

Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik
der Technische Universität München

**Untersuchungen zur biologischen Wirkung von Chemikalien,
technischen Polymeren und Emissionen aus industriellen Prozessen
mittels In-vitro-Testmethoden**

Karin Doods

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Huber

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. h. c. (RO) A. Kettrup
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil. H. Parlar
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil. K.-W. Schramm

Die Dissertation wurde am 17.04.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.07.2003 angenommen.

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis September 2002 im Institut für Ökologische Chemie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (Oberschleißheim) durchgeführt.

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank...

...Herrn Prof. Dr. A. Kettrup für die freundliche Aufnahme in sein Institut, die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten und seinen angenehmen Führungsstil.

...Herrn P.D. Dr. K.-W. Schramm für die interessante Themenstellung, die wertvollen Anregungen und seine große Diskussionsbereitschaft.

...Herrn Prof. Dr. H. Parlar für die Übernahme des Korreferats.

...Herrn F. Kiefer (Institut für Toxikologie, GSF-Forschungszentrum) für die freundliche Unterstützung, die große Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung der Rattenhepatom-Zelllinien.

...Frau C. Corsten und Frau K. Popp für die hervorragende Unterstützung bei den zellbiologischen Arbeiten.

...Herrn B. Henkelmann für die Durchführung der PCDD/F- und PCB-Messungen und für die Hilfsbereitschaft, analytische Probleme aus den Weg zu räumen.

...Frau B. Danzer und Herrn St. Busch für die Korrekturen in der vorliegenden Arbeit.

...der „Dioxinlabor-Mannschaft“ (J. Kotalik, T. Wottgen) für die freundliche Aufnahme und Mithilfe.

...der Qualitätsmanagerin V. Péronnet für die begeisternde Einführung in das QS-System.

...meinen „Mitdoktoranden“ N. Chahbane, F. Jäkle, K. Fried, W. Jaser, L. Hollosi, H. Hofbauer und vielen anderen Mitarbeitern des IÖC für das freundliche und hilfsbereite Arbeitsklima.

...meinen Eltern, Klaus und der Bibn Sophie für ALLES.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

1. K. Doods; K. Popp; K.-W. Schramm and A. Kettrup (2000). *An in vitro-test system for determining dioxin-like response in emissions*, Vortrag, In: 7th regional meeting of the central and the east European section of SECOTOX (Editor: Institute of preventive and clinical medicine). Bratislava, 116-118.
2. K. Doods; K.-W. Schramm and A. Kettrup (2001). *Emission-studies by determining the CYP1A1 activity in rat hepatoma cells*, Toxicology letters, 120: 273.
3. K.-W. Schramm und K. Doods (2002). *Yeast screen for the detection of hormon-like activities in environmental samples*, Workshop, In: "Endokrin wirksame Substanzen in Abwasser und Klärschlamm – Neueste Ergebnisse aus Wissenschaft und Technik (Herausgeber: B. Bilitewski, D. Weltin, P. Werner), Dresden, Band 23: 28-33.
4. N. Milanov; K. Doods; K.-W. Schramm; G. Matuschek; D. Lenoir; A. Kettrup (2002). *Comparison between halogenated and phosphorus-containing flame retardants in polybutyleneterephthalate: toxicological and ecotoxicological evaluation of combustion products*, Organohalogen Compounds, 55: 401-403.
5. K. Doods; K.-W. Schramm and A. Kettrup (2002). *Inhibition of EROD-activity in rat hepatoma cells*, Herbsttagung von GBM und DGPT, Halle. In: www.gbm.uni-frankfurt.de-abstracts zur Herbsttagung Halle 2002-abstracts- (000182)
6. Naderi Kalali, B.; Allameh, A.; Rassae M. J.; Bach H.-J.; Behechti A.; Doods K.; Kettrup A. und Schramm K.-W. (2003). *Suppressive effects of caraway extracts on 2, 3, 7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent-Gene expression of cytochrom P450 1A1 in the rat H4 II E cells*. Molecular Pharmacology: eingereicht.
7. K. Doods; B. Naderi Kalali; A. Kettrup und K.-W. Schramm (2003). *Comparison between CYP1A1 inhibition-effects measured by EROD-, CALUX-Bioassay and TAQ-PCR*, 5th international congress of Turkish Society of Toxicology (IC-TST): Abstract angenommen.
8. K. Doods; K.-W. Schramm and A. Kettrup (in Vorbereitung). *Ecotoxicology of industrial emissions*.

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr	(NH ₄)SO ₄	Ammoniumsulfat
A	Adenin	OD	optische Dichte
AhR	Ah-Rezeptor	P	Prolin
Al	Alanin	P450	Zytochrom P (=Pigment) 450 (=nm)
Arg	Arginin	PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
Asp	Asparagin		
AP	Alkalische Phosphatase	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
17. BImSchV	Bundes-Immissionsschutzgesetz 17. Verordnung	PBT	<i>persistent bioaccumulative and toxic</i>
BL	Blindwert	PCB	polychlorierte Biphenyle
BSA	Rinderserumalbumin	PCDD/F	polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine/furane
c	Konzentration	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
C	Cystein	PhAl	Phenylalanin
CBD	Cannabidiol	POP	<i>persistent organic pollutant</i>
CBN	Cannabinol	R	Arginin
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure	R _{ba}	<i>ratio biological value/analytical value</i>
CHCl ₃	Chloroform	R _m	<i>ratio bio. value 24 h/bio. value 72 h</i>
CYP	Zytochrom P450-Isoform	RNA	Ribonuklease
CuSO ₄	Kupfersulfat	UpM	Umdrehungen pro Minute
Cys	Cystein	RT	Raumtemperatur
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMF	Dimethylformamid	sec	Sekunde
DMSO	Dimethylsulfoxid	SU	Sumpter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Th	Threonin
DNase	DNA spaltendes Enzym	T	Thyrosin
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	TCDD	Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
DRE	<i>dioxin responsive elements</i>	TCDF	Tetrachlordibenzofuran
EE	Östradiol	TCDQ	Tetrachlordiquinon
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	UNEP	<i>united nations environmental program</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum	Val	Valin
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß	v/v	Volumen pro Volumen
EROD	Ethoxy-O-resorufin-deethylase	V	Volt
EtOH	Ethanol	Vol	Volumen
Fe ₂ (SO ₄) ₃	Eisen(II)sulfat	WHO	<i>world health organization</i>
FKS	fötales Kälberserum	w/v	Gewicht pro Volumen
G	Glutamin	w/w	Gewicht pro Gewicht
H	Histidin	XRE	<i>xenobiotic responsive elements</i>
H ₂ CO	Formaldehyd		
His	Histidin		
HRGC/HRMS	<i>high resonanz gas chromatographie/ mass spectrometry</i>		
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol		
TEF	Toxizitätsäquivalentfaktoren		
I-TEQ	internationales Toxizitätsäquivalent		
IR	Infrarot		
K	Lysin		
kDa	Kilo Dalton		
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat		
KOH	Kaliumhydroxid		
L	Leucin		
LOD	<i>limit of detection</i>		
Lys	Lysin		
LW	Leerwert		
MgSO ₄	Magnesiumsulfat		
MeOH	Methanol		
Met	Methionin		
Min	Minute		
mRNA	<i>messenger-RNA</i>		
MW	relative molekulare Masse		
NATO/CCMS	<i>north atlantic treaty organization/committee on the challenges of modern society</i>		
n.b.	nicht bestimmbar		

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit	V
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	5
3 Grundlagen	7
3.1 Zytochrom P450	7
3.1.1 EROD-Bioassay: Theorie	9
3.1.2 Luciferase-Bioassay: Theorie	12
3.2 Endokrine Disruptoren	13
3.2.1 Östrogen-Hefe-Bioassay: Theorie	14
3.3 Dioxine und dioxinähnliche Verbindungen	16
3.3.1 PCDD, PCDF	16
3.3.2 PCB	19
3.3.3 Toxizität von PCDD/F und PCB	20
3.4 Neue Quellen und Materialien aus der Technik	22
3.4.1 Elektronik- und Plastikschrutt	22
3.4.2 Flammenschutzmittel	22
3.4.3 Pestizide	23
4 Methoden und Materialien	24
4.1 Probenahme von Emissionen und Prozessgasen	24
4.1.1 Abfallverwertungsanlage Deutschland	25
4.1.2 Krankenhausabfallverbrennungsanlage (KMVA) Griechenland	26
4.1.3 Olivenölfabrik Griechenland	27
4.1.4 Sekundäre Eisenverwertungsanlage Griechenland	28
4.2 Extraktion und Reinigungsschritte von Emissionsproben	30
4.2.1 Extraktion	30
4.2.2 Einsäulen-cleanup-Bioassays	30
4.2.2.1 Bioassay-Säule	30
Prinzip	30
Durchführung	31
4.2.3 Säulenchromatographische Reinigung für die instrumentelle Analytik	31
4.2.3.1 Alox-Säule	34
Prinzip	34
Durchführung	34
4.2.3.2 Sandwich-Säule	34
Prinzip	34
Durchführung	34
4.2.3.3 Florisil®-Säule	35
Prinzip	35

