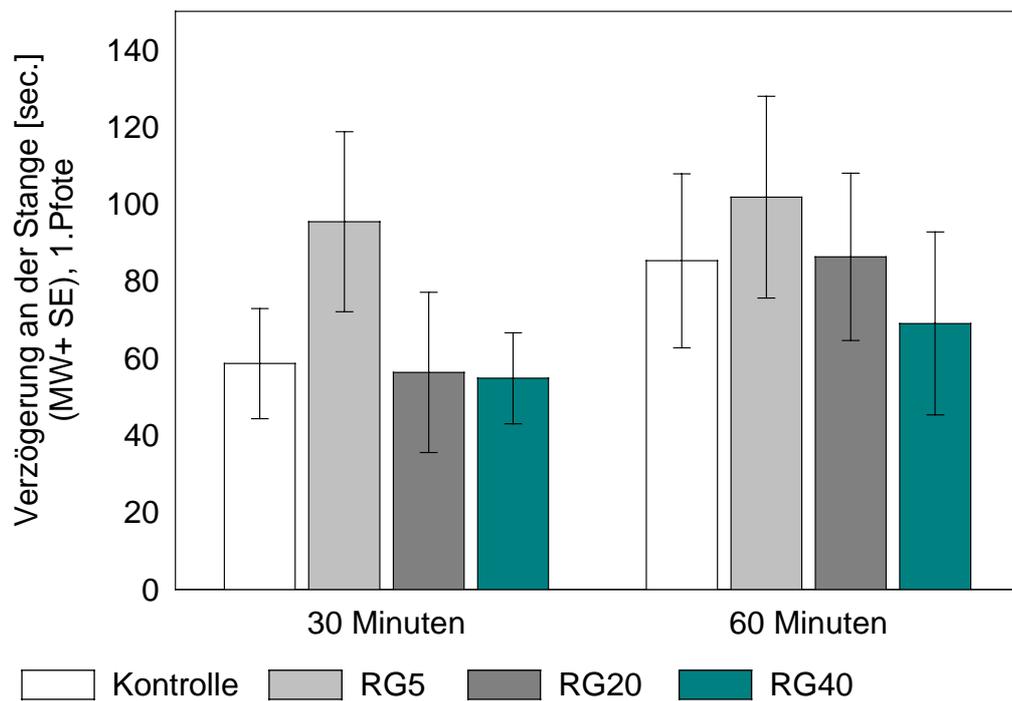


Abb.25: Bewegungsstarre im Katalepsie-Test (PND 300), (Mittelwerte  $\pm$  SE). Latenz bis zur Bewegung der ersten Pfote an der Stange jeweils 30 und 60 Minuten nach der Haloperidol- Injektion, n = 10/Gruppe.

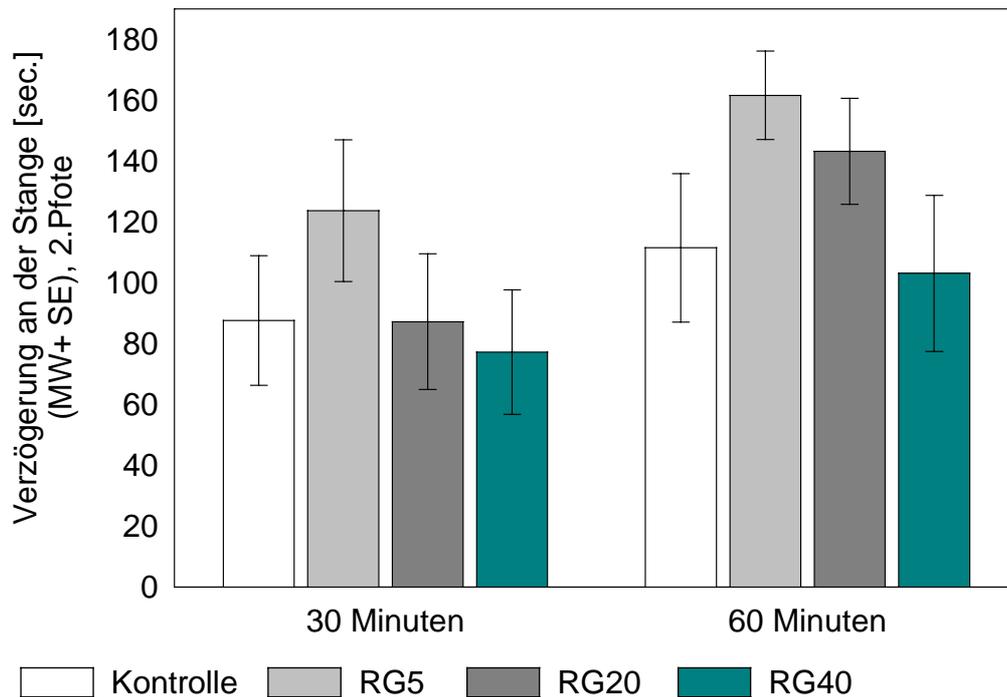


Abb.26: Bewegungsstarre im Katalepsie-Test (PND 300), (Mittelwerte  $\pm$  SE). Latenz bis zur Bewegung der zweiten Pfote an der Stange jeweils 30 und 60 Minuten nach der Haloperidol- Injektion, n = 10/Gruppe.

Der einzige Effekt einer PCB-Belastung wurde in der Box beobachtet (Abb.27). Die Latenzen in der Box bis zur Bewegung der ersten Pfote waren 30 min. und 60 min. nach der Haloperidol-Injektion dosisabhängig verkürzt [ $F(3,36)=3.97$ ;  $p<0,05$ ]. Es wurde eine Varianzanalyse mit Meßwiederholung durchgeführt, wobei der Faktor Zeit mit berücksichtigt wurde. Eine verkürzte Latenz bis zum Bewegungsbeginn der Vorderpfote in der Box konnte 60 Minuten nach der Injektion nur noch in der höchsten Belastungsgruppe beobachtet werden (Abb.28). Ebenfalls war bei 60 min. auch die Latenz bis zur Bewegung der ersten Hinterpfote in der RG 40-Gruppe verkürzt [ $F(3,39)=3.84$ ;  $p<0,05$ ], (Abb.29).

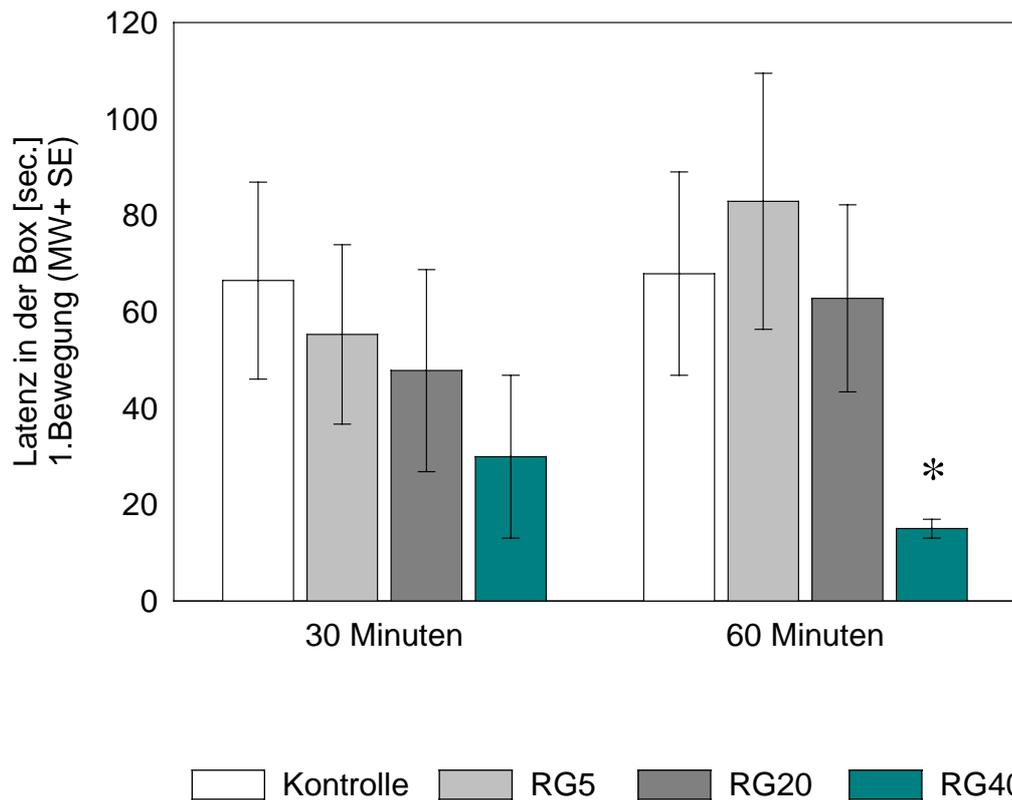


Abb.27: Bewegungsstarre im Katalepsie-Test (PND 300), (Mittelwerte  $\pm$  SE). Latenz bis zur Bewegung der ersten Pfote in der Box. Jeweils 30 und 60 Minuten nach der Injektion des Haloperidols, n = 10/Gruppe.

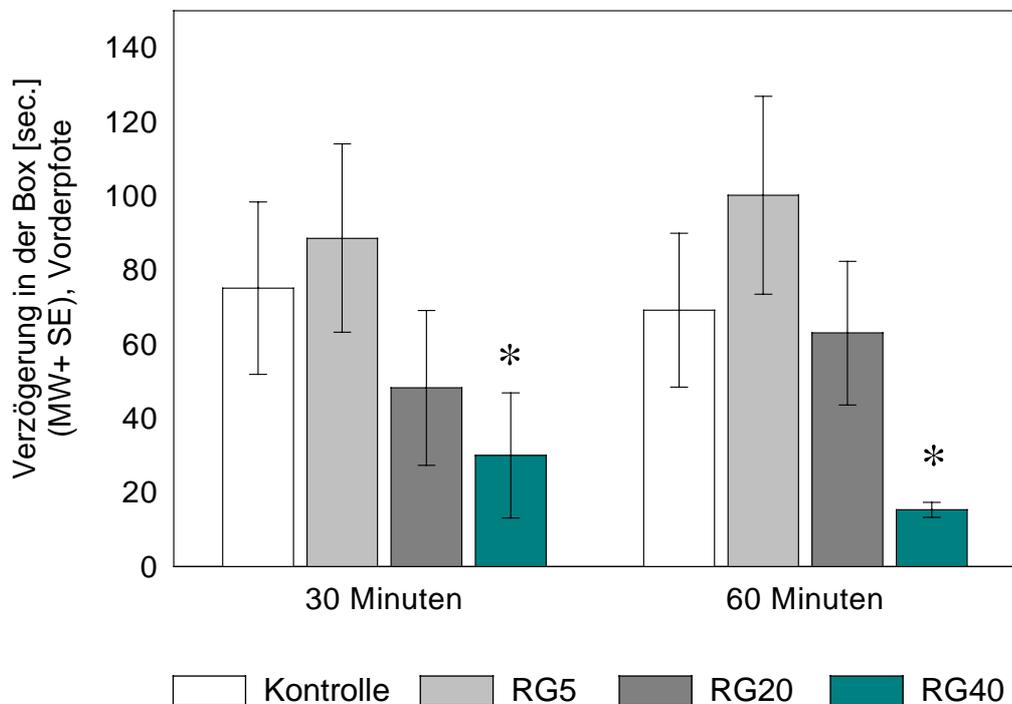


Abb.28: Bewegungsstarre im Katalepsie-Test (PND 300), (Mittelwerte  $\pm$  SE). Latenz bis zur Bewegung der Vorderpfote in der Box. Jeweils 30 und 60 Minuten nach der Injektion des Haloperidols, n = 10/Gruppe.

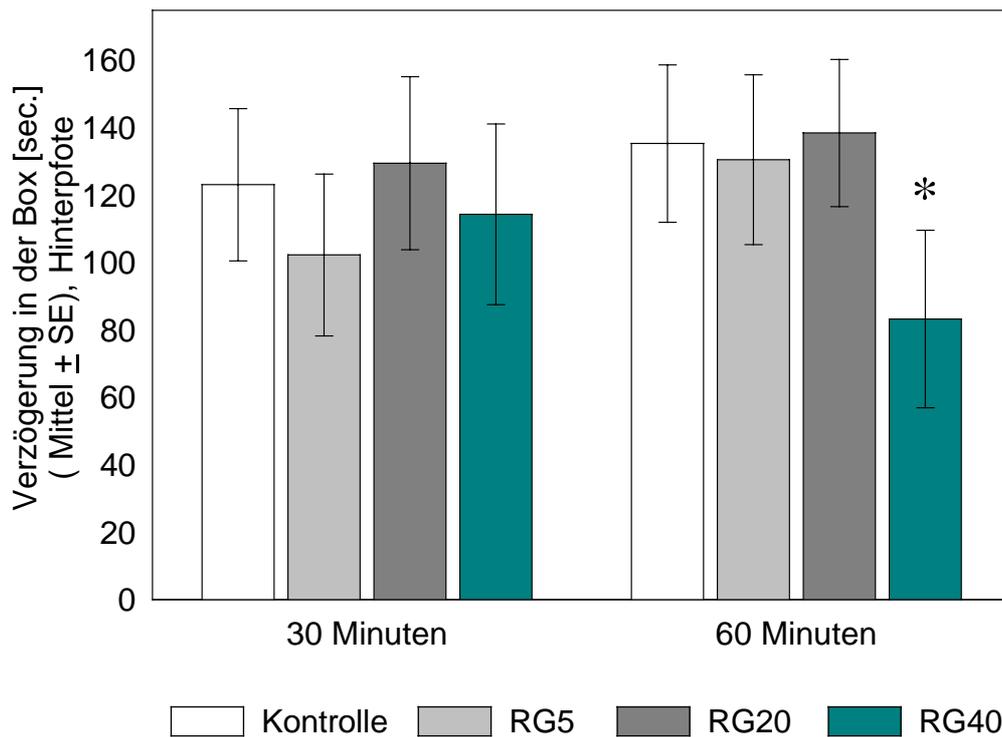


Abb.29: Bewegungsstarre im Katalepsie-Test (PND 300), (Mittelwerte  $\pm$  SE). Latenz bis zur Bewegung einer Hinterpfote in der Box. Jeweils 30 und 60 Minuten nach der Injektion des Haloperidols, n = 10/Gruppe.

## 4.5 Geschlechtsspezifische Verhaltensversuche

### 4.5.1 Süßpräferenz

Die Bestimmung der Süßpräferenz weiblicher und männlicher Ratten begann an PND 110. Die Saccharinlösung wurde erwartungsgemäß von beiden Geschlechtern gegenüber Trinkwasser deutlich bevorzugt. Die männlichen Tiere der Belastungsgruppen konsumierten aufgrund des sexuell dimorphen Verhaltens erwartungsgemäß durchschnittlich 20-40% weniger Saccharinlösung als die weiblichen Tiere der entsprechenden Gruppen (Abb.30).

Um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Tieren zu erhöhen, wurde die getrunkene Flüssigkeitsmenge auf das Körpergewicht bezogen und in den Abbildungen als relativer Konsum [g/kg KG] dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurde der basale Wasserverbrauch als Kovariate in einer Kovarianzanalyse berücksichtigt.

Die Abbildung 30A zeigt, daß der Saccharinkonsum der belasteten männlichen Tiere dosisabhängig erhöht ist. Dieser Zusammenhang ist statistisch signifikant [ $F(1,35)=5.03; p < 0,05$ ]. Verglichen mit den Kontrolltieren war der Saccharinkonsum der RG5, RG20 und RG40-Gruppe um 22%, 20% und 28% erhöht.

Bei den weiblichen Tieren ist die erhöhte Süßpräferenz der weiblichen Tiere aus der RG5-Gruppe auffällig (Abb. 30B). Dies erreicht aber nicht die Signifikanz.

Der erhöhte Saccharinkonsum der männlichen Tiere in den Belastungsgruppen wurde besonders deutlich, wenn die Werte männlicher Ratten auf die weiblichen Ratten bezogen wurden. Es wurde der Quotient gebildet zwischen den Einzelwerten jedes männlichen Tieres und dem Mittelwert der weiblichen Tiere aus der entsprechenden Gruppe. Insbesondere die Rattenböcke der Belastungsgruppe RG20 und RG40 konsumierten bezogen auf das Körpergewicht mehr Saccharinlösung als die weiblichen Tiere dieser Gruppe. Es zeigt sich ein dosisabhängiger signifikanter Gruppeneffekt der Belastungsgruppen (Abb. 32C) [ $F(1,35)=6.20; p < 0.05$ ]. Verglichen mit den Kontrolltieren war dieses Verhältnis in der RG5-Gruppe um 7% reduziert und in den anderen Gruppen RG20 und RG40 mit 13% beziehungsweise 21% erhöht (Abb. 32C). Die männlichen Tiere der RG40-Gruppe unterschieden sich signifikant von den Kontrolltieren [ $F(1,35)=4.33; p < 0.05$ ].