Durchführung	35
4.2.3.4 Thielen & Olsen-Säule	35
Prinzip	35
Durchführung	35
4.2.3.5 Gelpermeationschromatographie (GPC).....	36
Prinzip	36
Durchführung	36
4.2.3.6 Überführung der Proben in Braunglasprobenfläschchen	36
Bioassay.....	36
Instrumentelle Analytik	36
4.3 Elektronik- und Plastikschrutt	37
4.3.1 Herkunft der Proben	37
4.3.2 Extraktion	37
4.3.3 Säulenchromatographische Reinigung	37
4.4 Flammenschutzmittel.....	38
4.4.1 Herkunft der Proben und Extraktion	38
4.4.2 Säulenchromatographische Reinigung	38
4.5 Pestizide.....	38
4.5.1 Herkunft der Proben	38
4.5.2 Extraktion und Reinigung	39
4.6 Interne Qualitätskontrolle mittels Flugasche	39
4.6.1 Herkunft der Probe	39
4.6.2 Probenaufschluss und Extraktion.....	39
4.6.3 Säulenchromatographische Reinigung Bioassay.....	40
4.7 EROD-Bioassay: Durchführung.....	40
4.7.1 Zellmaterial.....	40
4.7.2 Durchführung.....	40
4.8 Östrogen-Hefe-Bioassay: Durchführung	42
4.8.1 Zellmaterial.....	42
4.8.2 Durchführung des Hefe-Östrogen-Bioassays mittels 96-Loch-Platten.....	43
4.8.3 Durchführung des Hefe-Östrogen-Bioassays mittels Erlenmeyerflaschen	44
4.9 Luciferase-Bioassay: Durchführung	46
4.9.1 Zellmaterial.....	46
4.9.2 Durchführung.....	46
4.10 TaqMan®-PCR	47
4.10.1 Theorie	47
4.10.2 Durchführung	48
4.11 Proteinbestimmung.....	49
4.11.1 BCA-Methode.....	49
4.12 Zytotoxizitätstest.....	49
4.12.1 Theorie	49
4.12.2 Durchführung	49

4.13	Methoden zur Auswertung der Datensätze.....	50
4.13.1	Instrumentelle Analytik	50
4.13.2	In-vitro-Bioassays.....	50
4.13.2.1	EROD-Bioassay	51
4.13.2.2	Östrogen-Hefe-Bioassay.....	52
5	Ergebnisse und Diskussion	54
5.1	Qualität der Daten	54
5.1.1	Wiederfindungsraten	55
5.1.2	Nachweisgrenzen EROD-Bioassay.....	56
5.1.3	Blindwerte.....	58
5.1.4	Diskussion	58
5.2	Emissionen einer Abfallverwertungsanlage.....	59
5.2.1	Instrumentelle Analytik	59
5.2.2	EROD-Bioassay-Analytik	64
5.2.3	Östrogenartige Effekte	67
5.2.4	Diskussion	67
5.3	Emissionen von Verbrennungsanlagen in Griechenland.....	70
5.3.1	Krankenhausabfallverbrennungsanlage.....	70
5.3.1.1	Instrumentelle Analytik	71
5.3.1.2	EROD-Bioassay-Analytik	71
5.3.1.3	Östrogenartige Effekte	72
5.3.2	Sekundäre Eisenverwertungsanlage.....	73
5.3.2.1	Instrumentelle Analytik	73
5.3.2.2	EROD-Bioassay-Analytik	74
5.3.2.3	Östrogenartige Effekte	74
5.3.3	Olivenölfabrik Griechenland	75
5.3.3.1	Instrumentelle Analytik	75
5.3.3.2	EROD-Bioassay-Analytik	75
5.3.3.3	Östrogenartige Effekte	76
5.3.4	Diskussion	76
5.4	Analyse ökotoxikologisch relevanter Materialien und Einzelsubstanzen	80
5.4.1	Elektronik- und Plastikschrutt.....	80
5.4.1.1	Instrumentelle Analytik	80
5.4.1.2	EROD-Bioassay-Analytik	80
5.4.1.3	Östrogenartige Effekte	82
5.4.1.4	Diskussion.....	83
5.4.2	Flammschutzmittel	84
5.4.2.1	EROD-Bioassay-Analytik	85
5.4.2.2	Östrogenartige Effekte	86
5.4.2.3	Diskussion.....	86
5.4.3	Pestizide.....	86
5.4.3.1	EROD-Bioassay-Analytik	89
5.4.3.2	Östrogenartige Effekte	90
5.4.3.3	Diskussion.....	90
5.4.4	Cannabinoide	91
5.4.4.1	EROD-Bioassay-Analytik	91
5.4.4.2	Östrogenartige Effekte	92
5.4.4.3	Diskussion.....	92
5.4.5	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	93

5.4.5.1	EROD-Bioassay-Analytik	94
5.4.5.2	Östrogenartige Effekte	95
5.4.5.3	Diskussion.....	95
5.4.6	Phenolische Verbindungen, Biphenyl und TCDQ	96
5.4.6.1	EROD-Bioassay-Analytik	97
5.4.6.2	Östrogenartige Effekte	97
5.4.6.3	Diskussion.....	98
5.5	Untersuchungen zur CYP1A1-Induktion	99
5.5.1	Induktionsweg der Emissionsproben.....	100
5.5.2	Additives Verhalten	101
5.5.3	Inhibierung von CYP1A1-Induktionen	102
5.5.3.1	Tocopherole	103
5.5.3.2	Flavonoide.....	107
5.5.3.3	Cannabinoide	110
5.5.4	Mögliche Inhibierungsebenen	111
5.5.5	Diskussion	114
6	Zusammenfassung.....	116
7	Ausblick	119
8	Anhang.....	120
8.1	Material.....	120
8.1.1	Geräte	120
8.1.2	Geräte- und Programmeinstellungen	122
8.1.3	Verbrauchsmaterialien	124
8.1.4	Chemikalien.....	124
8.1.5	Bakterienstämme / Zelllinien	126
8.1.6	Kits	126
8.2	Medien, Lösungen und Puffer.....	126
8.2.1	Medien	127
8.2.2	Lösungen und Puffer	129
8.3	Analytische Methoden	130
8.3.1	Belegungsplan Bioassays.....	130
8.3.2	Standardsubstanzen	132
9	Literatur.....	133

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Globaler jährlicher Ausstoß an PCDD/F im Jahr 1995	2
Abb. 3.1:	Schema des EROD-Bioassays.....	10
Abb. 3.2:	Metabolische Aktivierungsstellen von Benz(a)pyren.....	12
Abb. 3.3:	Reaktionsgleichung zur Umsetzung von Luciferin	13
Abb. 3.4:	Vereinfachte Darstellung des molekularen Mechanismus des Hefe-Östrogen-Bioassays.....	15
Abb. 3.5:	Grundgerüste der polychlorierten Dibenzo-p-dioxine und -furane (PCDD/F).....	16
Abb. 3.6:	Grundgerüst der polychlorierten Biphenyle (PCB).....	19
Abb. 3.7:	Struktur von Curcumin.....	23
Abb. 4.1:	Probenahmesystem nach VDI DIN 3499 Blatt 1 bzw. VDI DIN 2066 1-8	24
Abb. 4.2:	Schema einer Abfallverwertungsanlage	26
Abb. 4.3:	Schema einer Krankenhausabfallverbrennungsanlage	27
Abb. 4.4:	Schema einer Olivenölproduktionsanlage	28
Abb. 4.5:	Schema einer sekundären Eisenproduktionsanlage.....	29
Abb. 4.6:	Zusammensetzung der Bioassay-Säule	31
Abb. 4.7-8:	Schemata der Reinigungsschritte zur PCDD/F- und PCB-Bestimmung	32-33
Abb. 4.9:	Verdünnungsschritte bei der Durchführung des EROD-Bioassays.....	41
Abb. 4.10:	CYP1A1-Deethylierungsreaktion von 7-Ethoxyresorufin	42
Abb. 4.11:	Wachstumskurven von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
Abb. 4.12:	Kurvenverlauf nach 72stündiger Inkubation der H4IIE-Zellen mit Flugasche	52
Abb. 4.13:	17- β -Östradiol Standardkurve nach 72 h.....	53
Abb. 5.1:	Graphische Darstellung einer 2,3,7,8-TCDD-Standardkurve.....	57
Abb. 5.2:	Summe der TCDD, PCDD, HxCDD, HpCDD und OCDD einer MVA	59
Abb. 5.3:	Summe der zur I-TEQ-Wert-Bestimmung relevanten zehn Furane (MVA).....	61
Abb. 5.4:	Vergleich der PCB- I-TEQ-Werte nach Safe (1990) und der WHO (1998).....	62
Abb. 5.5:	Homologensummen nach Ballschmiter	62
Abb. 5.6:	Induktionsverlauf des CYP1A1-Systems durch die Reingasprobe Nr. 11.....	66
Abb. 5.7:	TCDD-Äquivalente der Abfallverwertungsanlage nach 72 h	67
Abb. 5.8:	Induktionsverhalten von nicht persistenten Verbindungen und PBT.....	72
Abb. 5.9:	Faktoren R_{ba} und R_m	78
Abb. 5.10:	Induktionsverhalten der Kugelkreislaufreaktorprobe 73.....	81
Abb. 5.11-12:	Induktionsverhalten der Kugelkreislaufreaktorproben 77 und 78	81-82
Abb. 5.13:	Reaktionsschema zur Herstellung der Kunststoff-Flammschutzmittelprobe	85
Abb. 5.14:	Struktur einer von 670 existierenden Toxaphenverbindungen.....	87
Abb. 5.15:	Drei Strukturen von 84 getesteten Pestizidsubstanzen	89
Abb. 5.16:	Strukturen der Cannabis-Verbindungen Δ^9 -THC, CBD und CBN	91
Abb. 5.17:	Strukturen von Anthracen, Chrysen, Fluoranthen und 3-Hydroxy-Fluoranthen	94
Abb. 5.18:	Strukturen von getesteten Einzelsubstanzen.....	96
Abb. 5.19:	Standardaddition der Flugasche FAMS und 2,3,7,8-TCDD	102
Abb. 5.20:	Struktur des Vitamin E-Acetats.....	104
Abb. 5.21:	Inhibierende Wirkung des DL- α -Tocopherol-Acetats	105
Abb. 5.22:	Grundgerüst der Flavone und Flavonole	107
Abb. 5.23:	Darstellung der verwendeten Flavon-Konzentrationen	109
Abb. 5.24:	Vergleich von spezifischen Enzym-Aktivitäten (EROD- und Luciferase-Bioassay).....	112
Abb. 5.25:	Flavon-Probe: Darstellung des relativen CYP1A1 m-RNA-Levels.....	113
Abb. 5.26:	Cannabisrauch-Probe: Darstellung des relativen CYP1A1 m-RNA-Levels.....	114

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	Darstellung der Zytochrom P450-Familie	8
Tab. 3.2:	Katalysierte Metabolisierungsreaktionen des Zytochrom P450	11
Tab. 3.3:	TEF für PCDD/F nach WHO (1998), NATO/CCMS (1988) und EROD-Bioassay.....	18
Tab. 3.4:	TEF für PCB (Ballschmitter) nach WHO (1998) und EROD-Bioassay.....	20
Tab. 4.1:	Probenanzahl der Abfallverwertungsanlage	26
Tab. 4.2:	Pyrolyseproben aus einer Kaskade von drei Kugelkreislaufreaktoren	37
Tab. 5.1:	Vergleich von I-TEQ-Werten beim Messpunkt 200 °C	54
Tab. 5.2:	Wiederfindungsraten für Chloraromaten.....	56
Tab. 5.3:	Zusammensetzung der I-TEQ-Werte von Reingas-Emissionsproben	64
Tab. 5.4:	EROD-TEQ-Werte berechnet mit dem Detektionslimt.....	65
Tab. 5.5:	Darstellung der durch instrumentelle Analytik und EROD-Bioassay ermittelten I-TEQ-Werte.....	71
Tab. 5.6:	Vergleich der durch die instrumentelle Analytik bestimmten I-TEQ-Werte der sek. Fe-anlage.....	73
Tab. 5.7:	Daten der sekundären Fe-Verwertungsanlage: 24 h- und 72 h-Werte durch EROD-Bioassay.....	74
Tab. 5.8:	Daten der durch die instrumentelle Analytik bestimmten I-TEQ-Werte einer Olivenölfabrik.....	75
Tab. 5.9:	Vergleich von I-TEQ-Werten griechischer Verbrennungsanlagen	77
Tab. 5.10:	Östrogenartige Effekte der Verbrennungsproben Elektronik-/Plastikschrött	82
Tab. 5.11:	I-TEQ-Werte von Verbrennungsproben Elektronik-/Plastikschrött.....	83
Tab. 5.12:	I-TEQ-Werte der Flammschutzmittel-enthaltenden Kunststoffverbindungen.....	85
Tab. 5.13:	Einteilung der wichtigsten Pestizidgruppen nach ihren Anwendungsbereichen.....	87
Tab. 5.14:	Relative TEF-Werte nach 24 h und 72 h für vier PAK	94
Tab. 5.15:	Zusammenfassung der CYP1A1- Induktionsexperimente durch Einzelsubstanzen	97
Tab. 5.16:	Verbindungsklassen der Flavonoide.....	108
Tab. 8.1:	Geräte und Programmeinstellungen zur konventionellen PCDD/F-Analyse	122
Tab. 8.2:	Geräte und Programmeinstellungen zur konventionellen PCB-Analyse	122
Tab. 8.3:	Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	127
Tab. 8.4:	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer beim EROD-Bioassay.....	129
Tab. 8.5:	Belegungsplan EROD-Bioassay, verwendete Standardsubstanz 2,3,7,8-TCDD.....	130
Tab. 8.6:	Belegungsplan Hefe-Östrogen-Bioassay, verwendete Standardsubstanz 17-β-Östradiol.....	131
Tab. 8.7:	Verwendete Standardsubstanzen.....	132

1 Einleitung

Emissionen von Abfallverwertungsanlagen werden seit vielen Jahren hinsichtlich diverser umweltschädigender Verbindungen analysiert. Zu den bekanntesten Verbindungen zählen neben SO_x , CO und NO_x die polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine und -furane (PCDD und PCDF, PCDD/F). Der Eintrag von PCDD/F in die Nahrungskette erfolgt nach dem heutigen Erkenntnisstand hauptsächlich über die Deposition aus der Luft und belastet dadurch Pflanzen und Tiere des Nahrungsnetzes. Aufgrund ihrer guten Fettlöslichkeit reichern sich Dioxine und Furane im Verlauf der Nahrungskette im Fettgewebe an und gelangen so z.B. über tierische Nahrungsmittel zum Menschen. Die Auswirkungen von thermischen Emissionen auf Umwelt und menschliche Gesundheit stehen daher seit Jahren im Mittelpunkt der Diskussionen. Die ubiquitär vorhandenen PCDD/F entstehen unbeabsichtigt bei Verbrennungen und chemischen Prozessen. Konzentrationen und Massenströme sind dabei vom Bildungsprozess abhängig. Abfallverwertungsanlagen stellten in Deutschland lange eine primäre Quelle für PCDD/F-Emissionen dar. Die thermische Müllverwertung dient der Rückgewinnung der im Abfall enthaltenen Energie, der Gewichts- und Volumenreduktion und der Inertisierung des Mülls. Schätzungen für die Zeit vor 1991 gehen von einem jährlichen Eintrag von ca. 400 g I-TEQ der damals vorhandenen Anlagen aus (alte Bundesländer). I-TEQ steht dabei für internationales Toxizitätsäquivalent, das sich aus der mit der instrumentellen Analytik bestimmten Konzentration der analysierten Substanz, multipliziert mit einem festgelegten Toxizitätsfaktor ergibt. In Abb. 1.1 ist der globale jährliche Ausstoß an PCDD/F-Emissionen für das Jahr 1995 dargestellt (UNEP, 1999).