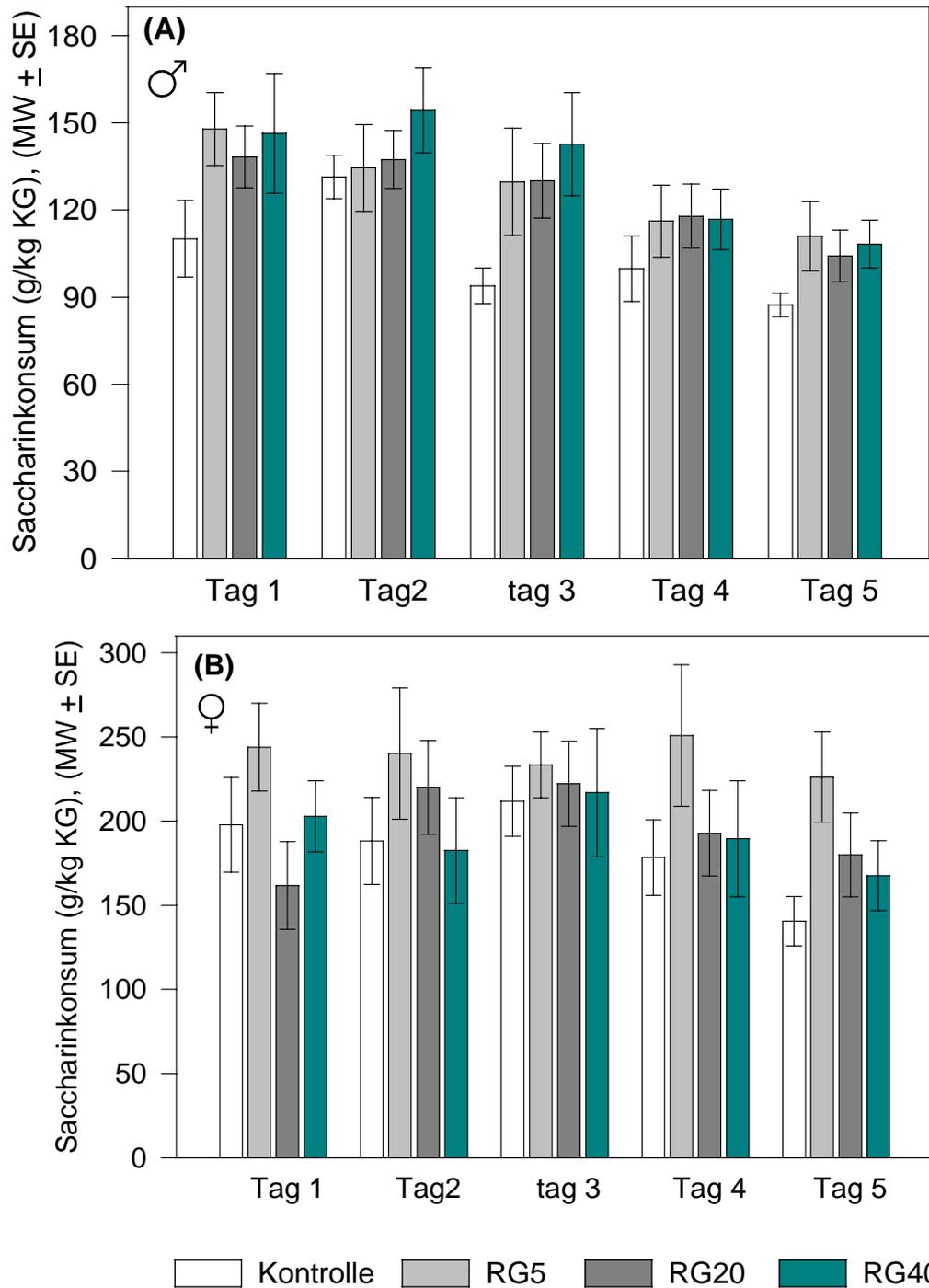


Abb.30: Relativer Saccharinkonsum (bezogen auf das Körpergewicht) der (A) männlichen und (B) weiblichen adulten Tiere (PND 110). Konsumierte Flüssigkeitsmenge an den fünf aufeinander folgenden Tagen (Mittelwerte  $\pm$  SE). \* $p < 0.05$ ;  $n = 10$ /Gruppe und Geschlecht.

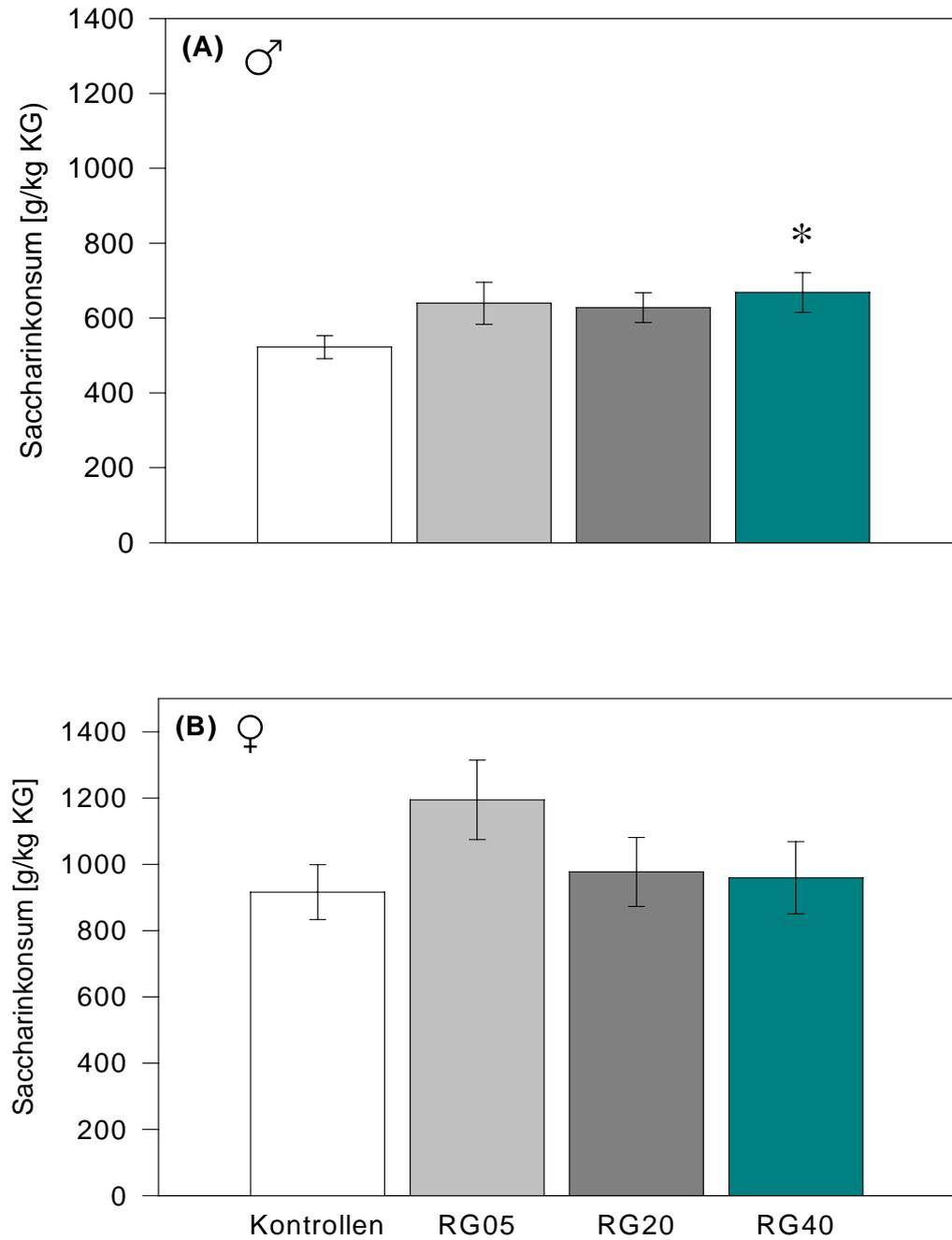


Abb.31: Relativer Saccharinkonsum (bezogen auf das Körpergewicht) der (A) männlichen und (B) weiblichen adulten Tiere (PND 110). Summe der an fünf aufeinander folgenden Tagen konsumierten Flüssigkeitsmenge (Mittelwerte  $\pm$  SE).  
\* $p < 0.05$ ;  $n = 10$ /Gruppe und Geschlecht.

Dargestellt ist der Saccharinkonsum als kumulativer Wert über fünf Tage (Summe der an fünf aufeinander folgenden Tagen konsumierten Flüssigkeitsmenge). Bei den männlichen Tieren liegt eine signifikante Erhöhung des relativen Saccharinkonsums der höchsten Belastungsgruppe RG40 vor [ $F(1,35)=5.76$ ;  $p < 0.05$ ]. Die Effekte der RG5 und RG20-Gruppe sind mit F-Werten um die 3.5 und einem p-Wert von kleiner 0.1 nahe der Signifikanz-Grenze.

Der basale Wasserverbrauch wurde hierbei als Kovariate in einer Kovarianzanalyse berücksichtigt. Im Verlauf der 5 Versuchstage nahm der Saccharinkonsum bei allen Gruppen stetig zu. Am dritten Tag wurde das Maximum erreicht, worauf der Konsum im Verlauf der letzten beiden Tage auf den Ausgangswert zurückging (Abb.33).

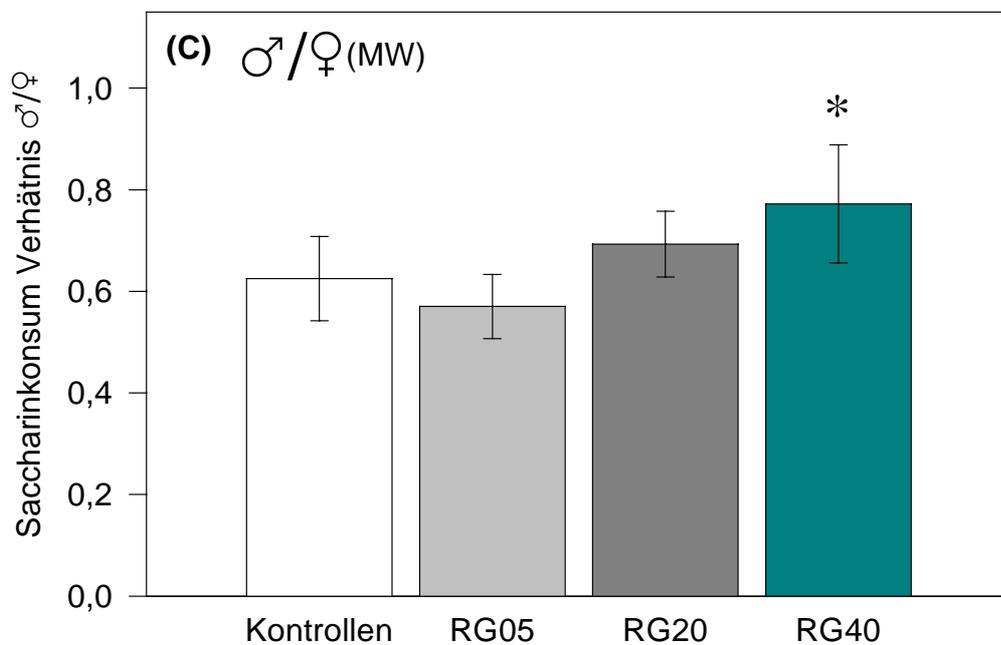


Abb.32: Relativer Saccharinkonsum (bezogen auf das Körpergewicht) als Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen adulten Tiere (PND 110 (Mittelwerte  $\pm$  SE).

\* $p < 0.05$ ;  $n = 10$ /Gruppe und Geschlecht.

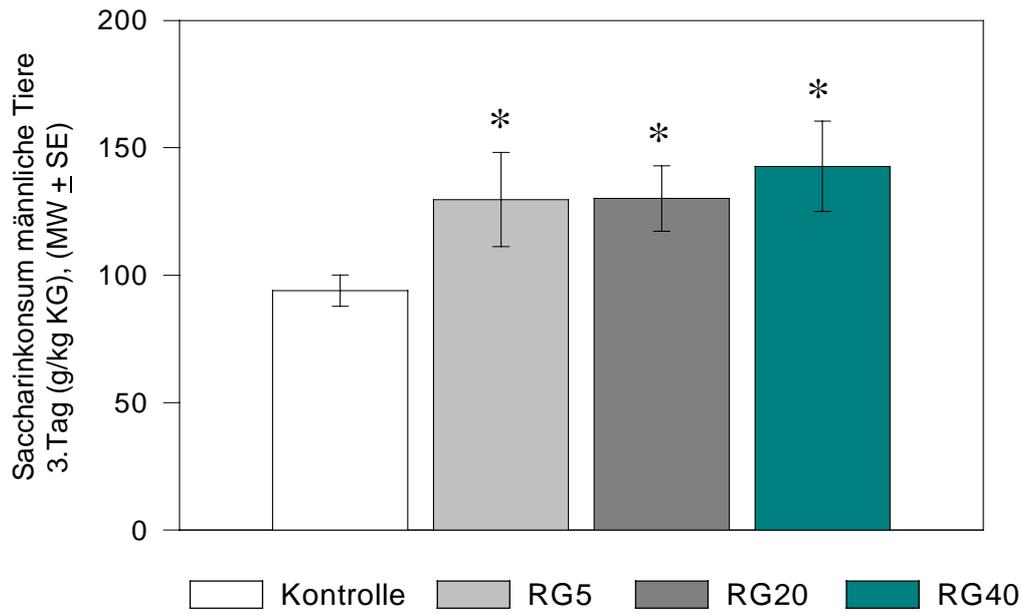


Abb.33: Relativer Saccharinkonsum (bezogen auf das Körpergewicht) der männlichen adulten Tiere (PND 110). Konsumierten Flüssigkeitsmenge am 3. Tag des Versuches (Mittelwerte ± SE). \* $p < 0.05$ ;  $n = 10$ /Gruppe und Geschlecht.

### 4.5.2 Konditionierte Platzpräferenz

Die konditionierte Platzpräferenz wurde ab PND 160 durchgeführt. Untersucht wurde, inwieweit die PCB-Belastung der Tiere sich auf die positiv affektiven Eigenschaften von Testosteron auswirkt.

Bei der höchsten Belastungsgruppe war die Wirkung von Testosteron in der Platzpräferenz signifikant ausgeprägt ( $p < 0,05$ ). Dies zeigt sich in einer deutlichen Bevorzugung der mit Testosteron gepaarten Seite der Versuchsbox am Testtag nach der Konditionierungsphase (Abb.34). Die mit Testosteron gepaarte Seite der Versuchsbox wurde im Vergleich zum Vortrainingstag im Vergleich zu den anderen Gruppen einschließlich der Kontrollen stärker bevorzugt.

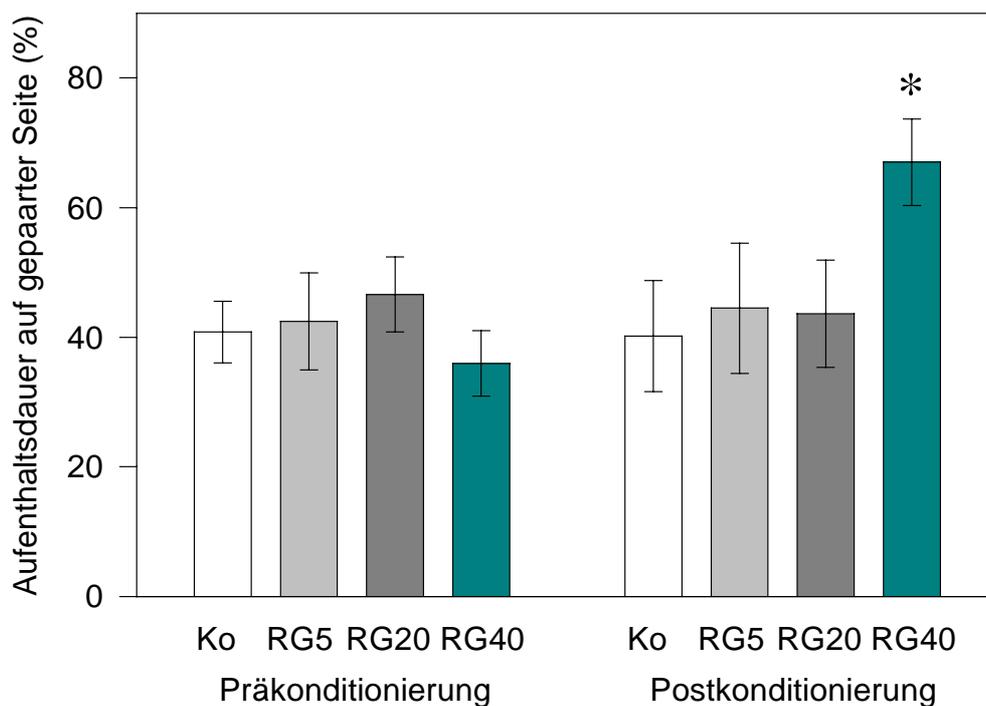


Abb.34: Aufenthaltsdauer der männlichen adulten Tiere (PND 160) auf der mit Testosteron gepaarten Seite der Versuchsbox vor und nach der Konditionierung (Mittelwerte  $\pm$  SE). \* $p < 0.05$ ;  $n = 15$ /Gruppe, RG40  $n = 14$ .

## 4.6 Hormonmessungen

### 4.6.1 Serumkonzentration von Östradiol und Testosteron

Die Östradiol Konzentration der mütterlichen Kontrolltiere zeigt von PND 0 bis PND 21 keine Veränderung. Auffällig sind die dosisabhängig abfallenden Werte der Östrogen-Konzentration bei den Belastungsgruppen (Abb.35 und Abb.36). Der Testosterongehalt steigt hingegen in allen Gruppen von PND 0 auf PND 21 etwas an. An PND 21 zeigt der Östradiolspiegel der Muttertiere aus der RG5-Gruppe und RG20-Gruppe signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb.36). Das E<sub>2</sub>/T Verhältnis der Muttertiere stimmt mit 0,1 genau mit den Normwerten für PND 21 überein. Der Östradiol-Spiegel der weiblichen Nachkommen der Kontrollgruppe liegt mit 82,9pg/ml über dem Normwert für PND 21 (E<sub>2</sub>/T=35pg/ml).

Tab.20: Sexualsteroid-Hormone im Serum weiblicher Nachkommen (PND 21)  
(pg/ml), (Mittelwerte  $\pm$  SD).  $\downarrow$  = Prozentuale Reduktion im Vergleich zur Kontrolle

Gruppe	Östradiol (E <sub>2</sub> )	Östradiol Reduktion	Testosteron (T)	Testosteron Reduktion
Ko	82,9 $\pm$ 11,2		60,4 $\pm$ 11,6	
RG5	58,2 $\pm$ 13,0	$\downarrow$ 30%	52,8 $\pm$ 17,4	$\downarrow$ 14%
RG20	31,4 $\pm$ 10,1	$\downarrow$ 62%	40,8 $\pm$ 18,1	$\downarrow$ 34%
RG40	16,6 $\pm$ 4,4	$\downarrow$ 81%	29,9 $\pm$ 8,2	$\downarrow$ 52%

Alle belasteten weiblichen Nachkommen haben an PND 21 im Vergleich zu den Kontrolltieren dosisabhängig reduzierte Östradiol-Spiegel [F(1,22)=188.73; p<0,0001], z.B. die RG5-Gruppe und die RG20-Gruppe um 30% bzw. 62% (Abb.37). Besonders niedrig ist der Östradiol-Spiegel der höchsten Belastungsgruppe. Hier ist der Hormonspiegel um ca. 80% niedriger als in der Kontrollgruppe und der niedrigsten Belastungsgruppe. Bei post hoc Vergleichen unterschieden sich die belasteten Gruppen im Östradiol-Spiegel signifikant von den Kontrollen mit F-Werten zwischen 16.29 und 167.49 mit entsprechenden p-Werten kleiner 0.001 und 0.0001.

Auch die Testosteron-Spiegel der weiblichen Nachkommen sind signifikant dosisabhängig reduziert. Die Reduktion betrug in den RG05, RG20 und RG40-Gruppen 14%, 34% und 52% im Vergleich zu den Kontrollen [F(1,28)=20.63; p<0.0001] (Abb.37).

Die Testosteronreduktion der weiblichen Nachkommen der RG20 und RG40-Gruppe war im Vergleich zur Kontrolle signifikant verstärkt [F(1,28)=7.41 und 17.87;  $p < 0.05$  und  $p < 0.0005$ ].

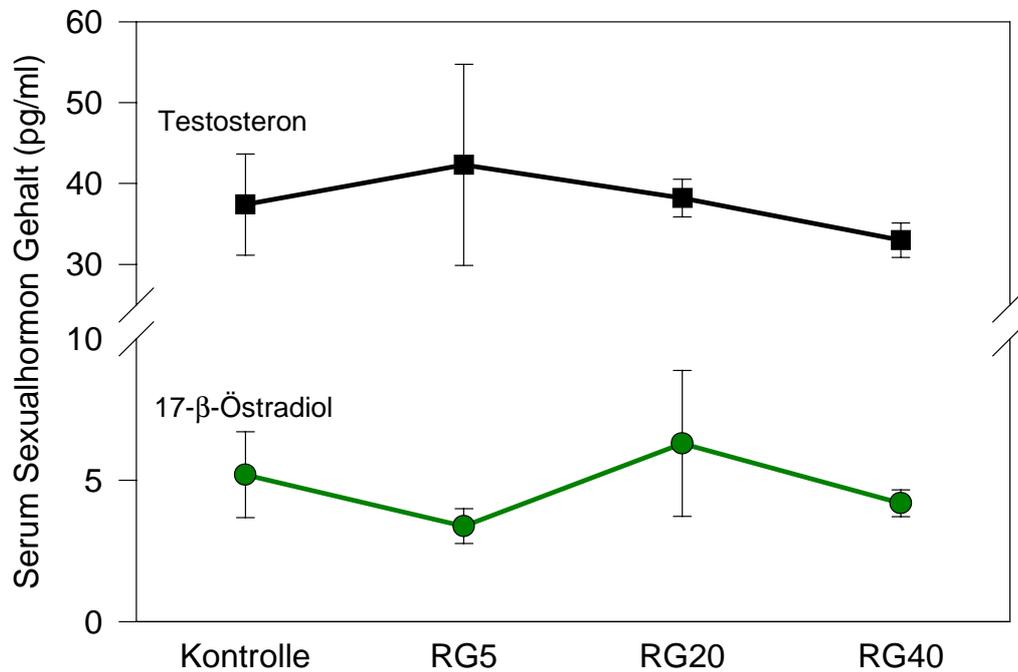


Abb.35: Serum Sexualhormon Gehalt an Östradiol und Testosteron [pg/ml] der Muttertiere an PND 0 (Mittelwerte  $\pm$  SF), n = 3/Gruppe.

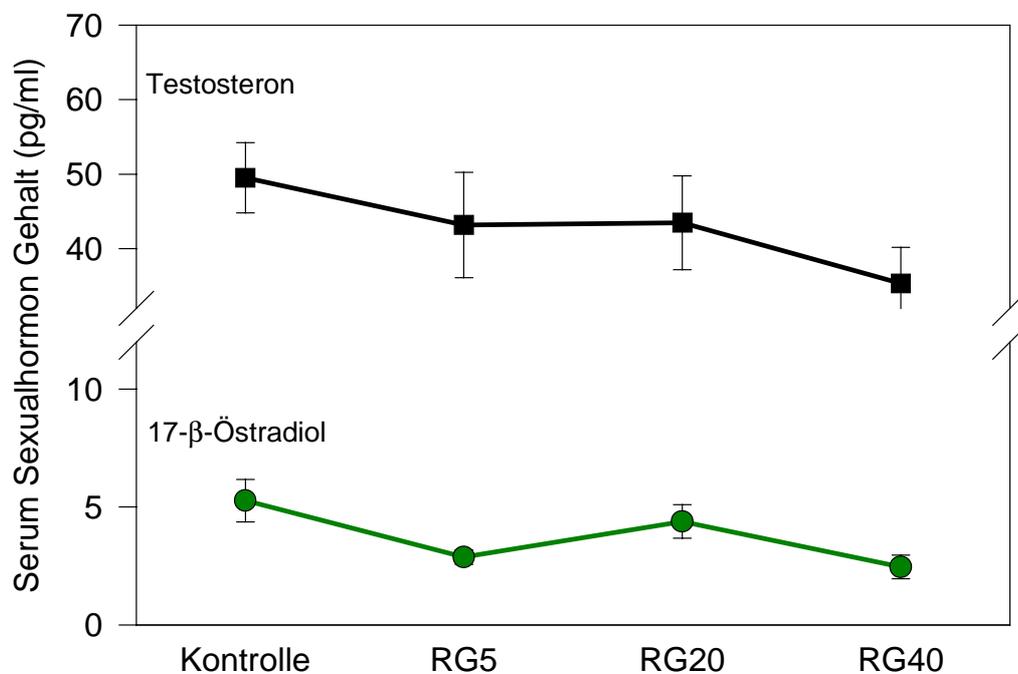


Abb.36: Serum Sexualhormon Gehalt an Östradiol und Testosteron [pg/ml] der Muttertiere an PND 21 (Mittelwerte  $\pm$  SF), n = 3/Gruppe.

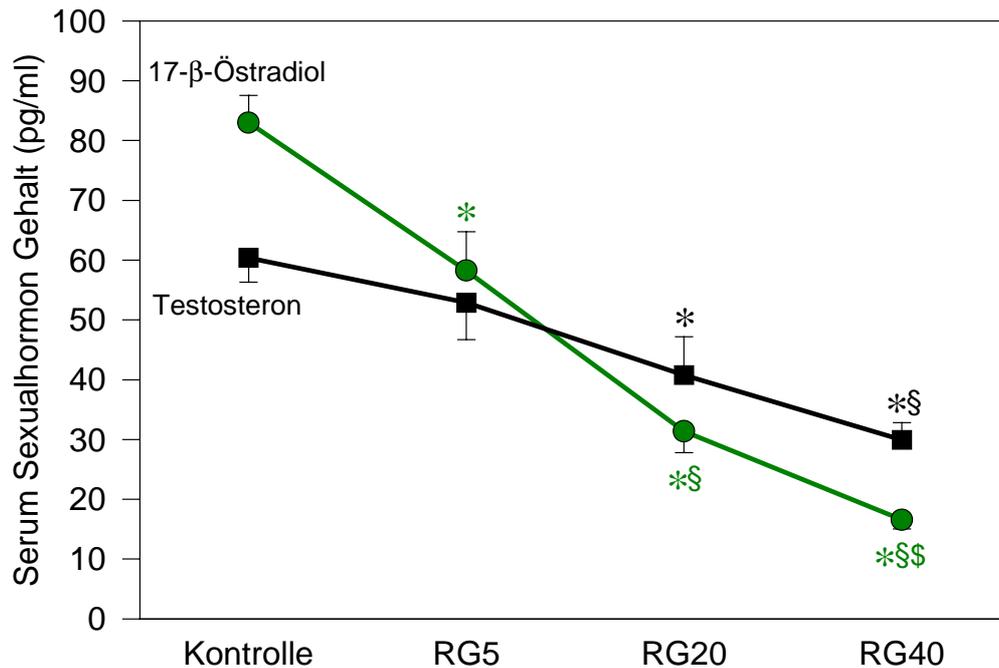


Abb.37: Serum Sexualhormon Gehalt an Östradiol und Testosteron [pg/ml] der weiblichen Nachkommen an PND 21 (Mittelwerte  $\pm$  SE). \*  $p < 0.05$  vgl. zur Kontroll-Gruppe; §  $p < 0.05$  vgl. zur RG5-Gruppe; \$  $p < 0.05$  vgl. zur RG20-Gruppe.  $n = 4-8$ /Gruppe.

Die Ergebnisse der Hormonmessung für Testosteron der adulten männlichen Nachkommen belegen eine langanhaltende Veränderung bei den maternal belasteten Tieren. Auch bei den adulten Rattenböcken ist die Serumkonzentration von Testosteron dosisabhängig reduziert (Abb.38). Der Testosterongehalt der RG40-Gruppe an PND 310 entspricht nur 30% des Wertes aus der Kontrollgruppe. In den anderen Belastungsgruppen RG5 und RG20 sind die Testosteronkonzentrationen um 34% bzw. 37% reduziert [ $F(1,28)=15.33$ ;  $p < 0.0005$ ].

Die reduzierten Testosteronkonzentrationen sind im Vergleich zur Kontrolle signifikant für die RG5-Gruppe [ $F(1,28)=4.03$ ;  $p < 0.06$ ], die RG20-Gruppe [ $F(1,28)=4.84$ ;  $p < 0.05$ ] und die RG40-Gruppe [ $F(1,28)=16.52$ ;  $p < 0.0005$ ].

Ein Teil der Meßwerte in der RG40-Gruppe lag unterhalb der Bestimmungsgrenze. In diesen Fällen wurde die Bestimmungsgrenze als „größtmöglicher Meßwert“ festgelegt, so dass die realen Reduktionen möglicherweise noch deutlicher sind.

Die Serum-Östradiol-Konzentration der adulten männlichen Ratten lag unterhalb der Bestimmungsgrenze von 2.5pg/ml.

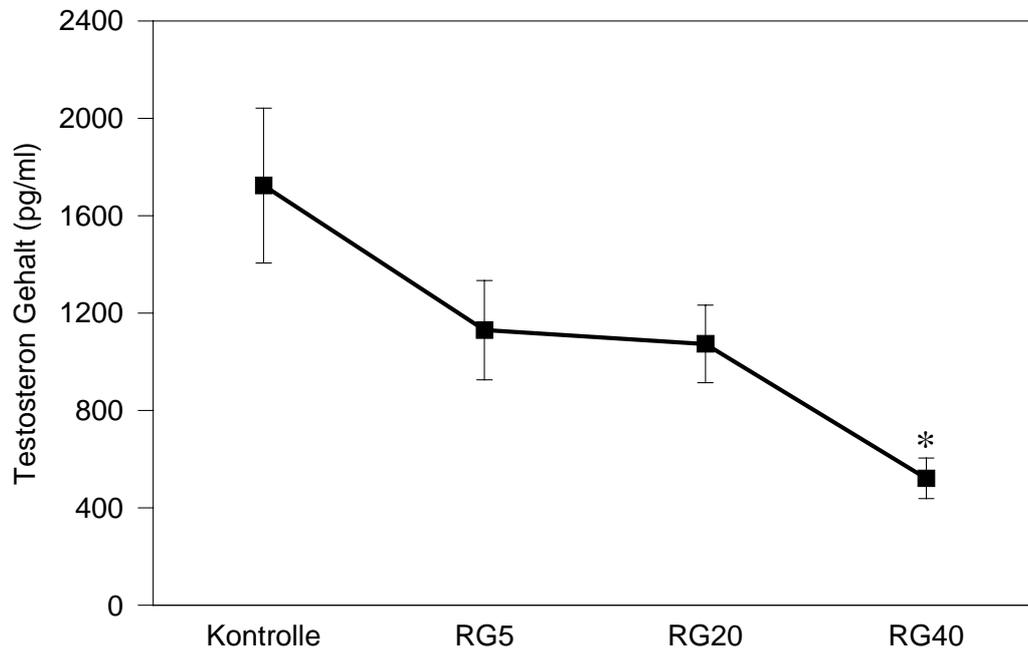


Abb.38: Serum Testosteron Gehalt [pg/ml] der adulten männlichen Tiere an PND 310 (Mittelwerte  $\pm$  SF), n = 8/Gruppe, \* p < 0.05 vgl. zur Kontroll-Gruppe.

## 5. Diskussion

### 5.1 Körperliche Entwicklung

Bei den mit dem PCB-Gemisch belasteten Muttertieren und den maternal belasteten Nachkommen wurden keine akut toxischen Effekte oder äußerlich erkennbaren toxischen Symptome festgestellt. Der Wurftermin, die Wurftrate und die Sterberate in der Säugephase der Kontrolltiere entsprach dem Erwartungswert für diesen Rattenstamm.

Die Wurfgröße der belasteten Gruppen zeigte einen linearen Dosiswirkungszusammenhang. Vor allem in der höchsten Belastungsgruppe ist die durchschnittliche Nachkommenzahl pro Wurf im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Auffällig war auch, daß die Wurfgröße in der RG 40 niedriger war als die Anzahl der Implantationsstellen. Es ist anzunehmen, daß die bei der Geburt totgeborenen Nachkommen von den Muttertieren gefressen wurden. Das Individualgewicht zum Zeitpunkt der Geburt wurde von der PCB-Belastung nicht beeinflusst. Signifikante Unterschiede gab es jedoch bei der Gewichtszunahme der belasteten Nachkommen. Untersuchungen, bei denen Ratten mit koplanaren PCB und technischen PCB-Gemischen belastet wurden (Chou, et al., 1979; Safe et al., 1990; Goldey et al., 1995), zeigten ebenfalls eine PCB-induzierte Körpergewichtsreduktion und eine erhöhte Sterblichkeit und spiegeln die Entwicklungstoxizität der PCB wieder. Auch in prospektiven Humanstudien gibt es eine Assoziation zwischen pränataler PCB-Hintergrundexposition, reduziertem Geburtsgewicht, Körpergewichtesreduktion und späteren Verhaltenseffekte bei Kindern (Patandin et al., 1998, Rylander et al. 1998, Fein et al., 1984; Jacobson et al., 1990, Hagmar et al., 1995; Koopman- Esseboom et al., 1996). Somit scheinen PCB einen allgemeinen Einfluß auf die körperliche Entwicklung zu haben, insbesondere auf das Körpergewicht.

Die unterschiedliche Zusammensetzung der in Tierversuchen eingesetzten PCB-Gemische führt zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse. So wurde in einer früheren Untersuchung mit maternal belasteten Wistar Ratten (30 mg/kg des technischen PCB-Gemisches Clophen A30, 42% Chlorgehalt), keine veränderten Gewichte, Wurfgrößen oder Einschränkungen in der körperlichen Entwicklung im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet. Jedoch waren verschiedene Verhaltensparameter verändert (Lilienthal et al., 1990).

In der höchsten Belastungsgruppe war das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Tieren mit 45% zu 55% umgekehrt, blieb aber statistisch unterhalb der Signifikanzgrenze. In einem früheren Versuch, in dem Wistar-Ratten mit dem koplanaren PCB 77 belastet wurden, trat ebenfalls eine Umkehr des Geschlechterverhältnisses der Nachkommen auf, wobei auch hier der erhöhte Anteil der weiblichen Tiere nicht signifikant war.

## 5.2 Innere PCB-Belastung

Die innere PCB-Belastung der Muttertiere als auch der Nachkommen zeigt zur Geburt und am Ende der Säugephase einen linearen Zusammenhang zur verfütterten Dosis. Dies wurde durch PCB-Messungen von Gehirn- und Fettgewebeproben belegt.

Die PCB-Konzentrationen im Gehirn von Muttertieren und Nachkommen sind zum Zeitpunkt der Geburt annähernd gleich. Im Gehirn der Muttertiere fallen die PCB-Werte während der Stillperiode um mehr als 50% ab, während sie bei den Nachkommen ansteigen. Die Muttertiere reduzieren somit durch die Muttermilch ihre PCB-Belastung, während für die Nachkommen die PCB-Exposition weiter anhält. Die Abbaurate der PCB ist im Gehirn der Muttertiere höher als im Fettgewebe. Dies unterstützt die Vermutung, daß die PCB im Gehirn beweglicher sind als im Fettgewebe und deckt sich mit der Beobachtung, daß nach Beendigung der PCB-Exposition zur Wurfzeit die PCB im Gehirn der Muttertiere während der Säugephase schneller abnehmen als im Fettgewebe (Lilienthal et al., 2000). Bei Menschen ist bekannt, daß durch eine dreimonatige Stillzeit mit täglich ca. 700 ml Milch je nach Substanz ca. 10-30% der im Körper gespeicherten Rückstände ausgeschleust werden (Georgii et al., 1988).

Durch einen technischen Fehler konnten an PND 21 keine PCB-Konzentrationen im Fettgewebe der Nachkommen aus der RG05 und RG20 Gruppe analysiert werden. In der höchsten Belastungsgruppe lag die PCB-Konzentration im Fettgewebe bei 60,08 µg/g und war damit 5-fach niedriger als bei den Muttertieren. Bei den adulten Nachkommen konnten die PCB in Gehirn und Fettgewebe immer noch im Alter von PND 250 nachgewiesen werden. Die PCB-Belastung der RG40 Gruppe hatte sich bis zum adulten Stadium im Fettgewebe um das 6-fache reduziert. Im Vergleich hierzu war die PCB Konzentration im Gehirn der Nachkommen der RG20 und RG40 Gruppe um das 170- bzw. 60-fache abgefallen. In der niedrigsten Belastungsgruppe konnten im Gehirn keine PCB nachgewiesen werden. PCB sind plazentagängig, aber nur ein geringer Anteil des mütterlichen PCB-Körper-Gehaltes wird über die Nabelschnur an die Nachkommen weitergegeben. Der PCB-Anteil, der beim Stillen übertragen wird, ist erheblich höher. Bei Ratten geht weniger als 1 Promille der an die Muttertiere verabreichten PCB auf die Feten über. Der PCB-Anteil beim Stillen beträgt etwa 2-5%. Die PCB-Konzentration im Gehirn von gesäugten Jungtieren ist um den Faktor 3,5 höher als bei Neugeborenen (Shain et al., 1986).

Die Serum-PCB-Konzentration von länger als 4 Monate gestillten Kindern (Median 1,77ng/ml) ist mit 42 Monaten 5 mal höher als die PCB-Konzentration nicht gestillter Kinder (Median 0,36ng/ml) (Walkowiak et al., 2001). In dieser Studie von Walkowiak et al. wurde erstmalig

gezeigt, das auch die durch die Stilldauer erhöhte PCB Zufuhr für eine bis zum 42. Lebensmonat andauernde Entwicklungsverzögerung entscheidend ist. Die mentale und motorische Entwicklung der 7 bis 42 Monate alten Kinder korreliert signifikant negativ mit der PCB-Konzentration in der Muttermilch, nicht aber mit dem PCB-Gehalt im Nabelschnurblut. Die PCB-Konzentration im Nabelschnurblut betrug im Median 0,39ng/ml und in der Muttermilch im Median 404ng/g Fett.