Der globale jährliche Ausstoß an PCDD/F betrug demnach 1995 zwischen 10 – 50 kg I-TEQ. Hierzu steuerte Deutschland mit 330 g I-TEQ einen relativ geringen Anteil bei. Der Grund hierfür liegt in der Einführung eines Grenzwertes von $0,1 \text{ ng I-TEQ/m}^3$, der in der 17. BImSchV von 1990 festgelegt ist. Die damit einhergehende Anwendung spezieller Minderungstechnologien führte zu einer Reduktion der PCDD/F-Emissionen um den Faktor 60 – 100 ((Fiedler et al., 1990), (Kaune et al., 1995)). Die große Unsicherheit von 10 – 50 kg I-TEQ im Jahr 1995 ist durch unterschiedliche Hoch- und Einrechnungen bestimmter Quellen (z.B. Hausbrände), das Fehlen einiger Daten aus bestimmten Ländern (z.B. Griechenland) und unterschiedliche Analyse- und Probenahmeverfahren erklärbar. In einigen europäischen Ländern, wie z.B. in Schweden und in Österreich, gelten ähnliche Vorschriften wie in Deutschland. In

einigen südeuropäischen Staaten, aber auch Belgien, Frankreich und Großbritannien muss die Müllverbrennung als eine weit stärkere Quelle für PCDD/F betrachtet werden, deren Erfassung zum Teil noch nicht stattgefunden hat.

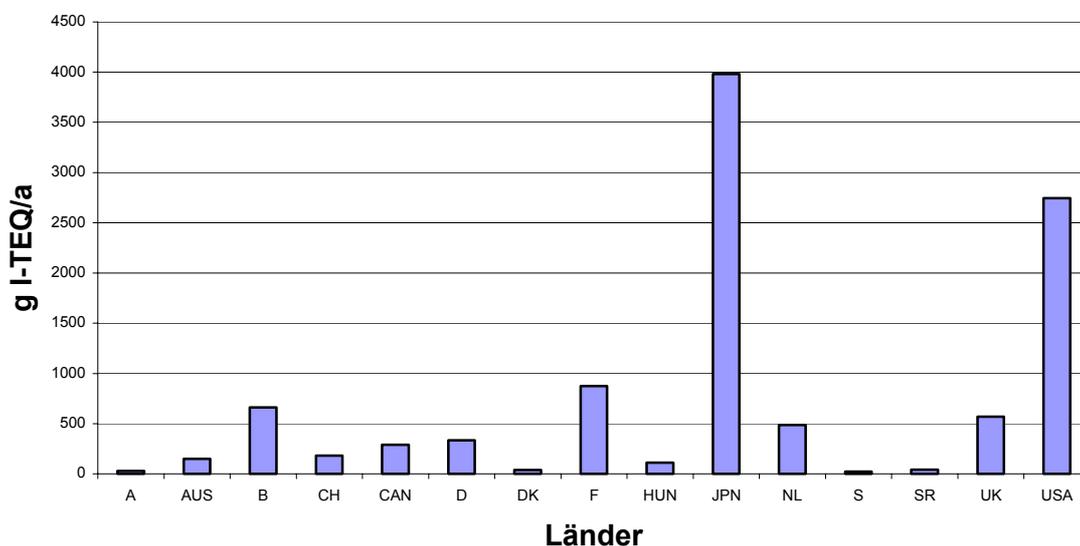


Abb. 1.1: Globaler jährlicher Ausstoß an PCDD/F im Jahr 1995 (UNEP, 1999)

Die in Abb. 1.1 dargestellten Daten basieren auf Methoden der instrumentellen Analytik (z.B. HRGC/HRMS). Das dabei angewendete TEF-Konzept, d.h. die Multiplikation der bestimmten Konzentrationen mit festgelegten Faktoren für die analysierte Substanz, berücksichtigt jedoch nur 17 der in 2,3,7,8-Position substituierten PCDD/F-Isomere. Synergistische oder inhibierende Effekte werden durch das TEF-Konzept nicht berücksichtigt, da sie aufgrund von In-vivo- und In-vitro-Studien als nicht wahrscheinlich eingestuft werden. Bei der Erfassung und Einordnung von toxikologischen Wirkungen von Schadstoffen sind aber besonders diese Effekte relevant. Eine Möglichkeit zur Detektion dieser Wirkungsstärken stellen In-vitro-Testsysteme dar.

Die Anwendbarkeit von In-vitro-Testsystemen zur Bestimmung biologischer Effekte erfordert die Einhaltung strenger Qualitätskriterien, wie z.B. Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit, sowie ökonomischer Vorgaben. Die Validierung potentieller In-vitro-Testsysteme stellt ein zeitaufwendiges Verfahren dar. So werden beispielsweise seit ungefähr zwei Jahren mehrere Zellsysteme, die sich als Standardtests für Dioxine

und dioxinähnliche Substanzen eignen, hinsichtlich ihrer Qualitätsparameter durch diverse Arbeitsgruppen und einem internationalen Ringtest miteinander verglichen. Die Anwendung von In-vitro-Testsystemen richtet sich nicht nur auf die Erfassung von Dioxinen und dioxinähnlichen Verbindungen. In den letzten Jahren ist das Interesse an (Umwelt)chemikalien und Materialien, die Auswirkungen auf endokrine Regelkreise besitzen, stark gestiegen. Diese sogenannten *endocrine disruptors* wirken als Hormon bzw. als Antihormon oder auf die Hormonsynthese. Die hormonaktiven Substanzen stören somit die komplexe Regulation der Sexualsteroiden, Östrogene und Androgene. Das wirksamste körpereigene Östrogen, das 17- β -Östradiol, ist, wie das Testosteron, ein Derivat des Cholesterins und damit der Stoffklasse der Steroide zuzuordnen. Als Östrogene und Androgene sind jedoch nicht nur die Steroide wirksam. Polypeptide, wie das Insulin, besitzen hormonelle Wirkungen und als androgene Umweltchemikalie ist Tributylzinn (TBT) bekannt. Durch Imitation körpereigener Hormone stören diese *endocrine disruptors* beispielsweise die Signalweiterleitung im Körper und ändern die Wirksamkeit körpereigener Hormone.

Als Quellen für *endocrine disruptors* und Dioxine bzw. dioxinähnliche Verbindungen sind die bereits genannten luftgetragenen Emissionen aus Müllverbrennungsanlagen von großem Interesse. Neue und schon angewandte Produkte im Pflanzenschutzmittelbereich stehen diesbezüglich auch in der Diskussion. Für die steigende Anzahl an Pflanzenschutzmitteln ist die Resistenz der Schädlinge und eine Steigerung der Effizienz verantwortlich. Bei der Einführung neuer Produkte ist jedoch nicht nur die Wirksamkeit des Pflanzenschutzmittels gegenüber dem Schädling von Interesse, sondern auch eventuell auftretende Störungen von Ökosystemen.

Ein Eingriff in Ökosysteme erfolgt auch durch den ständig steigenden Konsum an Kunststoff- und Elektronikprodukten. Kunststoff- und Elektronikprodukte leisten in den Industriestaaten mittlerweile einen entscheidenden Anteil am hohen Lebensstandard. Neben den produktspezifischen Bedingungen reglementieren internationale Standards, beispielsweise über Flammenschutzmittel, die Zusammensetzung von Kunststoffprodukten. Die ökotoxikologische Relevanz von flammgeschützten Kunststoffen, die halogenhaltige Verbindungen enthalten, ist durch die potentielle Entstehung polyhalogener Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane im Brandfall oder beim Recyclingprozess groß. In Europa werden z.B. pro Jahr 64 000 t bromorganische Flammenschutzmittel verarbeitet (Rieß, 1999), was

Einleitung

einen bedeutenden Marktanteil unter den Flammschutzmitteln darstellt. Im Elektro- und Elektronikbereich findet unter anderem der Verbrauch von 83 % aller flammgeschützte Kunststoffe statt (Nickel, 1995).