## **5.3 Verhaltensversuche**

### **5.3.1 Open field**

Das gesteigerte Explorationsverhalten der PCB-belasteten adulten Nachkommen war dosisabhängig. Auch im Hinblick auf das Angstverhalten zeigten die belasteten Gruppen eine dosisabhängige Veränderung. Hierbei zeigte sich die erhöhte Anzahl der Boli bereits bei den Jungtieren. Die Anzahl der Boli ist ein Maß für die Emotionalität und insbesondere die Ängstlichkeit der Tiere. Die erhöhte Anzahl der Boli der RG40-Gruppe gibt die vermehrte Angst der Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren wieder.

In Übereinstimmung mit der erhöhten Ängstlichkeit der PCB-belasteten Tiere, die frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bestätigen, halten sich die PCB-belasteten Tiere auch vermehrt in der äußeren Zone des open field auf. Der hell erleuchtete oktagonale Raum des open field stellt für die Tiere einen aversiven Reiz dar, so daß sich ängstliche Tiere vermehrt in der äußeren Zone, entlang der Wände aufhalten

Im Bezug auf die lokomotorische Aktivität zeigten die Jungtiere eine dosisabhängige Steigerung mit signifikanten Unterschieden zwischen der Kontrollgruppe und der höchsten Belastungsgruppe. Diese Steigerung der Gesamtaktivität der Jungtiere bleibt im adulten Stadium unterhalb der Signifikanzgrenze. Aus der Literatur ist bekannt, daß die lokomotorische Aktivität von Ratten im Alter physiologisch abnimmt (Valle, 1971, Willig et al., 1987).

Weibliche Ratten sind im open field normalerweise aktiver als männliche Ratten. Eine Ovariectomie im Alter von PND 1 oder PND 8 reduziert die Aktivität der weiblichen Tiere auf den Level von männlichen Tieren (Denti et al., 1975, Stewart et al., 1980). Eine spätere Östradiol-Substitution bewirkt bei einer niedrigen Dosis eine erhöhte, aber bei einer hohen Dosis Östradiol eine erniedrigte Aktivität der weiblichen Tiere. Hieraus schlossen Stewart und Cygan (1980), daß der neonatale Hormonstatus über das open field Verhalten im adulten Stadium entscheidet. Schilddrüsen-Hormonstatus und Neurotransmitter-Konzentrationen sind ebenfalls

für Aktivitätsunterschiede im open field verantwortlich. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe führte die Exposition von Ratten mit dem Thyreostatikum Propylthiouracil (PTU) zu einer Aktivitätserhöhung der Jungtiere an PND 18 (Weinand-Härer, 1996). Dies steht im Einklang mit Aktivitätserhöhungen bei einer Hypothyreose (Akaike et al., 1991; Darbra et al., 1995).

An CD-1 Mäusen, die vom Gestationstag 10 bis 16 mit 32 mg koplaren 3,3',4,4'-tetrachlorierten Biphenyle (PCB 77) pro kg KG belastet wurden, konnte das erhöhte Aktivitätsniveau und die neuromuskuläre Dysfunktion mit reduziertem Dopamin und Dopamin-Rezeptoren im Striatum in Verbindung gebracht werden (Tilson et al., 1979; Agrawal et al., 1981). Es gibt somit Zeitfenster in der Entwicklung, die besonders sensitiv auf eine Störung reagieren und in denen durch einen Eingriff langfristiger Schaden gesetzt wird. Die Erhöhung der lokomotorischen Aktivität war langanhaltend und wurde noch 1 Jahr nach pränataler Exposition beobachtet. Im Gegensatz hierzu wird berichtet, daß PCB bei Affen in früheren Entwicklungsstadien die Aktivität anhebt, in den späteren adulten Phasen jedoch reduziert (Bowmann et al., 1981).

### **5.3.2 Passive Vermeidung**

Die passive Vermeidung ist ein Verhaltenstest zur Überprüfung von emotionalen Komponenten des Verhaltens und hängt primär von Funktionen der Amygdala ab. Dieser Verhaltenstest erwies sich als besonders sensitiv für die PCB-Belastung, da bereits bei der niedrigsten Expositionsgruppe signifikante Veränderungen der Latenz auftraten ( $p < 0.05$ ).

Es zeigte sich ein signifikanter Behandlungseffekt über alle Gruppen. Die Verweildauer auf der Plattform war zu den Meßzeitpunkten 5 min. ( $p < 0,01$ ) und 4 Stunden ( $p < 0,05$ ) nach dem Konditionierungsdurchgang vermindert. Die Streuung innerhalb der Belastungsgruppen war zu allen Meßzeitpunkten sehr hoch. Neben einer verschlechterten Lernfähigkeit können auch PCB-bedingte Veränderungen der sensomotorischen Fähigkeiten (Schmerzempfinden) oder eine höhere Schmerzschwelle ein Grund für die Verhaltensänderungen (Schocktoleranz und verkürzte Latenz) in diesem Versuch sein. Die Ergebnisse aus der passiven Vermeidung bestätigen frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen koplare Kongenere zu Veränderungen des Vermeidungslernens durch eine Verkürzung der Latenz führten (Weinand-Härer et al. 1997).

### 5.3.3 Katalepsie

In der vorliegenden Arbeit konnten in den Positionen „Gitter“ und „Stange“ keine signifikanten Behandlungseffekte beobachtet werden. Dagegen zeigte sich in der Position „Box“ ein PCB-Effekt. Der D<sub>2</sub>-Rezeptorenblocker Haloperidol wurde in einer Dosis von 0,25 mg/kg KG intraperitoneal injiziert. Zu einem früheren Zeitpunkt wurden adulte Tiere (PND 100) mit einer Haloperidol-Dosis von 3 mg/kg KG getestet. Da die in diesem Test eingesetzten Tiere mit PND 300 etwas älter waren als die ältesten Tiere, mit denen der Versuch bisher durchgeführt wurde, ist die eingesetzte Haloperidol-Dosis auf 0.25 mg/kg KG herabgesetzt worden. Die maximale Verweildauer in einer Position, aus der die Ratte nach Beendigung der Bewegungsstarre herauskommen sollte, wurde auf 3 Minuten festgelegt. Die vorgegebene Maximalzeit wurde von allen Gruppen fast vollständig ausgenutzt, was auf eine eventuell zu hohe Haloperidol-Dosis schließen läßt.

Dem Katalepsie-Test liegen dopaminerge und serotonerge Wirkmechanismen zugrunde (Wadenberg, 1996). So konnte gezeigt werden, das ein Serotonin-1A-Agonist die durch D<sub>2</sub> Agonisten ausgelösten kataleptischen Zustände beeinflussen kann (Wadenberg, 1996). Es ist bekannt, dass ortho-chlorierte PCB den Dopaminspiegel des Striatums und anderer Gehirnregionen in „in vivo Versuchen“ (Seegal et al., 1991) und „in vitro Versuchen“ mit PC12-Zellen senken (Phaeochromozytom-Zellen) (Shain et al., 1991).

In bisherigen Katalepsie-Versuchen unserer Arbeitsgruppe führte das koplanare PCB 77 zu einer Latenzverlängerung in der Position „Gitter“ und „Stange“. Die durch PCB 77 ausgelöste Verlängerung des katatonen Zustandes deutet auf einen erniedrigten Dopamingehalt und eine verringerte Aktivität im Striatum und eine erhöhte Aktivität im medialen präfrontalen Cortex hin (Le Moal et al., 1991; Pycock et al., 1980). Das ortho-chlorierte PCB 47 führte weder alleine, noch in Kombination mit dem PCB 77 zu einem Behandlungseffekt (Weinand-Härer et al. 1997a, Hany, 1998). Das in dieser Studie eingesetzte rekonstituierte Gemisch enthält überwiegend di-ortho und mono-ortho substituierte PCB. Hier wird die unterschiedliche Wirkung der Kongenerenklassen deutlich, wobei im Gemisch die Wirkung der ortho-chlorierten PCB-Kongeneren überwiegt.

### 5.3.4 Ultraschall Vokalisation

Bei der konditionierten Ultraschall Vokalisation wurden „long calls“ gemessen, die Ratten bei Erregungszuständen von sich geben. Diese können sowohl von unangenehmen Reizen (Strom) wie auch von angenehmen Reizen (Paarung) ausgelöst werden. Es wurden signifikante PCB-

bedingte Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen. In der höchsten Belastungsgruppe (RG40-Gruppe) wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe am 1. Tag signifikant weniger konditionierte Vokalisationen gemessen. Diese Veränderung ist möglicherweise Ausdruck einer PCB-bedingten abweichenden Emotionalität (Ängstlichkeit) der Tiere. Alternativ könnte auch eine Einschränkung der sensorischen Fähigkeiten bei der höchsten Belastungsgruppe eine schlechtere Konditionierbarkeit der Tiere bewirken. Die reduzierte Anzahl der Vokalisationen bei der niedrigsten und höchsten Belastungsgruppe am 10. Tag nach der Konditionierung deuten auf ein schlechteres Langzeitgedächtnis dieser Belastungsgruppen hin.

## **5.4 Geschlechtsspezifische Verhaltensversuche**

### **5.4.1 Süßpräferenz**

Exponierte männliche Ratten zeigen im Gegensatz zu weiblichen Ratten eine dosisabhängige Zunahme in der Präferenz für eine Saccharinlösung. Der Wasserkonsum bleibt bei den exponierten männlichen und weiblichen Tieren unverändert. Die Süßpräferenz ist eine sexuell dimorphe Verhaltensweise, weil weibliche Ratten bei freier Wahl zwischen einer süß schmeckenden Lösung und Leitungswasser größere Mengen der süßschmeckenden Lösung konsumieren als männliche Ratten (Valenstein et al., 1967). Somit spricht der höhere Saccharinkonsum der männlichen Ratten für eine Feminisierung. Das Maß der Feminisierung ist durch das Verhältnis der dosisabhängigen Zunahme des relativen Saccharin-Konsums der männlichen Tiere zum Konsum der weiblichen Tiere dargestellt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit unseren früheren Untersuchungen (Hany et al., 1999). Veränderte Süßpräferenz und eine Feminisierung des Verhaltens könnte in Zusammenhang stehen mit einer verminderten Aromatase-Aktivität im Hypothalamus und der präoptischen Region (HPOA) während der perinatalen Phase. In früheren Studien konnten wir zeigen, dass die maternale Exposition mit dem rekonstituierten PCB-Gemisch zu einer deutlichen Reduktion der Aromatase-Aktivität im Hypothalamus und der Präoptischen Region (HPOA) führt (Hany et al., 1999). Eine ähnliche Feminisierung bei der Süßpräferenz wurde auch nach Behandlung mit Nikotin beschrieben, das ebenfalls die frühe postnatale Testosteron-Erhöhung aufhebt (Lichtensteiger et al., 1985) und die perinatale Aktivität der Aromatase reduziert (Von Ziegler et al., 1991). Da angenommen wird, dass Östrogen die männliche Ausprägung des Gehirns induziert (Lephard, 1996), führen verminderte Aromatase Aktivität und damit verminderte Syntheseraten von Östrogen zu einer weiblichen Organisation der HPOA und anderer sexuell dimorpher Gehirnregionen. Die organisatorischen Effekte des Östrogens während der

Entwicklung sind langanhaltend im Gegensatz zu den aktivierenden Eigenschaften im adulten Stadium (Arnold et al., 1985). Somit führt die PCB-induzierte Beeinträchtigung der Maskulinisierung der HPOA sehr wahrscheinlich zu einer Feminisierung des sexuell dimorphen Verhaltens der adulten männlichen Ratten. Ähnliche Verhaltensveränderungen wurden nach der Behandlung von heranwachsenden Ratten mit dem Aromatase-Inhibitor LY43578 gefunden (Gonzalez et al., 1992). Der Mechanismus, durch den PCB mit der Aromatase-Aktivität interferiert, ist noch nicht bekannt. Die Aromatase-Aktivität in der HPOA ist Androgen-abhängig, aber der Faktor, der den perinatalen Peak der Aktivität auslöst und damit vermutlich die Differenzierung des sexuell dimorphen Verhaltens induziert, muß noch aufgeklärt werden (Lephart, 1996). Im Gegensatz zu dem rekonstituierten PCB-Gemisch senkt der Aromatase-Inhibitor LY43578 nicht die Testosteronkonzentration, bewirkt aber dennoch eine Feminisierung des Verhaltens (Gonzalez et al., 1992). Hieraus wird deutlich, dass zusätzlich zu den Testosteron-regulierten Prozessen PCB die Aromatase-Aktivität und die neuronale Differenzierung des sexuell dimorphen Verhaltens über Wirkmechanismen beeinflussen kann, die nicht direkt von der Androgenkonzentration abhängen.

#### **5.4.2 Konditionierte Platzpräferenz**

Im zweiten Verhaltenstest, der „Testosteron konditionierten Platzpräferenz“ bewirkten PCB ebenfalls eine deutliche Verhaltensänderung. Adulte männliche Tiere der höchsten Belastungsgruppe zeigten eine deutliche Präferenz für die mit Testosteron gepaarte Seite der Versuchsbox. Dies deutet auf eine höhere Sensibilität für die belohnenden Eigenschaften des Testosterons hin und steht in Übereinstimmung mit den PCB-Effekten auf die Testosteron-Serumkonzentration, die in dieser Belastungsgruppe am stärksten erniedrigt war. Testosteron scheint ebenso wie synthetische Androgene eine positive Stimulation auf Tiere und Menschen auszuüben (De Beun et al., 1992; Alexander et al., 1994; Lukas, 1996).

Aufgrund der kurzfristigen Wirksamkeit des Testosterons muß ein nicht genomischer Wirkmechanismus angenommen werden (Schroeder et al., 2000). Die Eigenschaften des Testosterons treten in Erscheinung bei deutlicher Überschreitung des physiologischen Testosteron-Spiegels männlichen Ratten von 100-500 ng/100 ml Serum (Taylor et al., 1989). Der Testosteronanstieg erreicht sein Maximum eine Stunde nach Injektion und fällt im Laufe von drei Stunden auf den Ausgangswert zurück (Carr et al., 1989).

Im Gegensatz zu früheren Studien zeigten die Kontrolltiere in dieser Untersuchung keine Reaktion auf das Testosteron. Dies liegt vermutlich am Einsatz niedrigerer PCB-Dosen als in den

Studien von De Beun et al., (1992) oder an der geringeren Sensitivität der Long Evans Ratten im Gegensatz zum Sprague Dawley Stamm, der von Alexander et al. (1994) verwendet wurde. Die affektiven Eigenschaften des Testosteron scheinen vom mesolimbischen dopaminergen System gesteuert zu werden, da die Testosteron-induzierte Platzpräferenz von systemischer (Schroeder et al., 2000) oder lokaler Verabreichung von Dopaminantagonisten in den Nucleus Accumbens (Packard et al., 1998) gehemmt wird. Interessanterweise werden bei Verabreichung von Aromatase-Inhibitoren während der Entwicklung dopaminerge Wege moduliert (Stewart et al., 1994), was mit der bereits beschriebenen Interaktion von Östrogen mit dopaminergen Rezeptoren übereinstimmt (Hruska et al., 1980; Guivarch et al., 1995). Somit können die beobachteten Veränderungen bei der konditionierten Platzpräferenz ein Resultat der perinatalen Beeinflussung in der Östrogenproduktion und eine Störung in der organisatorischen Wirkung des Östrogens im Gehirn sein. Diese Interaktion führt zu permanenten Veränderungen in der Reaktionsfähigkeit des Gehirns auf die belohnenden Eigenschaften des Testosterons. Alternativ könnten PCB Veränderungen der organisatorischen Effekte des Hodens induzieren, die zu langanhaltender Reduktion des zirkulierenden Testosterons führt, was wiederum die Reaktion des Gehirns auf Testosteron beeinflusst. Weiterführende Studien sind nötig, um die Mechanismen aufzuklären, die den beobachteten Effekten in der konditionierten Platzpräferenz zugrunde liegen.

## **5.5 Hormonmessungen**

### **5.5.1 Serumkonzentration von Testosteron und Östrogen**

Die Testosteron- und Östrogen-Konzentrationen sind bei den jugendlichen Weibchen an PND 21 dosisabhängig reduziert. Die PCB-induzierten Effekte auf Testosteron sind langanhaltend, da sie lange nach Beendigung der Exposition auch noch bei männlichen adulten Nachkommen an PND 300 beobachtet werden können. Die prozentuale Reduktion bei männlichen Nachkommen aus der RG40 Gruppe entspricht der früherer Studien (Hany et al., 1999). Im Gegensatz hierzu sind die Hodengewichte in dieser Studie durch die PCB-Exposition nicht verändert worden. Dies verdeutlicht, dass verminderte Testosteron-Konzentrationen nicht unbedingt mit reduzierten Hodengewichten einhergehen. Verminderte Testosteron-Konzentrationen wurden in der Literatur auch bei TCDD-exponierten Chemikararbeitern (Egeland et al., 1994) und belasteten Ratten (Bjerke et al., 1994) beschrieben. Reduzierte Hormonkonzentrationen können durch verminderte Syntheseraten oder einen gesteigerten Metabolismus bedingt sein, wobei beide durch PCB beeinflusst werden können. Für die Synthese von Östrogen aus Testosteron ist eine Aromatase notwendig. Es wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, daß die Aktivität dieser Aromatase bei

exponierten männlichen Nachkommen im Hypothalamus und der präoptischen Region (HPOA) reduziert ist (Hany et al., 1999). Die Aromatase-Aktivität in den Ovarien der Muttertiere bleibt jedoch unverändert, so daß die beobachtete Reduktion der Aktivität vermutlich auf die HPOA beschränkt ist. Dies führt lediglich zu einer lokalen Reduktion des Östrogens, während verschiedene andere Faktoren die Konzentration des zirkulierenden Hormons modulieren. Die Exposition von trächtigen Meerschweinchen mit dem technischen PCB-Gemisch Clophen A50, das in seinem Chlorierungsgrad dem Aroclor 1248 ähnlich ist, führte zu einer erhöhten Exkretion von Östrogensulfat. Dies läßt eine gesteigerte Aktivität von Östrogen-Sulfotransferase vermuten (Lundkvist et al., 1987). Eine erhöhte Aktivität des Enzyms könnte zur Inaktivierung des Östrogens und zu reduzierten Serumkonzentrationen führen. Dieser Effekt kann Kongenerenspezifisch und unterschiedlich zu hydroxylierten PCB-Metaboliten sein, zumal kürzlich bekannt wurde, dass diese Metabolite die Östrogen-Sulfotransferase hemmen (Kester et al., 2000). Da das in dieser Studie verwendete rekonstituierte PCB-Gemisch vor allem stabile Kongenere enthielt, beruht der Netto-Effekt des Gemisches eher auf einer aktivierenden als auf einer hemmenden Wirkung auf die Sulfatierung. Hinzu kommt, dass die Behandlung von MCF-7 Zellen mit TCDD, welches in seiner Wirkung mit koplanaren PCB vergleichbar, aber wesentlich potenter ist, zu reduzierten Östradiol- und Östrogen-Konzentrationen und einem gesteigerten Östrogen-Metabolismus durch Hydroxylierung in der Position 2,4,6 und 15 führte (Spink et al., 1990). Somit kann der gesteigerte Metabolismus zur beobachteten Reduktion der Serum-Östrogen-Konzentration beitragen. Die Untersuchung der Aromatase-Aktivität in den Ovarien von heranreifenden Weibchen wäre sinnvoll. Die Reduktion der Serum-Östrogen-Konzentration kann aber auch bedingt sein durch den reduzierten Gehalt des Vorläufers des Testosteron. Ebenso wie beim Östrogen kann auch die durch Exposition bedingte Reduktion der Testosteron-Konzentration durch eine verminderte Synthese oder einen gesteigerten Metabolismus hervorgerufen werden. Es konnte gezeigt werden, daß Exposition von männlichen Ratten und Meerschweinchen mit Aroclor 1248 beziehungsweise mit Aroclor 1254 durch verminderte Aktivität von  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase,  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und  $17\alpha$ -Hydroxylase/lyase zu reduzierten Testosteron-Konzentrationen führt (Andric et al., 2000, Goldman et al., 1990). Diese Enzyme katalysieren die Umwandlung von Testosteron aus Androstendion ( $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) oder die Synthese des Vorläufers Dehydroepiandrosteron ( $17\alpha$ -Hydroxylase/lyase) und Androstendion ( $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase). Der Androgen-Metabolismus wird ebenfalls durch PCB beeinflusst. Exposition von adulten Ratten mit dem koplanaren 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (PCB 169) führte zu

einer gesteigerten Aktivität von CYP2A1-abhängigem Androgen, 7 $\alpha$ -Hydroxylase und CYP2C11-abhängiger 2 $\alpha$ -Hydroxylase und 16 $\alpha$ -Hydroxylase in der Leber, begleitet von reduzierten Serum-Testosteron-Konzentrationen (Yeowell et al., 1987, Yeowell et al., 1988). Exposition von männlichen Ratten in der Neugeborenenperiode mit Aroclor 1254 führt zur gesteigerten Aktivität zahlreicher Androgen-Hydroxylasen in der Leber, die im Alter von 120 Tagen immer noch nachweisbar sind, was vermuten läßt, daß die Exposition in den frühen Entwicklungsstadien einen prägenden Einfluß ausübt (Haake-McMillan et al., 1991). In der jetzigen Studie konnte die nach der Behandlung in den frühen Entwicklungsstadien beobachtete Reduktion des zirkulierenden Testosteron auch im adulten Stadium im Alter von PND 300 nachgewiesen werden. Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß durch die Exposition in der juvenilen Entwicklungsphase PCB-induzierte Effekte auf die Synthese und den Metabolismus von Sexualsteroiden die Hormonkonzentration der männlichen Ratten langanhaltend bis ins adulte Stadium verändern.

## 5.6 Sexualhormone und Gehirnentwicklung

Sexualhormone sind während der Ontogenese an der neuronalen Entwicklung und der geschlechtsspezifischen Organisation des Gehirns beteiligt, die zur sexuellen Differenzierung des Gehirns beitragen (McEwen, 1994). Neben diesen morphologisch manifesten Veränderungen führen auch permanent erniedrigte Hormonkonzentrationen zu einem gestörten geschlechtstypischen Verhalten. Die Rolle der Östrogenrezeptoren bei der sexuellen Differenzierung des Gehirns wird zur Zeit intensiv erforscht. Ein möglicher Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen ist die Fähigkeit der PCB, in der pränatalen Gehirnentwicklung das endokrine System zu beeinflussen und dadurch längerfristige neurochemische und neuronale Grundlagen des Verhaltens festzulegen. Die hormonartige Wirkung vieler PCB ist sowohl in Human-Studien als auch mit tierexperimentellen Daten belegt. Einige PCB-Kongenere, überwiegend die di- und höher ortho-substituierten PCB und hydroxylierte Metabolite, besitzen eine östrogene Aktivität (Connor et al., 1997, Fielden et al., 1997). Dagegen wirken die planaren non- und mono-ortho-substituierten PCB (PCB 105) ähnlich wie polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF) antiöstrogen (Jansen et al., 1993; Krishnan and Safe 1993). Einige Wirkungen werden nicht durch den Östrogen-Rezeptor, sondern durch Ah-Rezeptoren vermittelt (z.B. einige Dioxine wie 2,3,7,8,TCDD) (White et al., 1993). Somit können auch die koplanaren Kongenere über Ah-Rezeptoren vermittelt eine östrogenartige Wirkung entfalten. In Säugetieren und beim Menschen ist die Situation

komplex, da antiöstrogen wirkende mono-ortho PCB zu östrogen wirkenden mono-Hydroxy-PCB metabolisiert werden können, die im Blut eine hohe Retention aufweisen (Korach et al. 1988).

Die Affinität des Östrogen-Rezeptors ist für östrogenartige PCB sehr viel geringer als für endogenes 17- $\beta$ -Östradiol (Korach et al., 1988). PCB binden aber nicht an Östrogen-bindende Plasmaproteine, die den Einstrom endogener Hormone in die Zelle regulieren (Ekins, 1990). Sie haben somit bei gleicher Serumkonzentration eine größere biologische Wirkung, weil sie ungehindert Plasmamembranen passieren können. Natürlich vorkommende Steroide binden an Carrier-Proteine wie das Corticosteroid bindende Protein (CBG), das alpha-Fetoprotein (AFP) und das Sexualhormonbindende Protein (SHBP). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle beim limitierten Zugang dieser Stoffe in das Gehirn (McEwen, 1994). So schützt AFP neugeborene Rattenjungen vor dem natürlichen Östrogen in der Muttermilch. Östrogene wie Diethylstilbestrol und Moxestrol, die nicht an AFP binden, gewinnen Zugang zu neuronalen Östrogen-Rezeptoren und feminisieren das Gehirn (McEwen, 1975).

Zusätzlich gibt es in der Literatur Befunde darüber, daß PCB den Metabolismus von Steroidhormonen beschleunigen und auch dadurch den Hormonhaushalt stören können (Paekall, 1967, Risebrough et al., 1968).

Ein wichtiges aber schwierig zu untersuchendes Problem stellen Kombinationseffekte z.B. in Hinblick auf die Östrogenwirkung dar. Li und Hansen haben gezeigt, daß ein Gemisch aus Umweltproben mit PCB, PCDF und PCDD eine Vielzahl von Reaktionen in juvenilen Ratten hervorruft, die durch die Wirkung einzelner Komponenten nicht belegt werden können (Li et al., 1996). Viele östrogenartig wirkende Umweltschadstoffe haben mindestens eine um eine Zehnerpotenz geringere Östrogenwirkung als endogenes 17- $\beta$ -Östradiol. Somit ist jeder Einzelstoff für sich betrachtet in niedrigen Konzentrationen mit hoher Wahrscheinlichkeit tolerabel, aber ob dies auch für die Gesamtheit dieser Stoffe in ihrer Summation zutrifft, ist eine offene Frage. Dies gilt besonders für sensible Lebensphasen, wie die Embryonalphase, in der die sexuelle Differenzierung erfolgt, und die Kindheit, in der die körpereigenen Hormonspiegel sehr niedrig sind (Bern, 1992, Klein et al., 1994). In vivo Studien mit PCB von Bergeron zeigten, daß die Kombination von östrogenartig wirkenden Komponenten zu einer relevanten additiven und vielleicht möglichen synergistischen Wirkung führen können. In ihrer Studie konnten sie zeigen, daß die Exposition von PCB-Konzentrationen unter der Schwellendosis von geschlechtumkehrender Wirkung bei Schildkröteneiern dennoch zu einem

geschlechtumkehrenden Effekt führte, wenn die unterschweligen PCB kombiniert eingesetzt wurden (Bergeron et al., 1994).

Die unter sehr hohen Dosierungen im Tierversuch nachweisbaren systemischen Wirkungen (Wurfgröße, Sexualverhalten, Fertilitätsstörungen, Teratogenität, Störung der Embryogenese, Verweiblichung) lassen noch keine Aussage zum Verhalten dieser Stoffe bei umweltrelevanten Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen im Organismus zu.

Zur PCB-Messung in Umweltproben werden die PCB 28, 52, 101, 138, 153 und 180 als die 6 Indikator-Kongeneren analysiert. Aus analytischen Gründen werden für die Referenzwerte in humanen Gewebeproben nur die 3 höher chlorierten PCB 138, 153 und 180 als Marker für die PCB Belastung von Vollblut und Muttermilch analysiert. Diese Kongenere machen ca. 60% des PCB Gehaltes in menschlichen Gewebeproben aus.

Aktuelle Studien liefern neue Daten zur PCB-Hintergrundbelastung der Menschen in Deutschland (Walkowiak et al., 2001; Ewers et al., 1999, Lackmann, 2002). Verglichen mit der fettbezogenen PCB-Hintergrundbelastung des Menschen sind die Ratten aus der höchsten Expositionsgruppe in dieser Arbeit um den Faktor 100 bis 200 stärker mit PCB belastet. Die Konzentrationen im Fettgewebe der niedrigsten Expositionsgruppe, die auch schon Veränderungen in der Hormonkonzentration und ein verändertes Trinkverhalten im Saccharintest aufwies, sind jedoch nur noch 10-fach höher als die humanen PCB-Werte an der oberen Grenze der Belastung ( $\geq 95\%$  Perzentile).

## **5.7. Toxikologische Bewertung**

### **5.7.1 Toxizitätsäquivalenzfaktor (TEF)**

Der Toxizitätsäquivalenzfaktor ist im Laufe der 90er Jahre für die dioxinähnlichen PCB eingeführt worden. Die Toxizität der einzelnen PCB-Kongenere wird hierbei relativ zum 2,3,7,8 TCDD gewichtet (Safe, 1990, Ahlborg et al., 1992). Der TEF basiert auf vergleichenden Daten aus Teratogenitäts- Reproduktions- und subchronischen Studien. Das Konzept der Toxizitätsäquivalenzfaktoren für PCB beruht aber auf dem gemeinsamen Wirkmechanismus der PCB und der PCDD/F an den Ah-Rezeptoren und der additiven Wirkung der PCB-Kongenere. Diese Voraussetzungen treffen jedoch nicht auf alle PCB-Kongenere zu. Die TEF-Werte berücksichtigen auch nicht die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Tierarten, so daß Vergleiche nur eingeschränkt möglich sind.

### **5.7.2 Referenzwerte für PCB**

Die Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamtes Berlin definiert den Referenzwert als einen Wert (95. Perzentil), der aus einer Reihe von Meßwerten der Stoffkonzentration in der jeweiligen Matrix (z.B. Blut, Haar, Urin) einer Stichprobe aus einer definierten Bevölkerungsgruppe nach einem vorgegebenen statistischen Verfahren abgeleitet wird. Der Referenzwert ist ein rein statistisch ermittelter Wert und charakterisiert den Ist-Zustand (sog. Hintergrundbelastung) eines ubiquitär vorkommenden Stoffes bei einer Bevölkerungsgruppe ohne erkennbare spezifische Belastung zum Zeitpunkt der Untersuchung. Da es sich um einen rein statistisch abgeleiteten Wert handelt, kommt ihm per se keine gesundheitliche Bedeutung zu. Bislang werden 6 Indikator-PCB-Kongenere (28, 52, 101, 138, 153 und 180) analysiert, aus denen durch Hochrechnung (Multiplikation mit dem Faktor 5) der sogenannte Gesamt PCB-Gehalt geschätzt wird (Bundesgesundhbl. 11/90). Dieses Verfahren berücksichtigt verstärkt die Verbindungen, die sich bevorzugt im Fettgewebe anreichern. Die Werte für die drei PCB-Kongenere 28, 52 und 101 liegen allerdings oft unterhalb der Nachweisgrenze.

Frauenmilch ist eine besonders fettreiche Körperflüssigkeit und kann daher als ein Bioindikator für die Kontamination des menschlichen Organismus mit lipophilen und persistenten Verbindungen angesehen werden. Aus der Summe von drei Indikator PCB-Kongeneren (138, 153 und 180) wird nach Schulte und Malisch mit dem Faktor 1,64 der Gesamt PCB-Gehalt für Frauenmilch berechnet (Schulte et al., 1984). Der mittlere Gesamt PCB-Gehalt in Frauenmilch in den alten Bundesländern betrug 1990 0,93 mg/kg Fett und 1994 0,55 bis 0,88 mg/kg Fett Gesamt PCB. Im Vergleich mit den Daten aus der DFG-Studie von 1979 bis 1981 sind die PCB-Werte um 60% gesunken (Vieth et al., 1996).

Die Stillempfehlung der Nationalen Stillkommission betont 1995 in Übereinstimmung mit der WHO und der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, daß im Hinblick auf die Rückstände an PCB und Dioxin in Muttermilch keinerlei Einschränkungen des Stillens abzuleiten sind (WHO, 1988, DGPT Mitteilungen Nr. 10, 1992). Mit dieser Empfehlung wurde die erste gesundheitliche Bewertung der DFG-Senatskommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln korrigiert, wonach der Nutzen des Stillens für die Entwicklung des Kindes höher einzuschätzen ist als ein möglicherweise vorhandenes, durch die Rückstände an Organochlorpestiziden und PCB bedingtes Risiko (DFG-Mitteilung XII, 1984).

Im Lichte neuester Untersuchungen zur Entwicklung von Kindern unter PCB-Belastung muss die uneingeschränkte Empfehlung des Stillens allerdings relativiert werden, da auch postnatale Einflüsse bei bestehender Hintergrundbelastung beobachtet wurden (Walkowiak et al., 2001)

**Tab. 2:** Referenzwerte für PCB-Indikatorkongenere 138, 153 und 180 und ihrer Summe im Human-Vollblut ( $\mu\text{g/l}$ ). Schätzwert des 95. Populationsperzentils mit 95-%-Konfidenzintervall bei Annahme einer Lognormalverteilung. Empfehlung der Kommission HBM des UBA.

Lebensalter	PCB 138	PCB 153	PCB 180	$\Sigma$ PCB
7-10	0,5	0,5	0,3	1,3
18-25	0,5	0,7	0,4	1,4
26-35	0,8	1,3	0,8	2,7
36-45	1,2	1,9	1,3	4,1
46-55	1,6	2,5	1,9	5,7
56-65	1,9	3,0	2,1	6,8
66-69	2,3	3,5	2,6	8,3

**Tab. 3:** Referenzwerte für PCB-Indikatorkongenere 138, 153 und 180 und ihrer Summe in Frauenmilch basierend auf Daten von 1994, n= 1757)(mg/kg Fett), Empfehlung der Kommission HBM des UBA.

Rückstand	Referenzwert (mg/kg Fett)
PCB 138	0,3
PCB 153	0,3
PCB 180	0,2
Gesamt PCB	1,2
$\Sigma$ PCB	0,8

### 5.7.3 „Human-Biomonitoring-Werte“

Die Ableitung von „Human-Biomonitoring-Werten“ (HBM-Werte) für eine Einzelsubstanz setzt Kenntnisse über gesundheitsrelevante biologische Wirkungen des Stoffes voraus. Der HBM-I-Wert entspricht der Konzentration eines Stoffes in einem Körpermedium, bei dessen Unterschreitung nicht mit einer gesundheitlichen Beeinträchtigung zu rechnen ist und somit kein Handlungsbedarf besteht. Der HBM-II-Wert entspricht der Konzentration eines Stoffes in einem Körpermedium, bei deren Überschreitung eine für die Betroffenen als relevant anzusehende gesundheitliche Beeinträchtigung möglich ist und eine umweltmedizinische Beratung der Betroffenen mit dem Ziel der Minderung der Belastung zu veranlassen ist.

Die Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes sieht nicht die Möglichkeit, Human-Biomonitoring-Werte (HBM-Werte) für PCB-Kongenere abzuleiten, weil die derzeitige

Datenlage keine ausreichende umweltmedizinisch-toxikologische Interpretation der Blutkonzentrationen von PCB-Kongeneren erlaubt.

## 5.8. Umweltmedizinische Relevanz

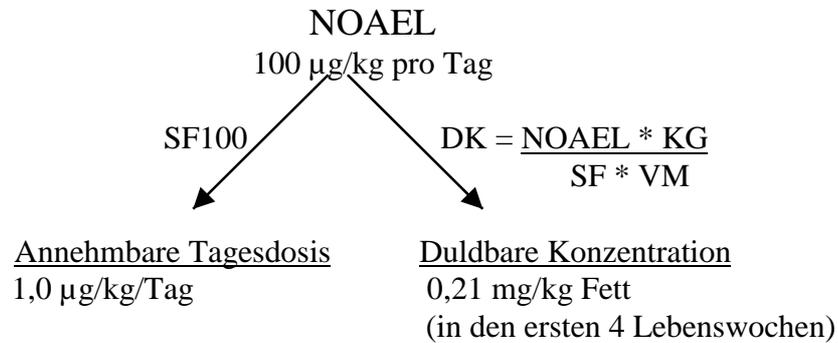
Das Umweltbundesamt und das Bundesgesundheitsamt befassen sich seit 1983 mit der gesundheitlichen Bewertung des Expositionsrisiko des Menschen mit PCB.

Das BGA hat 1983 im Sinne des vorbeugenden Gesundheitsschutzes eine Bewertung der PCB-Belastung vorgenommen. Danach wurde als vorläufiger Wert für eine lebenslange Aufnahme eine tägliche tolerierbare Menge (TDI) von 1 µg PCB bis maximal 3 µg PCB/kg KG und Tag vorgeschlagen (Lorenz und Neumeier, 1983).

Das Hauptproblem bei der Beurteilung einer Umweltchemikalie, die im Tiermodell untersucht wurde, ist die Übertragbarkeit tierexperimenteller Befunde auf den Menschen.