Die Erfassung neuer Quellen von endokrinen und dioxinähnlichen Substanzen ist ein weiteres wichtiges Anwendungsfeld von In-vitro-Testsystemen. In-vitro-Testsysteme müssen dafür eine kostengünstige Analyse einer hohen Probenanzahl gewährleisten. Nur diese Basis ermöglicht eine toxikologische Bewertung neuer potentieller Quellen, wie z.B. Olivenölfabriken in einigen südeuropäischen Ländern. Im Idealfall führt daher die Analyse möglichst vieler Quellen mit In-vitro-Testsystemen und der Vergleich mit der instrumentellen Analytik zu einer umfassenden Bewertung von Umweltproben und letztendlich zur Minimierung von umweltschädigenden Einflüssen.

2 Zielsetzung

Die bisher gewonnenen Informationen zur ökotoxikologischen Bedeutung von luftgetragenen Emissionen aus Verbrennungsanlagen lassen viele Fragen hinsichtlich der biologischen Wirkung offen. Erst in den letzten Jahren rückte die Untersuchung von Emissionen aus Verbrennungsanlagen mittels In-vitro-Testsysteme stärker in den Mittelpunkt (Behnisch, 2001; Schramm et al. 2001 und Hofmaier et al. 1999 b). Eine exakte Einordnung von Quellen oder eine Erfassung neuer Quellen steht erst am Anfang. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Anwendung von In-vitro-Testsystemen zur Erfassung von endokrinen Effekten und dioxinähnlichen Eigenschaften liefern. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag bei luftgetragenen Emissionen aus zum Teil noch nicht beprobten Verbrennungsanlagen, neuen Quellen und bei Materialien, die ökotoxikologische Relevanz besitzen.

Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine, -furane und Biphenyle gehören zu den toxikologisch relevantesten polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen (PHAK). Zur Bestimmung der Toxizität aller PHAK dient in der instrumentellen Analytik wie auch in der Bioanalytik 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) als Referenzsubstanz. Ein Vergleich zur Wirkungsstärke des TCDD liefert die potentielle Toxizität der untersuchten Umweltproben und Substanzen. In In-vitro-Testsystemen ermöglicht die Induktionsfähigkeit von Zytochrom P4501A1 durch PHAK eine Erfassung der biologischen Wirkung (Safe, 1990). Die dabei in der Praxis häufig verwendeten Rattenhepatomzellen (H4IIE) reagieren außerordentlich empfindlich auf CYP1A1-Induktoren. Die CYP1A1-Aktivität wird bei dieser Zelllinie häufig mit dem Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Bioassay ermittelt. Auf dieser Basis sollten die bereits erwähnten Emissions- und Materialproben untersucht und als Quelle von Dioxinen und dioxinähnlichen Substanzen eingeordnet werden.

Endokrine Disruptoren stehen in Verdacht, in Konzentrationen biologisch aktiv zu sein, die mehrere Größenordnungen unter den sonst üblichen Dosierungen bei konventionellen Sicherheitsbewertungen in der Toxikologie liegen (Colburn und Clement, 1992). Aufgründessen wird seit Beginn der 90iger Jahre die Forschung zur Erfassung und Beurteilung von Substanzen hinsichtlich hormoneller Wirkungen unter neuen Gesichtspunkten betrieben. Die Datenbasis über Materialien, die ökotoxikologische Relevanz besitzen und über neue Quellen ist jedoch immer noch gering. Luftgetragene Emissionen wurden hinsichtlich ihrer östrogenen Wirkung noch nicht untersucht und finden erstmalig in der vorliegenden Arbeit Berücksichtigung.

Zielsetzung

Vor dem geschilderten Hintergrund wurde folgende Zielsetzung für die vorliegende Arbeit festgelegt:

- Weisen ausgesuchte Materialien und Emissionen von Abfallverwertungsanlagen dioxinähnliches Verhalten hinsichtlich der P450 CYP1A1-Induktion auf?
- Erfolgt die Induzierung des Zytochroms P4501A1 durch Emissionsproben ausschließlich über die Ah-Rezeptor-Ligand Bindung?
- Welche Inhibierungsmöglichkeiten der CYP1A1-Induktion sind möglich?
- Welche Unterschiede sind durch einen TEQ-Daten-Vergleich zwischen In-vitro-Testsystemen und instrumenteller Analytik feststellbar?
- Weisen ausgesuchte Materialien und Emissionen von Abfallverwertungsanlagen östrogenähnliche Effekte auf?

3 Grundlagen

3.1 Zytochrom P450

Fremdstoffe (Xenobiotika) können durch orale Aufnahme, Inhalation und Absorption durch die Haut in den Organismus gelangen. Die Wiederausscheidung dieser Xenobiotika hängt in einem besonderen Maße von der Wasserlöslichkeit der Stoffe ab. Je lipophiler eine Substanz ist, desto stärker sind die Bioakkumulation im Körper und eventuell auftretende toxische Effekte. Die meisten Organismen verfügen daher über ein Enzymsystem, das schwerlösliche und lipophile Verbindungen metabolisiert, um eine schnelle Ausscheidung des Fremdstoffes zu gewährleisten.

Die zur Detoxifizierung und Ausscheidung der Xenobiotika führenden Reaktionen kann man in zwei Gruppen einteilen: Durch Phase I-Reaktionen werden Xenobiotika enzymatisch verändert, z.B. durch Oxygenierung oder Hydrolyse. Phase II-Reaktionen verwandeln Fremdstoffe durch Konjugatbildung in wasserlösliche Formen. Im allgemeinen überführen Phase I-Reaktionen Fremdstoffe in Verbindungen, die Phase II-Reaktionen eingehen können. Xenobiotika induzieren gleichzeitig beide genannten Enzymsysteme. Diese koordinierte Induktion durch denselben Induktor ermöglicht eine schnelle Entfernung zytotoxischer Verbindungen sowie weitere Schutzmechanismen.

Eines der wichtigsten Enzymsysteme der Phase I-Reaktionen stellt das Zytochrom P450 dar. Es besteht aus membrangebundenen, mischfunktionellen Oxidasen, die nichtkovalent gebundenes Häm in Form des Eisen-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe aufweisen und in Gegenwart von NADPH molekularen Sauerstoff zur Oxidation der Xenobiotika verwenden (Schenkman, 1993).

Die Bezeichnung „Zytochrom P450“ ist auf eine Spektrallinie bei 450 nm zurückzuführen, die bei Komplexierung des Hämproteins mit Kohlenmonoxid auftritt. Das Nomenklatorsystem der P450-Proteine basiert auf den primären Aminosäuresequenzen des jeweiligen Enzyms (Nebert et al., 1987). Isoformen mit mehr als 40 % Sequenzhomologie werden zu einer Familie zusammengefasst, solche mit mehr als 55 % Homologie zu einer Subfamilie gezählt. Ausgehend von einer P450-Überfamilie gehen 74 Familien hervor. 14 davon (mit 26 Subfamilien) sind in Säugetieren zu finden (Nelson et al., 1996). Die Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht der P450-Familie.

Tab. 3.1: Darstellung der Zytochrom P450-Familie

Genfamilie	Subfamilie	Bezeichnung	
P450I	P450I A1	CYP1A1	durch PAK und TCDD induzierbar
	P450I A2	CYP1A2	
P450II	P450II A1	CYP2A1	Testosteron-7- α -Hydroxylierung
	P450II A2	CYP2A2	
	P450II B1	CYP2B1	durch Phenobarbital induzierbar
	P450II B2	CYP2B2	
	P450II C1 bis P450II E1	CYP2C1 bis CYP2E1	Konstitutive Expression der meisten Gene, Induktion durch Alkohole u. Nitrosamine
P450III	P450III A1	CYP3A1	große Bedeutung im Pharmakametabolismus
	P450III A2	CYP3A2	
P450IV	P450IV A1	CYP4A1	Aktivitätszunahme mit Proliferation von Peroxisomen in der Leber
P450XI		CYP11	Beteiligung an Steroidhormonbiosynthese und –stoffwechsel in Mikrosomen und Mitochondrien
P450XVII		CYP17	
P450XIX		CYP19	
P450XXI		CYP21	
P450LI		CYP51	Nichtsäuger-P450-Oxygenase (Huhn, Fisch, Hefe)
P450CI		CYP101	Prokaryoten-Oxygenase, wird durch Campher induziert

Die Zytochrom P450-Enzymsysteme sind weit verbreitet und befinden sich in Bakterien, Hefen, Pflanzen, Insekten und Wirbeltieren. Mit Ausnahme bakterieller Formen liegt P450 membrangebunden vor. Die Lokalisation in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums ist für die Oxidation lipophiler Substrate sehr vorteilhaft: Letztere erreichen das Enzym durch Diffusion in der Lipiddoppelschicht und werden dann mit Hilfe von molekularem Sauerstoff oxidiert. Die erste enzymatische Transformation von Fremdstoffen findet nach der Aufnahme durch den Körper in der Leber statt. Aufgrund dessen werden 90 % des P450 in der Leber exprimiert (Philpot, 1991), wobei die Enzymaktivitäten speziesabhängig sind. Die Expression ist aber nicht nur auf die Leber beschränkt, auch in Darm, Niere, Lunge, Gehirn und Haut sind P450-Oxygenasen zu finden. In extrahepatischen Organen

betragen die Enzymaktivitäten jedoch nur 1 bis 10 % der in der Leber gemessenen Aktivitäten. Zudem scheinen die in Nebenniere, Testes und Ovarien messbaren Enzymaktivitäten nicht am Fremdstoffmetabolismus beteiligt zu sein, sondern bei Oxidierungsreaktionen im Steroidhormonstoffwechsel eine Rolle zu spielen.