Der NOAEL-Wert (no observed adverse effect level) beschreibt die verfütterte Dosis, die im Tierversuch gerade noch keine schädlichen Effekte auslöst und als Grundlage für die Grenzwertableitung dient. Zur Berechnung der annehmbaren Tagesdosis wird er durch einen Sicherheitsfaktor (SF) geteilt. Üblicherweise wird ein Sicherheitsfaktor von 100 angewandt, der gewährleisten soll, daß die lebenslange, tägliche Aufnahme der so berechneten Stoffmenge bei Menschen mit "großer Zuverlässigkeit" keine wahrnehmbare schädliche Wirkung zur Folge hat. Mit dem ATD-Wert (annehmbare Tagesdosis) können bei Monokost (z.B. Muttermilch) unter Einbeziehung der Verzehrmenge und des Körpergewichtes "duldbare Konzentrationen"(DK) errechnet werden. Der Grenzwert der "annehmbaren Tagesdosis" und der "duldbaren Konzentrationen" lassen sich, wie in Abbildung 4 dargestellt, aus dem "NOAEL" im Tierversuch ableiten. Die Berechnung der duldbaren Konzentration erfolgt unter Einbeziehung der durchschnittlichen Verzehrmenge (Milchfett). Die Grenzwerte werden für Einzelstoffe abgeleitet. Die Belastung durch weitere Schadstoffe wird also hierbei nicht berücksichtigt. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft nennt für PCB einen ATD-Wert (annehmbaren Tagesdosis) von 1,0 µg/kg/Tag, basierend auf einem NOAEL-Wert von 100 µg/kg/Tag (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 1988).

Abb. 4: Ableitung der Grenzwerte der ATD und der „duldbaren Konzentration“ (DK) aus dem NOAEL-Wert im Tierversuch am Beispiel von PCB. KG = mittleres Körpergewicht = 3,7 kg, VM = Verzehrmenge = über die ersten 4 Lebenswochen gemittelte tägliche Aufnahme von Muttermilch, ca. 532 ml mit 18 g Milchfett (Lorenz et al., 1983, DFG, 1988) .



Der Mittelwert der gemessenen Schadstoff Konzentration für PCB liegt mit 0,86 mg/kg Milchfett deutlich über der duldbaren Konzentration von 0,21 mg/kg Milchfett. Die Mittelwerte wurden von 1414 Proben aus Baden-Württemberg von 1991 abgeleitet (Chemische Landesuntersuchungsanstalt Stuttgart: Jahresbericht, 1991). Da sich die duldbare Konzentration aber auf eine lebenslange Aufnahme bezieht und die Stillperiode demgegenüber kurz ist, hielt es die „Kommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln“ bei der DFG „aus toxikologischer Sicht für gerade noch vertretbar“, einen Sicherheitsfaktor von 10 anzuwenden (DFG, 1988). Mit dem Sicherheitsfaktor von 10 erhöht sich die duldbare Konzentration auf 2,07 mg/kg Milchfett. Der TDI-Wert (tolerable tägliche Aufnahme) wird mit 1 µg PCB pro kg und KG angegeben. Bei dieser Berechnung wird allerdings eine höhere Empfindlichkeit im frühen Lebensalter vernachlässigt.

## **5.9. Welche Probleme gibt es bei der gesundheitlichen Beurteilung?**

### **5.9.1 Berücksichtigung von Metaboliten**

Unterschiede in der Ausstattung und der Induzierbarkeit der Cytochrom P-450-Formen können der Grund dafür sein, daß das Muster und die Ausscheidung von PCB-Metaboliten von Spezies zu Spezies deutlich variieren kann. Säugetiere metabolisieren PCB in der Regel schneller als Vögel und diese wiederum schneller als Fische. Unter den Säugetieren metabolisiert der Mensch langsamer als die Labor-Ratte (Matthews et al., 1984).

Bergeron et al. konnten zeigen, daß die hydroxylierten PCB (3OH-PCB und 4OH-PCB) bei der geschlechtlichen Differenzierung von bestimmten Schildkröten (red-eared slider turtles) eine Geschlechtsumwandlung bewirken können (Bergeron et al. 1994). Während der normalen Entwicklung bestimmt die Umgebungstemperatur das Geschlecht der Schildkröten. Eier, die bei 26 oder 31°C inkubiert werden, bringen männliche beziehungsweise weibliche Tiere hervor. Werden aber Eier bei 26°C, also bei einer männliche Tiere hervorbringenden Temperatur, inkubiert und die Eier mit Östradiol bestrichen, so resultiert eine Geschlechtsumwandlung und die Eier bringen weibliche Tiere hervor. Hydroxylierte PCB bewirken ebenfalls diese Geschlechtsumwandlung. In dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, daß die Kombination von östrogenartig wirkenden Komponenten zu einer relevanten additiven und vielleicht möglichen synergistischen Wirkung führen können. Die Exposition von PCB-Konzentrationen unter der Schwellendosis von geschlechtsumwandelnder Wirkung führte dennoch zu einer Geschlechtsumkehr, wenn die unterschwelligen PCB kombiniert eingesetzt wurden (Bergeron et al. 1994).

### **5.9.2 Kombinationswirkung mit andere Kontaminanten**

Additive Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien sind nicht auszuschließen. Als ein Beispiel für dieses Problem haben Li und Hansen gezeigt, das Gemische aus Umweltproben mit PCB, PCDF und PCDD eine Vielzahl von Reaktionen in juvenilen Ratten hervorrufen, die durch die Wirkung einzelner Komponenten nicht belegt werden können (Li et al., 1996).

### **5.9.3 Berücksichtigung der Langzeitaufnahme**

Die Gefahrstoffverordnung stuft die PCB als gesundheitsgefährdend ein. Ihre akute Toxizität gilt als gering. In der MAK-Werte-Liste (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration) werden sie als Stoffe mit möglicher teratogener Wirkung (Einteilung in Gruppe B) und begründetem Verdacht

auf kanzerogenes Potential (Einteilung in Gruppe 3) eingestuft. Die MAK-Werte für chlorierte Biphenyle sind mit  $0,1 \text{ ml/m}^3$  und  $1,1 \text{ mg/m}^3$  für einen Chlorgehalt von 42% festgelegt. Die MAK-Werte für PCB mit einem Chlorgehalt von 54% sind mit  $0,05 \text{ ml/m}^3$  und  $0,7 \text{ mg/m}^3$  festgelegt (DFG, 2002).

Der Mensch ist einer Mischung verschiedener PCB ausgesetzt. Aussagen über Schwellen toxisch wirksamer Dosen im Bereich der normalen Hintergrundbelastung mit gesundheitlichen Langzeiteffekten sind aus Beobachtungen beim Menschen bisher nicht möglich. Eine Einschätzung der Toxizität kann daher nur aufgrund von tierexperimentellen Untersuchungen und unfallbedingten Expositionen im höheren Dosisbereich erfolgen.

Bei den Tierexperimenten muß berücksichtigt werden, daß es auffällige Speziesunterschiede gibt. Primaten erweisen sich bei chronischer Exposition als deutlich empfindlicher für Dioxin und PCB als Nagetiere.

## 5.10 Schwierigkeiten der Risikobewertung

Die wesentlichen entwicklungstoxischen Endpunkte in humanen Studien an Kindern mit PCB, PCDD und PCDF Belastung sind:

1. ein reduziertes Geburtsgewicht (Rogan et al., 1988; Hagmar et al., 1995; Koopman-Esseboom et al., 1996).
2. veränderte Schilddrüsenhormon Konzentration mit reduzierten  $T_4$ - und  $T_3$ - Konzentrationen und erhöhtem TSH (Pluim et al., 1993; Koopman-Esseboom et al., 1994; Murai et al., 1987).
3. eingeschränkte psychomotorische Fähigkeiten (Gladen et al., 1988, Koopman-Esseboom et al., 1996, Winneke et al., 1998, Walkowiak et al., 2001).
4. Defizite in kognitiven Fähigkeiten (Rogan et al., 1988, Jacobson et al., 1985, Chen et al., 1992, Jacobson et al., 1990, Winneke et al., 1998, Walkowiak et al., 2001).

Die Übertragung von Tierversuchen auf den Menschen ist bereits durch markante Speziesunterschiede bei den Tierversuchen erschwert. So erweisen sich Primaten bei chronischer Exposition als deutlich empfindlicher für Dioxin und PCB als Nagetiere. Die Grenzwertableitung aus Tierversuchsdaten ist aus folgenden Gründen problematisch:

1. Die unterschiedliche Toxikokinetik einer Substanz bei Mensch und Tier muß berücksichtigt werden. Dies macht die Messung von Gewebekonzentrationen erforderlich.
2. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zielorgane bei verschiedenen Spezies erfordert die Bestimmung der NOAEL-Werte in den Zielorganen.

3. Beim Menschen muß untersucht werden, ab welcher Schadstoffzufuhr über die Muttermilch die NOAEL-Werte überschritten werden.
4. Eine vergleichende Wertung der zahlenmäßig umfangreichen Studien ist schwierig, da sich die eingesetzten PCB erheblich im Hinblick auf Zusammensetzung (Gemische, Chlorgehalt, Verunreinigung, sterische Anordnung) unterscheiden.

Die einzelnen Verbindungen der Substanzklasse weisen in Tierversuchen zum Teil sehr unterschiedliche toxische Wirkprofile auf. Die verschiedenen Endpunkte der PCB-induzierten Effekte auf das Nervensystem und der in Verhaltensversuchen meßbaren Veränderungen werden durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen ist die Fähigkeit der PCB, in der pränatalen Gehirnentwicklung das endokrine System zu beeinflussen und dadurch längerfristige neurochemische und neuronale Grundlagen des Verhaltens festzulegen. Die hormonartige Wirkung vieler PCB ist sowohl in Human-Studien als auch mit tierexperimentellen Daten belegt.

## 6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die Dosis-Wirkung von maternaler PCB-Exposition bei Ratten auf geschlechtsspezifisches Verhalten, emotionales Verhalten, Lernverhalten und Sexualhormon-Konzentration zu untersuchen. Es wurde ein rekonstituiertes PCB Gemisch eingesetzt, das nach dem Muster der in Muttermilch vorhandenen Kongenere zusammengestellt wurde. Die Versuchstiergruppen wurden pränatal mit drei unterschiedlichen PCB-Konzentrationen belastet (RG05, RG20, RG40).

1. Die Wurfrate war durch die pränatale PCB-Belastung signifikant reduziert (RG 40-Gruppe).
2. Die Sterberate in der Säugephase ist in der RG 20 und RG 40 Gruppe erhöht.
3. Die Gewichtsentwicklung im Verlauf der Säugephase war signifikant dosisabhängig verlangsamt.
4. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der PCB-Konzentration im Futter und der inneren PCB-Belastung der Tiere im Gehirn und im Fettgewebe.

In den Verhaltensversuchen zur Erfassung der emotionalen Komponente zeigten sich signifikante Veränderungen.

5. Adulte Ratten zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhtem Explorationsverhalten und der PCB-Belastung.
6. Eine pränatale Belastung mit dem rekonstituierten PCB-Gemisch steigert bei Jungtieren, nicht aber bei adulten Tieren die lokomotorische Aktivität.
7. Die passive Vermeidung erwies sich als besonders sensitiv zur Erfassung der Emotionalität, da hier Veränderungen bei adulten Tieren bereits in der RG 05-Gruppe und RG 20-Gruppe auftraten.
8. Die Anzahl der konditionierten Vokalisationen war bei adulten Tieren in der RG 05-Gruppe und der G 40-Gruppe reduziert.
9. Im Katalepsie-Versuch war der katatonische Zustand der adulten Tiere aus der höchsten Belastungsgruppe in der Box verkürzt.
10. Adulte männliche Ratten der höchsten Belastungsgruppe zeigen eine Feminisierung ihres Trinkverhaltens in der Süßpräferenz vermutlich als Auswirkung der anti-androgenen Wirkung der PCB und der resultierenden weiblichen Ausprägung des Gehirns. Diese dosisabhängigen Effekte bestätigen bisherige Ergebnisse.

11. Bei der konditionierten Platzpräferenz mit Testosteron wurden bei adulten Tieren in der höchsten Belastungsgruppe die stärksten verhaltenstoxischen Wirkungen beobachtet. Bei Rattenmännchen der höchsten Belastungsgruppe hat das Testosteron die größte positiv affektive Wirkung.
13. Diese Verhaltenseffekte werden durch die Serum-Sexualhormon-Konzentration bestätigt. Testosteron und 17- $\beta$ -Östradiol sind bei jungen weiblichen Tieren dosisabhängig reduziert. Bei adulten männlichen Tieren war die Testosteron Konzentration dosisabhängig reduziert.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Entwicklungstoxizität der PCB in dieser Arbeit zu einer dosisabhängigen reduzierten Wurfrate, verlangsamter geringerer Gewichtsentwicklung, ungleicher Gewichtsverteilung innerhalb der Würfe und einer höheren Sterberate während der Stillperiode geführt hat. Die pränatale Belastung mit dem rekonstituierten PCB-Gemisch führte zu einer lang anhaltenden und dosisabhängigen Veränderung der lokomotorischen Aktivität, der Emotionalität, des Geschlechtshormon-abhängigen Verhaltens und der Sexualhormon-Konzentration.

## 7. Literatur

- Agrawal, A. K., Tilson, H. A., and Bondy, S. C. (1981). 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl given to mice prenatally produces long-term decreases in striatal dopamine and receptor binding sites in the caudate nucleus. *Toxicol. Lett.* 7: 417-424.
- Ahlborg, U. G., Hanberg, A., and Kenne, K. (1992). Risk assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs), Nord 1992: 26, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
- Akaike, M., Kato, N., Ohno, H., and Kobayashi, T. (1991). Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 317-322.
- Alexander, G. M., Packard, M. G., Hines, M. (1994). *Behavioral Neuroscience*, Vol.108, No.2: 424-428.
- Allen, J. R., Barsotti, D. A., (1976). The effects of transplacental and mammary movement of PCBs on infant Rhesus monkey. *Toxicology*, 6: 331-340.
- Andric, S. A., Kostic, T. S., Stijilkovic, S. S., Kovacevic, R. Z. (2000). Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1248. *Biol. Reprod.* 61: 1882-1888.
- Arnold, A. P., Breedlove, S. M. (1985). Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Horm. Behav.* 19(4): 469-498.
- Ballschmiter, K.; Zell, M. (1980). Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius Z Anal Chem* 302: 20-31.
- Barnes, D., Alford-Stevens, A., Birnbaum, L., Kutz, F. W., Wood, W., Patton, D. (1991). Toxicity equivalency factors for PCBs? *Qual. Assur. Good. Pract. Regul. Law* 1: 70-81
- Barsotti, D. A., van Miller, J. P., (1984). Accumulation of a commercial polychlorinated biphenyl mixture (1216) in adult Rhesus monkeys and their nursing infants. *Toxicology* 30: 31-44.
- Barter, R. A., Klaassen, C. D. (1992). UDP-glucuronosyltransferase inducers reduce thyroid hormone levels in rats by an extrathyroidal mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113: 36-42.
- Barter, R. A., Klaassen, C. D. (1994). Reduction of thyroid hormone levels and alteration of thyroid function by four representative UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128: 9-17.
- Battershill, J. K. (1994). Review of the safety assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs) with particular reference to reproductive toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 13: 581-597.
- Beattie, K. M., Gerstenberg, S. L., Hoffman, R., Dellinger, J. A. (1996). Rodent neurotoxicity bioassays for screening contaminated Great Lakes fish. *Environ Toxicol Chem* 15(3): 313-318.
- Beck, H.(1990). Dioxine in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt* 33: 99-104.

- Bergeron, J. M., Crews, D., McLachlan, J. A. (1994). PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* 102: 786-791.
- Bergman, A., Klasson-Wehler, E., Kuroki, H. (1994). Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102: 464-469.
- Bern, H. A. (1992). The fragile fetus. In: (Ed.) Colborn, T., Clement, C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. *Advances in modern environmental toxicology*. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ, pp. 9-16.
- Birnbaum, L. S., De Vito, M. J. (1995): Use of toxic equivalency factors for risk assessment for dioxins and related compounds. *Toxicology* 105: 391-401.
- Bjerke, D and Peterson, R.E. (1994). Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats: Different effects of in utero versus lactational exposure, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 241-249.
- Bowman, R.E. and Heironimus, M.P. (1981). Hypoactivity in adolescent monkeys perinatally exposed to PCBs and hyperactive as juveniles. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 3: 15-18.
- Brouwer, A. Morse D. C., Lans, M. C., Schuur, A. G., Murk, A. J., Klasson-Wehler, E., Bergman, A., Visser, T. J. (1998). Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: Mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol Ind. Health* 14: 59-84.
- Brouwer, A., Klasson-Wehler, E., Bokdam, M., Morse, D. C., and Traag, W. A. (1990). Competitive inhibition of thyroxine binding to transthyretin by monohydroxy metabolites of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere* 20: 1257-1262.
- Brouwer, A. (1991). The role of enzymes in regulating the toxicity of xenobiotics. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 731-736.
- Brouwer, A., Ahlborg, U.G., Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Boersma, E.R., Bosveld, B., Denison, M.S., Earl Gray, L., Hagmar, L., Holene, E., Huisman, M., Jacobson, S.W., Jacobson, J.L., Koopman-Esseboom, C., Koppe, J.G., Kulig, B.M., Morse, D.C., Muckle, G., Peterson, R.E., Sauer, P.J.J., Seegal, R.F., Smits-Van Prooije, A.E., Touwen, B.C.L., Weisglas-Kuperus, N., and Winneke, G. (1995). Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. *Europ. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Section* 293 ; 1-40.
- Brunn, H., Georgii, S., Stojanowic, V., Flemming, R., Thalacker, R. (1989). Fremdstoffe in Lebensmitteln Ermittlung einer täglichen Aufnahme mit der Nahrung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 85: 239-246.
- Brunn, H., Georgii, S., and Prucha, J. (1990). Polychlorierte Biphenyle (PCB) im menschlichen Fettgewebe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190: 108-111.

Bundesgesundhbl. 11/90, (1990). Polychlorierte Biphenyle in der Innenraumluft. Bundesgesundhbl., 33, 11: 497-499.

Byne, W., Warren, J. T., Siggelkow, I. (1987). Medial preoptic sexual dimorphisms in the guinea pig. II. An investigation of medial preoptic neurogenesis. *J. Neurosci.* 7(9): 2697-702.

Carr, G. D., Fibiger, H. C., Phillips, A. G. (1989). Conditioned place preference as a measure of drug reward. In J.M.Leibman & S.J.Cooper (Eds.), *Oxford reviews in psychopharmacology: Vol.1. Neuropharmacological basis of reward.* (pp.265-319). New York: Oxford University Press.

Chemische Landesuntersuchungsanstalt Stuttgart: Jahresbericht 1991

Chen, Y. C., Guo, Y. L., Hsu, C. C., Rogan, W. J. (1992). Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs. *JAMA* 268(22): 3213-8

Chishti, M. A., Fisher, J. P. and Seegal, R. F. (1996): Aroclors 1254 and 1260 reduce dopamine concentrations in rat striatal slices, *Neurotoxicology* 17: 653-660

Chou, S. M., Miike, T., Payne, W. M., and Davis, G. J. (1979). Neuropathology of "spinning syndrome" induced by prenatal intoxication with a PCB in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* N 320: 373-395.

Chu, I., Villeneuve, D. C., Yagminas, A., LeCavalier, P., Poon, R., Feeley, M., Kennedy, S. W., Seegal, R. F., Håkansson, H., Ahlborg, U. G., and Valli, V. E. (1994). Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 22, 457-468.

Collins, W.T., and Capen, C.C. (1980). Fine structural lesions and hormonal alterations in thyroid glands of perinatal rats exposed in utero and by the milk to polychlorinated biphenyls. *Am. J. Pathol.* 99: 125-142.

Connor, K., Ramamoorthy, K., Moore, M., Mustain, M., Chen, I., Safe, S., Zacharewski, T., Gillesby, B., Joyeux, A. and Balaguer, P. (1997). Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: Structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145: 111-123.

Dahl, P., Lindström, G., Wiberg, K., Rappe, C. (1995). Absorption of polychlorinated Biphenyls, Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans by breast-fed Infants. *Chemosphere* 30: 2297-2306.

Darbra, S., Balada, F., Garau, A., Gatell, P., Sala, J., and Marti-Carbonell, M.A. (1995). Perinatal alterations of thyroid hormones and behaviour in adult rats. *Behav. Brain Res.* 68: 159-164.

Davis, D.; and Safe, S. (1989). Dose-response immunotoxicities of commercial polychlorinated biphenyls (PCBs) and their interaktion with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology letters.* 48: 35-43.

De Beun, R., Jansen, E., Slangen, J. L., Van de Poll, N. E. (1992). Testosterone as appetitive and discriminated stimulus in rats : Sex and dose-dependent effects. *Physiol. Behav.* 52: 629-634.

- Denenberg, V. H. (1969). Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 159(3): 852-859.
- Denti, A., and Negroni, J. (1975). Activity and learning in neonatally hormone treated rats. *Acta Physiologica Latinoamerica* 25: 99-106.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1984). Rückstände und Verunreinigung in Muttermilch. Mitteilung XII der Kommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln. Verlag Chemie, Weinheim.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1988). Polychlorierte Biphenyle. Mitteilung XIII der Senatskommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln (Verlag Chemie: Weinheim).
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1988). Polychlorierte Biphenyle- Bestandsaufnahme über Analytik, Vorkommen, Kinetik und Toxikologie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1998). MAK-und BAT-Werte-Liste 1998. Mitteilung 34 der Senatskommission zur Prüfung Gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. (Verlag Chemie:Weinheim).
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (2002). MAK-und BAT-Werte-Liste 2002. Mitteilung der Senatskommission zur Prüfung Gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. (Verlag Chemie:Weinheim).
- De Voogt, P., Brinkmann, U. U. T.. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: Kimbrough, R., Jensen, A. A., eds. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalens, dibenzodioxins, and related products, 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier 1989: 3-45.
- Dewailly, E., Ayotte, P., Laliberte, C., Weber, J. P., Gingras, S. and Nantel, A. J. (1996). Polychlorinated biphenyl (PCB) and dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE) concentrations in the breast milk of women in Quebec, *Am. J. Pub. Health* 86: 1241-1246
- DGPT Mitteilungen Nr. 10, (1992). Stellungnahme der Beratungskommission Toxikologie der DGPT zur toxikologischen Bedeutung der Dioxin-Gehalte in der Muttermilch.
- Dvorchik, B. H. (1981). Nonhuman primates as animal models for the study of fetal hepatic drug metabolism. In: Soyka, L. F., Redmond, G.P., eds. *Drug metabolism in the immature human*. New York: Raven Press pp. 145-162.
- Egeland, G.M., Sweeney, M.H., Fingerhut, M.A., Wille, K.K., Schnorr, T.M. and Halperin, W.E. (1994). Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxin. *Am. J. Epidemiol.* 139: 272-281.
- Ekins, R. (1990). Measurement of free hormones in the blood. *Endocr. Rev.* 11: 5-46.
- Erikson, P. (1988). Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in the brain of neonatal mouse. *Toxicology* 49, 43-48)
- Ewers, U., Krause, C., Schulz, C., Wilhelm, M. (1999). Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72: 255-260.

Expert Panel (1994). Interpretive Review of the Potential Adverse Effects of Chlorinated Organic Chemicals on Human Health and the Environment. Report of an Expert Panel, Regulatory Toxicology and Pharmacology 20: 187-307.

Fastabend, A. Bestimmung umweltbedingter Konzentrationen von PCBs und Organochlorpestiziden in Blut mit GC-ECD unter Anwendung optimierter Probenvorbereitungsverfahren. Promotion, Universität Clausthal, 2000.

Fein, G. G., Jacobson, J. L., Jacobson, S. W., Schwartz, P. M. and Dowler, J. K. (1984). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: effects on birth size and gestational age, J. Pediatr. 105: 315-320

Fielden, M. R., Chen, I., Chittim, B., Safe, S. H., Zacharewski, T. R. (1997). Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155). Environ. Health Perspect. 105: 1238-1248.

Fischer, L. J., Seegal, R. F., Ganey, P. E., Pessah, I. N., Kodavanti, P. R. S. (1998). Symposium Overview. Toxicity of Non-Coplanar PCBs. Toxicological Sciences 41: 49-61.

Fürst, P., Fürst, C., Wilmers, K.. Bericht über die Untersuchung von Frauenmilch auf polychlorierte Dibenzodioxine, Dibenzofurane, Biphenyle sowie Organochlorpestizide 1984-1991. Chemisches Landesuntersuchungsamt NRW Münster.

Georgii, S., Muskat, E., Kleinstein, J., Schubring, C., Brunn, H. (1988). Ernährungs-Umschau 35: 352-356.

Gladen, B. C., Rogan, W.J., Hardy, P., Thullen, J., Tingelstad, J. and Tully, M. R. (1988). Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene transplacentally and through human milk. J. Pediatr. 113: 991-995.

Goldey, E. S. , Kehn, L. S., Lau, C., Rehnberg, G. L., Crofton, K. M. (1995). Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 135: 77-88.

Goldman, D., Yawetz, A. (1990). The interference of Aroclor 1254 with progesterone metabolism in guinea pig adrenal and testes microsomes. J. Biochem. Toxicol. 5: 99-107.

Golub, M. S., Donald, J. M., Reyes, J. A., (1991). Reproductive toxicity of commercial PCB mixture: LOAELs and NOAELs from animal studies. Environ. Health Perspec. 94: 245-253.

Golub, M. S. and Jacobson, J. M., (1995). Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. IV. Neurobehavioral effects. Environ. Health Perspec. 103: 151-155.

Gonzalez, M. I., Leret, M. L. (1992). Role of monoamines in the male differentiation of the brain induced by androgen aromatization. Pharmacol. Biochem. Behav. 41: 733-737.

Grandjean, P., Weihe, P., Needham, L. L., Burse, V. W., Patterson, D. G., Sampson, E. J., Jorgensen, P. J. and Vahter, M. (1995). Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic,

and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk, *Environ. Res.* 71: 29-38

Haake-McMillan, J.M. and Safe, S.H. (1991). Neonatal exposure to Arochlor 1254: effects on adult hepatic testosterone hydroxylase activities. *Xenobiotica* 21: 481-489.

Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Allan, W.C. et al. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N. Eng. J. Med.* 341 (8): 549-556.

Hagmar, L., Hallberg, T., Leja, M., Nilsson, A., Schutz, A. (1995). High consumption of fatty fish from the Baltic Sea is associated with changes in human lymphocyte subset levels. *Toxicol. Lett.* 77(1-3):335-342.

Hansen, L. G. (1987). Environmental toxin series. 1. polychlorinated biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology. In: Safe, S. and Hutzinger, O. (eds.), New York, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp.15-48.

Hany, J. (1998): Untersuchungen zur verhaltenstoxischen Wirkung von polychlorierten Biphenylen (PCB) und deren Interaktionen mit Sexualhormon-abhängigen Prozessen nach maternaler Exposition von Ratten, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Tectum Verlag Marburg

Hany, J., Lilienthal, H., Sarasin, A., Roth-Härer, A., Fastabend, A., Dunemann, L., Lichtensteiger, W., Winneke, G. (1999). Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or Arochlor 1254: Effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 158: 231-243.

Hruska, R. E., Silbergeld, E. K. (1980). Increased dopamine receptor sensitivity after estrogen treatment using the rat rotation model. *Science* 208: 1466-1468.

Hsu, S.-T., Ma, C.-I., Hsu, S. K.-H., Wu, S.-S., Hsu, N. N.-M., Yeh, C.-C. and Wu, S.-B., (1985). Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-Year follow-up. *Environ. Health Perspect.* 59: 5-10.

Jacobson, S.W., Fein, G.G., Jacobson, J.L., Schwartz, P.M. and Dowler, J.K. (1985). The effect of PCB-exposure on visual recognition memory. *Child Dev.* 56: 853-860.

Jacobson, J.L., Jacobson, S.W. and Humphrey, H.E.B. (1990). Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J. Pediatr.* 116: 38-45.

Jacobson, J. L., Jacobson, S. W. and Humphrey, H. E. B. (1990): Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children, *Neurotoxicol. Teratol.* 12: 319-326.

Jacobson, J. L. and Jacobson, S. W. (1997). Evidence for PCBs as neurodevelopmental toxicants in humans, *Neurotoxicology* 18: 415-424.

- Jansen, H. T., Cooke, P. S., Porcelli, J., Liu, T.-C. and Hansen, L. G. (1993). Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: In vitro and in vivo studies, *Reprod. Toxicol.* 7 : 237-248.
- Juárez de Ku, L., and Meserve, L. A. (1994). Perinatal Intake of polychlorinated biphenyl (PCB). *Toxin -Induced Models of Neurological Disorders*, edited by M. L. Woodruff, A. J. Nonneman, Plenum Press, New York.
- Kafafi, S. A., Afeefy, H. Y., Ali, A. H., Said, H. K., and Kafafi, A. G. (1993). Binding of polychlorinated biphenyls to the aryl hydrocarbon receptor. *Environ. Health Perspect.* 101: 422-428.
- Kaminsky, L. S., Kennedy, M. W., Adams, S. M., Guengerich, F. P., (1981). Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry* 20: 7379-7384.
- Keefe, D., Garcia-Segura, L. M. and Naftolin, F. (1994). New insights into estrogen action on the brain, *Neurobiol. Aging* 15 (4): 495-497.
- Kennedy, M. W., Carpentier, N. K., Dymerski, P. P., Kaminsky, L. S. (1981). Metabolism of dichlorobiphenyls by hepatic microsomes. *Biochem Pharmacol.* 30: 577-588.
- Kester, M. H. A., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinel, W., Glatt, H., Falany, C. N., Coughtrie, M. W. H., Bergmann, A., Safe, S. H., Kuiper, G. G. J. M., Schuur, A. G., Brouwer, A., Visse, T. J. (2000). Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: A novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology* 141: 1897-1900.
- Kibler, R., Lepschy, V., Gleissenthall, J. (1990). Zufuhr von Polychlorierten Biphenylen (PCB) über den Gesamtverzehr. *Z Lebensm Unters Forsch* 191: 214-216.
- Kimbrough, R. D. (1995). Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and human health: an update. *Crit. Rev. Toxicol.* 25: 133-163.
- Klein, K. O., Baron, J., Colli, M. J., McDonnell, D. P., Cutler, G. B. J. (1994). Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *Journal of clinical Investigations*, 94: 2475-2480.
- Koopman-Esseboom, C., Morse, D. C., Weisglas-Kuperus, N., et al. (1994). Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants. *Pediatr. Res.* 36: 468-473.
- Koopman-Esseboom, C., Weisglas-Kuperus, N., de Ridder, M. A. J., Van der Paauw, C. G., Tuinstra, L. G. M. Th and Sauer, P. J. J. (1996). Effects of polychlorinated biphenyl/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development. *Pediatrics* 97: 700-706.
- Korach, K. S., Sarver, P., Chae, K., McLachlan J. A., McKinney, J. D. (1988). Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol. Pharmacol.* 33: 120-126.

- Kremer, H., Lilienthal, H., Hany, J., Roth-Härer, A. and Winneke, G. (1999). Sex-Dependent Effects of Maternal PCB Exposure on the Electroretinogram in Adult Rats. *Neurotoxicology and Teratology* 21: 13-19.
- Kuratsune, M., Youshimara, T., Matsuzaka, J. and Yamaguchi, A. (1972). Epidemiologic study on Yusho: a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspect.* 1: 119.
- Lackmann, G. M. (2002). Polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene in full-term neonates. Reference values updated. *Biol. Neonate.* 81(2): 82-85.
- Lavond, D. G., Kim, J. J., Thompson, R.F. (1993). Mammalian brain substrates of aversive classical conditioning. *Annu. Rev. Psychol.* 44: 317-342.
- Le Moal, M., and Simon, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol. Rev.* 71: 155-234.
- Lephart, E. D. (1996): A review of brain aromatase cytochrome P450, *Brain Res. Rev.* 22: 1-26.
- Li, M. H. and Hansen, L. G. (1996). Enzyme induction and acute endocrine effects in prepubertal female rats receiving environmental PCB/PCDF/PCDD mixtures. *Environ Health Perspect.* 104(7): 712-722.
- Lichtensteiger, W., Schlumpf, M. (1985). Prenatal nicotine affects fetal testosterone and sexual dimorphism of saccharin preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 23: 439-444.
- Lilienthal, H., Neuf, M., Munoz, C., and Winneke, G. (1990). Behavioral effects of pre- and postnatal exposure to a mixture of low chlorinated PCBs in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15: 457-467.
- Lilienthal, H. and Winneke, G. (1991): Sensitive periods for behavioral toxicity of polychlorinated biphenyls: Determination by cross-fostering in rats, *Fundam. Appl. Toxicol.* 17: 368-375
- Lilienthal, H., Roth-Härer, A., Hany, J., Huppa, C., Kremer, H., Petsas, M. and Winneke, G. (1997). Wirkung der kombinierten Belastung mit ausgewählten PCB-Kongeneren auf spezifische Verhaltensweisen, Neurotransmitter im Gehirn und Schilddrüsenhormone bei der Ratte, Schlußbericht: Projekt Umwelt und Gesundheit PUG U 95 003, Umweltministerium Baden-Württemberg.
- Lilienthal, H., Hany, H., Kaya, H., Fastabend, A., Roth-Härer, A., Winneke, G., (1998). Wirkung der kombinierten Belastung mit ausgewählten PCB-Kongeneren auf spezifische Verhaltensweisen, Neurotransmitter im Gehirn und Schilddrüsenhormone bei der Ratte. Schlußbericht: Projekt und Gesundheit (PUG U 97 004), Umweltministerium Baden-Württemberg.
- Lilienthal, H., Fastabend, A., Hany, J., Kaya, H., Roth-Härer, A., Dunemann, L., Winneke, G. (2000). Reduced levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture. *Toxicol. Sci.* 57: 292-301.

- Lorenz und Neumeier (1983). Polychlorierte Biphenyle (PCB). Ein gemeinsamer Bericht des Bundesgesundheitsamtes und des Umweltbundesamtes. MMV Medizin Verlag, München.
- Lukas, S. E. (1996). CNS effects and abuse liability of anabolic-androgenic steroids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 333-356.
- Lundkvist, U., Kindahl, H., Madej, A. (1987). Urinary levels of estrone sulfate and 11-ketotetranor prostaglandin F metabolite in pregnant guinea pigs given chlophen A50 (polychlorinated biphenyls). *Biol. Reprod.* 36: 109-116.
- Maren, S., Fanselow, M. S. (1996). The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* 16(2): 237-240.
- Markin, H. L. J., Gower, D. B., and Kirk, D. N., (1995). *Steroid analysis*, Blackie Academic & Professional (Imprint of Chapman & Hall).
- Marks, T. A., Kimmel, G. L., Staples, R. E., (1981). Influence of symmetrical polychlorinated biphenyl isomers on embryo and fetal development in mice. In: *Teratogenicity of 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61: 269-276.
- Marquardt, H. und Schäfer, S. G. (1994). *Lehrbuch der Toxikologie*, B. I. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- Matthews, H. B., Dedrick, R. L., (1984). Pharmacokinetics of PCBs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 85-103.
- McCarthy, M. M. (1994). Molecular aspects of sexual differentiation of the rodent brain, *Psychoneuroendocrinology* 19: 415-427.
- McEwen, B. S. (1975). Hormones, receptors and brain function. *Adv. Pathobiol.* 1975 (1): 56-69.
- McEwen, B. S. (1994). Steroid hormone effects on brain: Novel insights connecting cellular and molecular features of brain cells to behavior, *Neurobiol. Steroids (Series: Methods Neurosci.)* 22: 525-542.
- McKinney, J. D., Pedersen, L. G. (1987). Do residue levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in human blood produce mild hypothyroidism? *J. Theor. Biol.* 129(2): 231-241.
- Meisner, L. F., Roloff, B., Sargent, L., Pitot, H. (1992). Interactive cytogenetic effects on rat bone-marrow due to chronic ingestion of 2,5,2',5' and 3,4,3',4' PCBs. *Mutation Res.* 283: 179-183.
- Moore, M., Mustain, M., Daniel, K., Chen, I., Safe, S., Zacharewski, T., Gillesby, B., Joyeux, A., Balaguer, P. (1997). Antiestrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyl congeners identified in human serum. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 142: 160-168.