Im allgemeinen führt der Fremdstoffmetabolismus zur Detoxifizierung, in einigen Fällen können jedoch auch toxische Effekte hervorgerufen werden. Als Beispiel hierfür dient die Metabolisierung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK): Erst die Metaboliten der Phase I-Reaktionen weisen mutagenes und karzinogenes Potential auf. Verbindungen, die wie die PAK zur Bildung karzinogener Metaboliten führen, werden als sekundäre Karzinogene oder Präkarzinogene bezeichnet. Diese Bezeichnung trifft auch auf die polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine und -furane (PCDD/F) zu. Zusammen mit den dioxinähnlichen PAK und polychlorierten Biphenylen (PCB) stellen sie die klassischen Induktoren der P450-Subfamilien 1A1 und 1A2 (CYP1A1/1A2) dar. Während über den molekularen Mechanismus dieser Induktionsvorgänge schon einige gesicherte Aussagen gemacht werden können (Kapitel 4.7), sind die weiteren Auswirkungen dieser CYP1A1/1A2-Induktionen, z.B. auf das Immunsystem, zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt (s. auch Kapitel 5.5).

3.1.1 *EROD-Bioassay: Theorie*

Der EROD-Bioassay basiert auf der Bindung von PCDD/F und strukturähnlichen Molekülen an einen zytosolischen, hepatischen Rezeptor und einer direkt proportionalen Induktion des Zytochroms P4501A1. Über einen Vergleich mit einer 2,3,7,8-TCDD-Standardkurve ist ein biologischer TEQ-Wert von komplexen Proben bestimmbar (Hanberg et al., 1991). Im Folgenden ist der molekulare Mechanismus dieses sensitiven Testsystems beschrieben.

Die in die hepatische Zelle gelangten Xenobiotika binden bei entsprechenden Struktureigenschaften an einen zytosolischen Ah-Rezeptor. Dieser Rezeptor ist ein aus drei Untereinheiten bestehendes Protein mit einer Molekülmasse von 270 kDa: Eine ligandenbindende Untereinheit von 90 kDa assoziiert mit zwei Hitzeschockproteinen, auch *heatshock protein* oder hsp 90 genannt. Von diesem inaktiven Ah-Rezeptor-Komplex dissoziieren nach Bindung der Liganden/Xenobiotika die zwei hsp 90-Untereinheiten. Anschließend erfolgt die Bildung eines Heterodimers mit arnt, einem „ah-Rezeptor nuclear transport protein“. Das Dimer wird in den

Zellkern transformiert und bindet an spezifische regulatorische Sequenzen der DNA. Diese sogenannten DREs bzw. XREs (*dioxin/xenobiotic responsiv elements*) bestehen aus hoch konservierten Basen mit der folgenden Hexanukleotidsequenz 5'-TCACGC-3'.

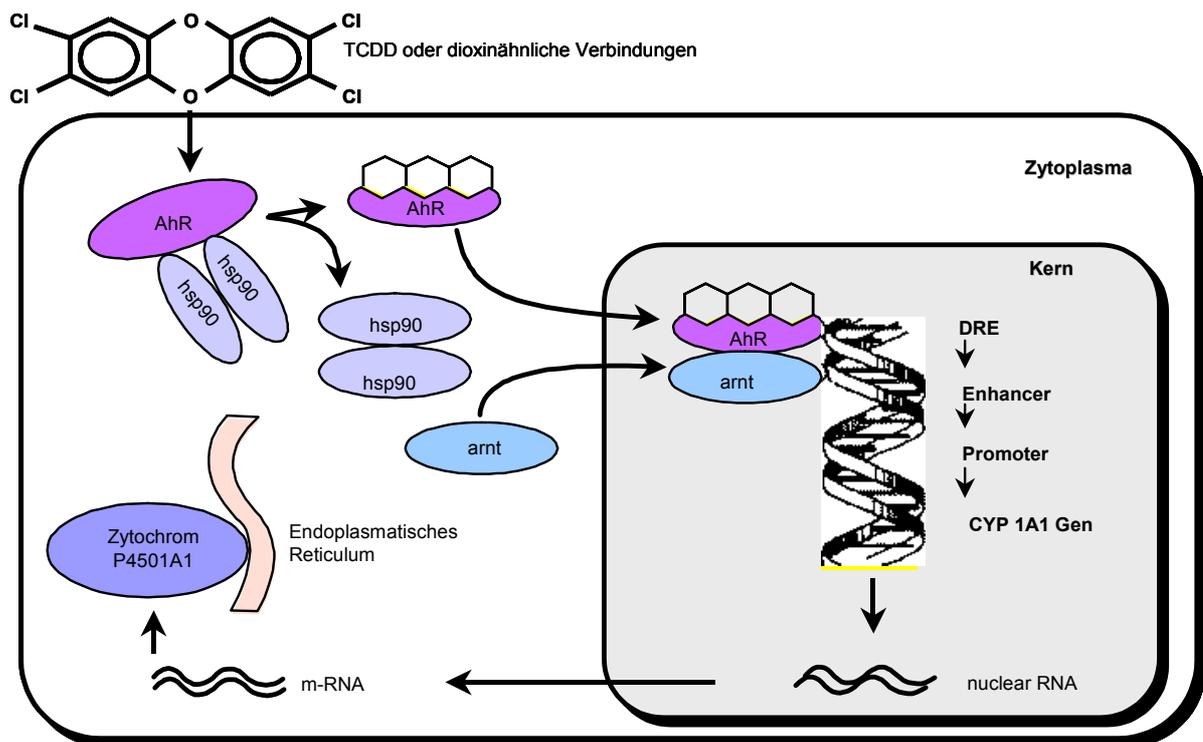


Abb. 3.1: Schema des EROD-Bioassays. Die Induktion des CYP1A1 erfolgt durch Bindung von Dioxinen oder dioxinähnlichen Molekülen an den zytosolischen Ah-Rezeptor. Die Folge ist eine Anschaltung einer komplexen Genbatterie, die u.a. zur Erhöhung einer Deethylase des CYP1A1 führt.

Als Folge der Bindung finden Transkriptionen von CYP1A1- und CYP1A2-Isoenzymen statt. Andere Enzyme, wie zum Beispiel eine UDP-Glucuronyltransferase und eine GSH-S-Transferase, werden auch induziert, so dass durch TCDD und strukturverwandte Induktoren die sogenannte Ah-Genbatterie angeschaltet wird. Nach Transkription und nach Translation der P450-Oxygenase-mRNA erhöht sich die niedrige basale P450-Oxygenase-Aktivität um ein Vielfaches. Die dadurch gestartete Metabolisierung des Fremdstoffes, der gleichzeitig Induktor ist, führt zum Abbau des Induktors, und die P450-Aktivität fällt auf den Anfangswert zurück. Nicht metabolisierbare Xenobiotika wie 2,3,7,8-TCDD sind in der Lage, das

P450-System mehrere Tage zu induzieren und unterscheiden sich dadurch zum Beispiel von den metabolisierbaren PCB.

Zur Induktion der P450-Isoenzyme CYP1A1 und -1A2 und damit auch zur Erhöhung der Deethylase-Aktivität müssen die Liganden des Ah-Rezeptors bestimmte Struktureigenschaften aufweisen. Nahezu planar, mindestens zwei aromatische Ringe und eine Größe von ungefähr $1 \times 0,3$ nm sind postulierte Eigenschaften der Induktoren. Die Affinität der Induktoren korreliert direkt mit der Induktion der P450-Oxygenasen: Je höher die Affinität zum Rezeptor ist, desto besser wird das Enzym induziert. Desweiteren weisen die dioxinverwandten Substanzen bzw. die polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe häufig eine PCDD/F-ähnliche Lipophilie auf. Diese Lipophilie und die hohe Stabilität durch Unpolarität und Reaktionsträgheit gegenüber chemischen und biologischen Abbaureaktionen sind die Ursache für die Persistenz und die Anreicherung dieser Substanzen in ökologischen Systemen und im Fettgewebe.

Die durch Zytochrom P450-Oxygenasen katalysierten Metabolisierungsreaktionen lassen sich in eine oxidative und in eine reduktive Gruppe einteilen. Tabelle 3.2 zeigt diese Phase I-Reaktionen (Berndt, 1995).

Tab. 3.2: Katalysierte Metabolisierungsreaktionen des Zytochrom P450

Oxidative Reaktionen	Reduktive Reaktionen
C-Hydroxylierung	Reduktive Dechlorierung
Epoxidation	Epoxidreduktion
Oxidative Demethylierung	Reduktion von NO ₂ -Gruppen
N-, O- und S-Dealkylierung	Reduktion von Ketogruppen
N-Hydroxylierung	Reduktion von N-Oxiden
N-Oxidbildung	
Sulfoxidation	
Oxidative Dechlorierung	
C-C-Spaltung	
C-Dehydrierung	
Ringöffnungen	
Aromatisierungsreaktionen	

Bei der Metabolisierung von aromatischen Kohlenwasserstoffen entstehen aus chemisch unpolaren und reaktionsträgen Verbindungen polare und reaktive Stoffe, wie zum Beispiel Epoxide. Die anschließenden Reaktionen können unterschiedliche Folgen haben. Im Fall der Epoxid-Umlagerung zum Phenol und bei Konjugatbildung mit Glutathion tritt Ausscheidung ein. Reagiert jedoch das stark elektrophile Epoxid mit zellulären, nukleophilen Komponenten der Zelle, wie der DNA oder der RNA, dann sind die metabolisch aktivierten Verbindungen als ultimate Karzinogene zu bezeichnen. Für eine karzinogene Wirkung eines PAKs muss die Epoxidbildung benachbart zur Bay-Region erfolgen. Als Bay-Region wird die in Abb. 3.2 dargestellte Region bezeichnet.

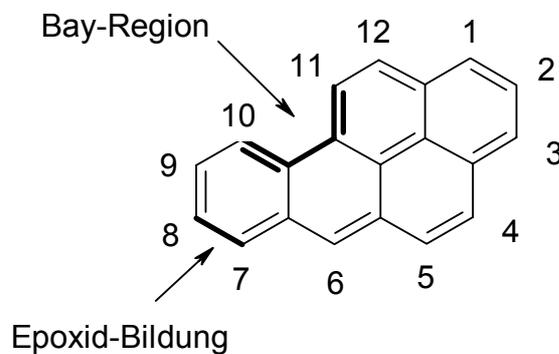


Abb. 3.2: Metabolische Aktivierungsstellen von Benz(a)pyren

Die Ausgangsverbindungen der reaktiven Metaboliten werden sekundäre Karzinogene oder Präkarzinogene genannt. Prinzipiell können alle elektronenreichen Stellen der DNA-Basen mit reaktiven Metaboliten jeder Art reagieren. Dabei sind fast alle krebsauslösenden Chemikalien gleichzeitig auch mutagen, d. h. sie können Adukte mit der DNA bilden und deren Struktur verändern.

3.1.2 Luciferase-Bioassay: Theorie

Ein auf Lumineszenz beruhender Bioassay wurde 1993 von der Arbeitsgruppe Brouwer entwickelt (Aarts et al., 1993). Die Grundlage stellt, wie beim EROD-Bioassay, die Ah-Rezeptor-Ligand-Bindung dar, jedoch mit genetisch veränderten H4IIE-Zellen. Diese auch CALUX[®]-Bioassay (CALUX = *chemical-activated luciferase gen expression*) genannte Methode ermöglicht eine Detektion von Dioxinen und dioxinähnlichen Methoden.

Ein Beispiel für Substanzen mit potentiell östrogenen Wirkung stellen Organochlorverbindungen dar. Beobachtungen in hochbelasteten Ökosystemen wie dem Lake Apopka in Florida, der infolge eines Chemieunfalls stark mit DDT und Dificol kontaminiert wurde, zeigten eine Veränderung der primären Geschlechtsorgane bei Alligatoren und damit eine deutliche Beeinträchtigung der Reproduktionsfähigkeit der Population (Guillette et al., 1996).

Neben den ökotoxikologischen Erfassungen werden auch epidemiologische Beobachtungen hinsichtlich des Einflusses östrogenaktiver Verbindungen auf das endokrine System des Menschen gemacht. Offen ist zum Beispiel die Frage, ob ein vermehrtes Auftreten von Entwicklungsstörungen der männlichen Fortpflanzungsorgane sowie eine verminderte Spermienzahl und -qualität mit einer möglichen Exposition durch endokrine Disruptoren in utero in Verbindung steht (Sharpe und Skakkebaek, 1993).

Die bisherigen Anhaltspunkte aus der Epidemiologie und Ökotoxikologie werfen vielfältige Fragen in Bezug auf eine Risikoabschätzung potentieller Disruptoren auf. Verschiedene internationale und nationale Gremien sehen vor allem bei der Entwicklung und Validierung funktioneller In-vitro-Systeme Forschungsbedarf (OECD, 1996). Untersuchungen zu potentiellen Kombinationseffekten wie additive, synergistische und antagonistische Wirkungen sind dabei von großer Bedeutung.

3.2.1 *Östrogen-Hefe-Bioassay: Theorie*

Hefe ist ein einzelliger Eukaryont mit kurzer Generationszeit, ungiftig und lässt sich auf preiswerten Medien in großen Mengen mit geringem Aufwand leicht kultivieren. Da Hefekulturen einen gewissen Alkoholgehalt haben, ist ein Arbeiten unter der Sterilbank nicht unbedingt erforderlich.

Die Hefe ist vollständig durchsequenziert und besitzt 50 % aller Gene, die im Menschen an Krankheiten beteiligt sind, im kleinen Genom. Sehr wahrscheinlich haben 31 % der Hefegene Verwandte im Säuger. Der Hefezellzyklus ist trotz asymmetrischer Teilung von Hefezellen dem Säuger sehr ähnlich. Zellzyklusgene der Hefe können durch ihr Homologes aus Säugern funktionell ersetzt werden, was Rückschlüsse auf die Funktion dieser Gene in den schwerer zu untersuchenden Säugierzellen erlaubt. Umgekehrt lassen sich einige Säugergene durch ihr Hefehomologes komplementieren.

Der im In-vitro-Assay verwendete Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* ist durch zwei genetische Veränderungen in der Lage, Wechselwirkungen zwischen östrogenartigen Verbindungen und dem humanen Östrogenrezeptor zu detektieren (Abb. 4.13). Durch die Veränderungen enthalten die Hefen zum einen die Erbinformation für den menschlichen Östrogenrezeptor in exprimierbarer Form (unreguliert oder unter Kontrolle des Metallothioneinpromotors), zum anderen ein sogenanntes Reporterogen, in dessen Promotorbereich Östrogen-responsive Sequenzen (EREs) einkloniert sind. Bei Wechselwirkung des mit (Xeno)östrogen beladenen Rezeptors mit den EREs wird die Transkription des Reportergens initiiert und somit nachfolgend das Reportergenprodukt, die β -Galaktosidase, von der Zelle hergestellt. Die Menge der β -Galaktosidase, und damit ihre Aktivität ist in einem gewissen Konzentrationsbereich proportional zur (Xeno)östrogenkonzentration (Routledge und Sumpter, 1996). Die Aktivität der β -Galaktosidase wird nach Aufschluss der Hefezellen photometrisch mit dem chromogenen Substrat *ortho*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid ((oNPG), Flaschentest, (Rehmann et al., 1999)) oder mit Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid ((CPRG), Plattentest, (Beresford et al., 2000)) bestimmt.