- Murai, K., Okamura, K., Tsuji, H., Kajiwara, E., Watanabe, H., Akagi, K., Fujishima, M. (1987). Thyroid function in "yusho" patients exposed to polychlorinated biphenyls (PCB). *Environ. Res.* 44(2): 179-187.
- Nebendahl, W., Rossbach, W., (1996). *Haus und Versuchstierpflege*. Hrsg. Weiß, J., Maeß, J., Gustav Fischer Verlag-Stuttgart-Jena-New York.
- Negri-Cesi, P., Poletti, A. and Celotti, F. (1996). Metabolism of steroids in the brain: A new insight into the role of 5 alpha-reductase and aromatase in brain differentiation and functions, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 58: 455-466.
- Nesaretnam, K., Corcoran, D., Dils, R. R. and Darbre, P. (1996). 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo, *Mol. Endocrinol.* 10: 923-936.
- Ness, D. K., Schantz, S. L., Moshtaghian, J., Hansen, L. G. (1993). Effects of perinatal exposure to specific PCB congeners on thyroid hormone concentrations and thyroid histology in the rat. *Toxicol Lett.* 68: 311-323.
- Packard, M. G., Schroeder, J. P., Alexander G. M. (1998). Expression of testosterone conditioned place preference is blocked by peripheral or intraaccumbens injection of  $\alpha$ -flupenthixol. *Horm. Behav.* 34: 39-47.
- Paekall, D. B. (1967). Pesticide induced enzyme breakdown of steroids in birds. *Nature (London)* 216: 505-506.
- Patandin, S., Koopmann, -Esseboom, C, de Ridder, M. A. J., Weisglas-Kuperus, N., Sauer, P. J. J. (1998). Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children. *Pediatr. Res.* 44: 538-545.
- Patnode, K. A., and Curtis, L. R., (1990). 2,2',4,4',5,5'- and 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl alteration of uterine progesterone and estrogen receptors coincides with embryotoxicity in milk (*Mustela vison*). *Toxicol Appl. Pharmacol.* 127: 9-18.
- Patterson, D. G., Todd, G. D., Turner, W. E., Maggio, V., Alexander, L. R. and Needham, L. L. (1994). Levels of non-ortho-substituted (coplanar), mono- and di-ortho-substituted polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in human serum and adipose tissue, *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl 1): 195-204.
- Pluim, H. J. , de Vijlder, J. J., Olie, K., Kok, J. H., Vulsma, T., van Tijn, D. A., van der Slikke, J. W., Koppe, J. G. (1993). Effects of pre- and postnatal exposure to chlorinated dioxins and furans on human neonatal thyroid hormone concentrations. *Environ. Health Perspect.* 101(6): 504-508.
- Porterfield, S. P., Hendrich, C. E., (1993). The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocr. Rev.* 14: 94-106.
- Porterfield, S. P., Hundry, L. B. (1998). Impact of PCBs on thyroid hormone directed brain development. *Toxicol. Indus. Health* 14: 103-120.

Porterfield, S. P. (1994). Vulnerability of the developing brain to thyroid abnormalities: Environmental insults to the thyroid system, *Environ. Health Perspect.* 102: 125-130.

Pycock, C. J., Kerwin, R. W., and Carter, C. J. (1980). Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine receptors in rats. *Nature* 286: 74-77.

Risebrough, R. W., Rieche, P., Peakall, D. B., Herman, S. G., Kirven, M. N. (1989). Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature (London)* 220: 1098-1102.

Rogan, W. J., Gladen, B. C., McKinney, J. D., Carreras, N., Hardy, P., Thullen, J., Tinglestad, J., Tully, M. (1986). Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE, *J. Pediatr.* 109: 335-341.

Rogan, W. J., Gladen, B. C., Hung, K. L., Koong, S. L., Shih, L. Y., Taylor, J. S., Wu, Y. C., Yang, D., Ragan, N. B., and Hsu, C. C. (1988). Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan, *Science* 241: 334-336.

Rogan, W. J., Gladen, B. C. (1992). Neurotoxicology of PCB's and related compounds. *Neurotoxicology* 13: 27-36.

Rogan, W. J. (1995). Environmental poisoning of children: Lessons from the past, *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 6): 19-23.

Roßkamp, E., (1992). Polychlorierte Biphenyle in der Innenraumluft-Sachstand. *Bundesgesundhbl.* 9/92, 35: 434.

Ryan, J. J., Gasiewicz, T. A., Brown, J. F., (1990). Human body burden of polychlorinated dibenzofurans associated with toxicity based on the Jusho and Jucheng incidents. *Fundam. and Appl. Toxicology* 15: 722-731.

Rylander, L., Sromberg, U., Hagmar, L., (1998). Agreement between reported fish consumption obtained by two interviews and its impact on the results in a reproduction study. *Eur. J. Epidemiol.* 14 : 93-97.

Review: Unterschiedliche toxische effekte von PCB:

Safe, S. (1984). Polychlorinated biphenyls (PCBs): and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology, and mechanism of action. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 13: 319-395.

Risebrough, R. W., Rieche, P., Peakall, D. B., Herman, S. G., Kirven, M. N. (1968). Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature* 220(172): 1098-1102.

Safe, S., Bandiera, S., Sawyer, T., Robertson, L., Safe, L., Parkinson, A., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M., Levin, W., Denomme, M. A. and Fujita, T. (1985). PCBs: Structure-function relationships and mechanism of action, *Environ. Health Perspect.* 60: 47-56.

- Safe, S., Safe, L., Mullin, M., (1987). Polychlorinated biphenyls: Environmental occurrence and analysis. In: Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology. Safe, S. and Hutzinger, O.(eds.), New York, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 1-13.
- Safe, S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs), *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 21: 51-88.
- Safe, S. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs). Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implication of risk assessment. *Critic. Rev. Toxicol.* 24: 87-149.
- Schantz, S. L., Levin, E. D., Bowmann, R. E., Heironimus, R. E., Laughlin, N. K. (1989). Effects of perinatal PCB exposure on discrimination-reversal learning in monkeys. *Neurotoxicol. Teratol.* 11: 243-250.
- Schantz, S., Moshtaghian, J., and Ness, D. K. (1995). Spatial learning deficits in adult rats exposed to ortho-substituted PCB congeners during gestation and lactation. *Fund. Appl. Toxicol.* 26: 117-126.
- Schroeder, J. P., Packard, M. G. (2000). Role of dopamine receptor subtypes in the acquisition of a testosterone conditioned place preference in rats. *Neurosci. Lett.* 282: 17-20.
- Schulte E., Malisch, R. (1984). Calculation of the real PCB content in environmental samples II: Gas chromatographic determination of the PCB concentration in human milk and butter. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 319: 54-59.
- Schwartz, P. M., Jacobson, S. W., Fein, G., Jacobson, J. L. and Price, H. A. (1983). Lake Michigan fish consumption as a source of polychlorinated biphenyls in human cord serum, maternal serum, and milk, *Am. J. Public Health* 73: 293-296.
- Schwartz, J.-C., Giros, B., Martres, M.-P., and Sokoloff, P. (1992). The dopamine receptor family: molecular biology and pharmacology. *Seminars in The Neuroscience* 4: 99-108.
- Seegal, R. F., Bush, B., Brosch, K. O. (1991). Comparison of effects of Aroclor 1016 and 1260 on non-human primate catecholamine function. *Toxicology* 66: 145-163.
- Seegal, R. F., (1996). Epidemical and laboratory Evidence of PCB-Induced Neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 26(6): 709-737.
- Seegal, R. F., Bush, B. and Shain, W. (1990). Lightly chlorinated ortho-substituted PCB congeners decrease dopamin in nonhuman primate brain and in tissue culture, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106: 136-144.
- Shain, W., Overmann, S. R., Wilson, L. R., Kostas, J. and Bush, B. (1986). A congener analysis of polychlorinated biphenyls accumulating in rat pups after perinatal exposure, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 687-707.

- Shain, W., Bush, B., and Seegal, R. (1991). Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls: structure-activity relationship of individual congeners. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111: 33-42.
- Shapiro, B. H. and Goldman, A. S. (1973). Feminine saccharin preference in the genetically androgen insensitive male rat pseudohermaphrodite. *Horm. Behav.* 4: 371-375.
- Simpson, E. R., Merrill, J. C., Hollub, A. J., Graham-Lorence, S. and Mendelson, C. R. (1989). Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells. *Endocr. Rev.* 10: 136-148.
- Spink, D. C., Lincoln, II D. W., Dickerman, H. W., Gierthy, J. F. (1990). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of  $17\beta$ -estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6917-6921.
- Stewart, J. and Cygan, D. (1980). Ovarian hormones act early in development to feminize open field behavior in the rat. *Hormones and Behavior.* 14: 20-32.
- Stewart, J. and Rajabi, H. (1994). Estradiol derived from testosterone in prenatal life affects the development of catecholamine systems in the frontal cortex in the male rat, *Brain. Res.* 646, 157-160
- Suchenwirth, R. H. R., Dunkelberg, H. (1998). Polychlorierte Biphenyle in Innenräumen - Humanbiomonitoring bei erhöhten Raumluftwerten. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 201: 22-23.
- Tanabe, S., Kannan, N., Subramanian, An., Watanabe, S., and Tatsukawa, R. (1987). Highly toxic coplanar PCBs: occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans. *Environ. Pollut.* 47: 147-163.
- Tanabe, S. (1988). PCB problems in the future: Foresight from current knowledge. *Environmental Pollution* 50: 5-28.
- Taylor, G. T., Weiss, J. and Pitha, J. (1989). Testosterone in a cyclodextrin-containing formulation: Behavioral and physiological effects of episode-like pulses in rats. *Pharmaceutical Research*, 6: 641-646.
- Thomas, P. T., Hindsdill, R. D. (1978). Effects of polychlorinated biphenyls on the immune responses of rhesus monkey and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44: 41-51.
- Tilson, H. A., Davis, G. J., McLachlan, J. A., and Lucier, G. W. (1979). The effects of polychlorinated biphenyls given prenatally on the neurobehavioral development of mice. *Environ. Res.* 18: 466-474.
- Tilson, H. A. and Kavlock, R. J. (1997). The workshop on endocrine disruptor research needs: A report. *Neurotoxicology*, 18(2): 389-392.
- Umweltbundesamt (Hrsg.) (1997). Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Forschungsbericht 10204279, Berlin.

Valenstein, E.S., Kakolewski, J.W. and Cox, V.C. (1967). Sex differences and taste preference for glucose and saccharin solutions. *Science* 156: 942-943.

Valle, F.P. (1971). Rat's performance on repeated tests in the open field as a function of age. *Psychon. Sci.* 23: 333-335.

Van Birgelen, A. P. J. M., Smit, E. A., Kampen, J. M., Groeneveld, C. N., Fase, K. M., Van der Kolk, J., Poiger, H., Van den Berg, M., Koeman, J., Brouwer, A. (1995). Subchronic effects of 2,3,7,8-TCDD or PCBs on thyroid hormone metabolism: use in risk assessment. *Eur. J. Pharmacol.* 293: 77-83.

Vieth, B., Heinrich-Hirsch, B., Beck, H. (1996). Trends der Rückstandsgehalte an Organochlor- und Nitromoschusverbindungen in Frauenmilch der Bundesrepublik Deutschland – Fortführung einer Bestandsaufnahme am BgVV. Tätigkeitsbericht 1995 des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. München: MMV Medizin Verlag, S. 158-163.

Von Ziegler, N. I., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W. P. (1991). Prenatal nicotine exposure selectively affects perinatal forebrain aromatase activity and fetal adrenal function in male rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 62: 32-31.

Wadenberg, M. L. (1996). Serotonergic mechanisms in neuroleptic-induced catalepsy in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20: 325-339.

Walkowiak, J., Wiener, J.-A., Fastabend, A., Heinzow, B., Krämer, U., Schmidt, E., Steingrüber, H.-J., Wundram, S., Winneke, G. (2001). Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment: Comparing their influence on psychodevelopment in early childhood. *Lancet* 358: 1602-1607.

Weinand-Härer, A. (1996). Neuro- und verhaltenstoxische Eigenschaften einzelner PCB-Kongener und ihre Einflüsse auf Schilddrüsenhormone: Auswirkungen pränataler Belastung bei Ratten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Cuvillier Verlag, Göttingen.

Weinand-Härer, A., Lilienthal, H., Bucholski, K.-A. and Winneke, G. (1997a). Behavioral effects of maternal exposure to an ortho-chlorinated or a coplanar PCB congener in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3: 97-103.

Weinand-Härer, A., Lilienthal, H., Hany, J. and Winneke, G. (1997b). Single or combined maternal exposure to a coplanar and an ortho-chlorinated PCB-congener in rats: Impairments of learning in the adult male offspring, *Neurotoxicology* 18: 905.

Winneke, G., Bucholski, A., Heinzow, B., Krämer, U., Schmidt, E., Walkowiak, J., Wiener, J. A., Steingrüber, H. J. (1998). Developmental neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBS): cognitive and psychomotor functions in 7-month old children. *Toxicology Letters* 102-103: 423-428.

- White, T. E. K. and Gasiewicz, T. A. (1993). The human oestrogen receptor structural gene contains a DNA sequence which binds activated mouse and human Ah receptors: a possible mechanism of oestrogen receptor regulation by 2,3,7,8-tetra-chlordibenzo-p-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 193: 956-962.
- WHO, World Health Organisation (1988). PCBs, PCDDs and PCDFs in Breast Milk: Assessment of Health Risks. Environmental Health Series No. 29. World Health Organisation, Copenhagen.
- WHO, World Health Organisation (1993). Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (second edition). Environmental Health Criteria 140, Geneva.
- Willig, F., Palacios, A., Monmaur, P., M'Harzi, M., Laurent, J. and Delacour, J. (1987). Short-term memory, exploration and locomotor activity in aged rats. *Neurobiol. Aging* 8: 393-402.
- Woodbury, D. M. (1974). Maturation of the blood-brain and blood-CSF barriers. In: Vernadakis, A., Weiner, N., eds. *Drugs and the developing brain*. Vol. 8 of *Advances in behavioral biology*. New York: Plenum Press pp. 259-280.
- Yamada-Mouri, N., Hirarta, S., Hayashi, M. and Kato, J. (1995). Analysis of the expression and the first exon of aromatase mRNA in monkey brain. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 55: 17-23.
- Yeowell, H. N., Waxman, D. J., Wadhwa, A., Goldstein, J. A. (1987). Suppression of the constitutive, male-specific rat hepatic cytochrome P-450c and its mRNA by 3,4,5,3',4',5',-hexachlorobiphenyl and 3-methylcholantrene. *Mol. Pharmacol.* 32: 340-347.
- Yeowell, H. N., Waxman, D. J., LeBlanc, G. A., Linko, P., Goldstein, J. A. (1988). Induction of cytochrome P-450 3 and its mRNA by 3,4,5,3',4',5',-hexachlorobiphenyl. *Mol. Pharmacol.* 33: 272-278.
- Yoshimura, H., Yoshihara, S., Koga, N., Nagata, K., Wada, I., Kuroki, J., Hokama, Y., (1985). Inductive effect on hepatic enzymes and toxicity of congeners of PCBs and PCDFs. *Environ. Health Perspect.* 59: 113-119.
- Zimmermann, G. und Schatter, C. (1995). Organische Verbindungen/Polychlorierte Biphenyle. In: Wichmann, Schlipkötter und Fülgraff. *Handbuch Umweltmedizin*. S. 1-6.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Winneke danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung meiner Arbeit in konstruktiven Diskussionen und die hilfreiche Kritik bei der Erstellung des Manuskriptes.

Frau Prof. Dr. R. Kahl möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Helmuth Lilienthal für die Einarbeitung in das Thema, sowie für seine Hilfe bei der Bearbeitung statistischer Fragestellungen, seine Diskussionsbereitschaft und die fortwährende Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Frau Dr. Astrid Roth-Härer danke ich für die wertvolle Einarbeitung in die Methodik der Verhaltensversuche und für ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Jürgen Hany danke ich für die Einarbeitung in die Hormonmessungen und die Etablierung der Probenaufarbeitungsmethode für Enzymimmunoassays.

Herrn Michael Lieverz danke ich für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Verhaltensversuche: passive Vermeidung und Ultraschall Vokalisation.

Herrn Dr. Jens Walkowiak danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Computer Software und Hardware Angelegenheiten.

Frau Annemarie Fastabend aus der Abteilung Analytische Chemie danke ich für die Bestimmung der PCB-Gewebskonzentrationen mittels GC/ECD.

Den Mitarbeitern der Abteilung danke ich herzlich für die kollegiale und gute Arbeitsatmosphäre.

# LEBENS LAUF

## Zu meiner Person

Name	Kaya
Vorname	Hatice
Straße	Heresbachstr.18
Ort	40223 Düsseldorf
Telefon	0211-3110362
Geburtsdatum	28. August 1967
Geburtsort	Elazig, Palu / Türkei
Familienstand	Verheiratet, Eine Tochter
Staatsangehörigkeit	Deutsch

## Schulbildung

1974 - 1978	Grundschule
1978 - 1987	Clauberg-Gymnasium in Duisburg, Abschluss: Abitur Juni 1987

## Ausland

07'87 - 7'88	Au-Pair in Israel
--------------	-------------------

## Studium

WS '88 - SS'91	Studium der Biologie auf Diplom an der H.-H.-Uni Düsseldorf
WS '91 - SS'95	Studienortwechsel an die G.-A.-Uni Göttingen. Diplomarbeit mit Stipendium am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen. Abschluss: Diplom Biologin, Juni 1995
WS '95 - WS'02	Studium der Humanmedizin an der H.-H.-Uni Düsseldorf Abschluss: 3.Staatsexamen, November 2002

## Nebentätigkeiten

10'91 - 03'93	Studentische Hilfskraft: Lehrtätigkeit an der Uni-Göttingen
08'93 - 11'93	Studentische Hilfskraft: Forschungsarbeit am MPI in Göttingen

## Berufliche Praxis

07'95 - 09'95	Wissenschaftliche Angestellte am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen
10'95 - 10'99	Wissenschaftliche Angestellte am Medizinischen Institut für Umwelthygiene in Düsseldorf
11'99 - 03'01	Stipendium durch Graduiertenkolleg der Universität Düsseldorf zur Anfertigung der Promotionsarbeit
04'01 - 07'01	Praktisches Jahr mit Beginn 1. Tertian Wahlfach Gynäkologie
12'01 - 08.02	Praktisches Jahr 2. und 3. Tertian
11'02 – 10.03	Teilzeit Tätigkeit als Lehrkraft in Krankenpflegeschulen und Erziehungszeit
11'03 – heute	ÄIP in der Gynäkologie, Evangelisches Krankenhaus Oberhausen

Düsseldorf, 16. Dezember 2003