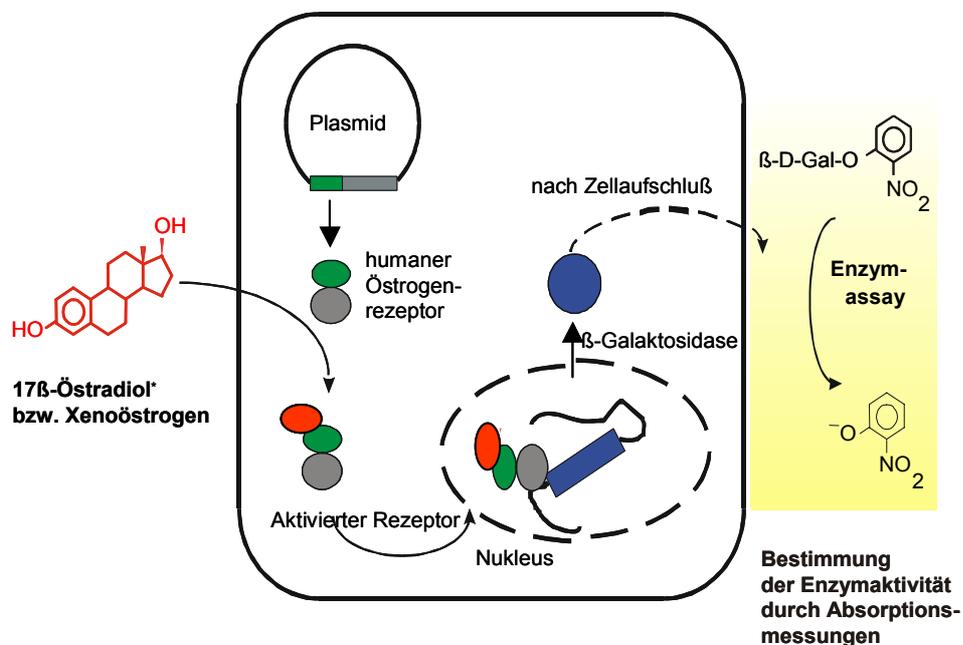


Abb. 3.4: Vereinfachte Darstellung des molekularen Mechanismus des Hefe-Östrogen-Bioassays

Der Unterschied zu anderen Östrogen-Screen-Assays liegt vor allen Dingen in dem fehlenden Stoffwechselmetabolismus, den die genetisch veränderten Hefezellen nicht aufweisen. Screening-Systeme mit metabolisierenden Zellen werden überwiegend mit humanen MCF-7-Brustkrebszellen und EFM-19-Brustkrebszellen durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Metaboliten ermöglicht die Bioaktivierung durch Rattenhepatomzellen H4IIE (s. auch Kapitel 7). Die Unterscheidung, ob einzelne Substanzen oder deren Metaboliten zu Eingriffen in das endokrine System führen, wird jedoch auf direktem Weg nicht möglich.

3.3 Dioxine und dioxinähnliche Verbindungen

3.3.1 PCDD, PCDF

Unter dem Begriff „Dioxine“ werden polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und Dibenzofurane (PCDF) verstanden. In Abb. 3.5 sind die Grundgerüste dieser Verbindungen dargestellt.

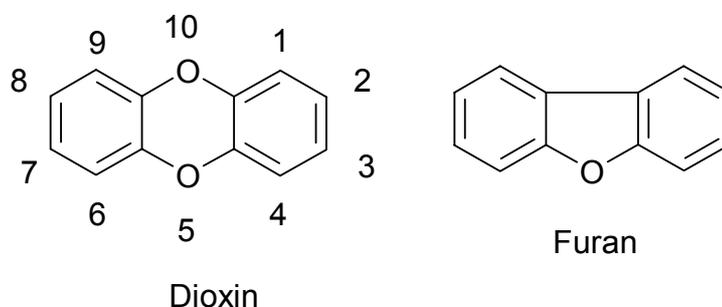


Abb. 3.5: Grundgerüste der polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine und -furane (PCDD/F)

Die Bildung von polychlorierten Dioxinen und Furanen findet in Gegenwart von Chlor bei praktisch allen Verbrennungsprozessen oder Erwärmungsprozessen oberhalb 200 °C statt. Als unvermeidbare Verunreinigungen treten die meisten der theoretisch möglichen 210 PCDD- und PCDF-Verbindungen in einer Vielzahl von industriellen und thermischen Prozessen auf. Die Homologen der Verbindungen unterscheiden sich durch die Zahl der Chloratome voneinander, wobei acht verschiedene Homologe existieren (mono bis octa substituiert). Die Isomeren eines Chlorierungsgrades sind

durch die unterschiedliche Stellung der Chloratome im Molekül gekennzeichnet. Zum Beispiel beträgt die Anzahl der Isomeren pro Homologengruppe für TCDD 22 und für TCDF 38. Die Isomere aller Homologen einer Substanzklasse werden als Kongenere bezeichnet (75 PCDD-Kongenere und 135 PCDF-Kongenere).

Neben der Müllverbrennung verursachen andere industrielle Prozesse eine Belastung der Umwelt mit Dioxinen und Furanen, z.B. Verfahren der Halogenchemie, der Zellstoff- und Papierindustrie sowie der Metallurgie. Aufgrund ihrer chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften besitzen PCDD/F eine lange Verweildauer in der Umwelt. Ein Oberbegriff für diese persistenten Verbindungen ist POP (*persistent organic pollutant*). In höher entwickelten Tieren (Fische, Säuger) und im Menschen sind nur PCDD/F-Kongenere, die in den Positionen 2,3,7 und 8 chlosubstituiert sind, zu finden. Diese Verbindungen besitzen neben der hohen Persistenz eine toxische Wirkung. Das toxische Potential von Dioxinen und Furanen beschränkt sich auf 17 Kongenere, wovon sieben PCDD und zehn PCDF sind. Sämtliche Kongenere sind in 2,3,7,8-Position chloriert und wenigstens vierfach substituiert. Mono- bis trichlorierte Verbindungen sind nicht stabil genug, um sich in der Nahrungskette und im Menschen anzureichern. Teilweise werden diese niederchlorierten Moleküle von Bodenbakterien metabolisiert (Keim et al. 1999).

Die toxische Wirkung der 17 PCDD/F-Kongenere ist stark unterschiedlich. Mittels tierexperimenteller und epidemiologischer Studien wurden für jede Verbindung Toxizitätsäquivalentfaktoren (TEF) bestimmt. Die Summe der Produkte aus TEF und Konzentration der in einer Probe enthaltenen Verbindungen wird als TEQ (*international toxic equivalent*) der Probe bezeichnet:

$$\sum_{i=1}^n c_i \cdot I\text{-TEF}_i = I\text{-TEQ}.$$

Dieser Wert gibt damit das toxische Potential der Probe wieder, und zwar im Vergleich zum toxischsten PCDD, dem 2,3,7,8-TCDD.

Toxizitätsäquivalentfaktoren (TEF) wurden mit verschiedenen Modellen bestimmt, die sich u. a. aufgrund von zunehmenden toxikologischen Kenntnissen unterscheiden. Angewendet werden zur Zeit zwei Modelle, wobei das eine auf NATO/CCMS-Studien beruht, und das andere als WHO-Modell bezeichnet wird. TE-Faktoren aus NATO/CCMS-Studien werden als I-TEF, die daraus errechneten TEQ-Werte als I-

TEQ bezeichnet. Die 1998 eingeführten Faktoren der WHO und die entsprechenden TEQ-Werte erhalten das Präfix WHO oder die folgende Bezeichnung I-TEQ^{WHO}. Tab. 3.3 zeigt die TEF der WHO (1998), aus NATO/CCMS-Studien (1988) und aus EROD-Studien durchgeführt mit H4IIE-Zellen.

Tab. 3.3: Toxizitätsäquivalentfaktoren (TEF) für PCDD/F nach WHO (1998), NATO/CCMS (1988) und EROD-Bioassay (H4IIE-Zellen). Die EROD-TEF wurden bestimmt durch Schmitz (1995), Safe et al. (1991), Sanderson et al. (1996) und Hofmaier (1999). Ein Übersichtsartikel dazu wurde von Behnisch et al. (2001 a) erstellt.

PCDD/F Kongener	TEF					
	WHO	NATO/CCMS	EROD			
			48 h	72 h	72 h	24 h
1998	1988	Schmitz et al.	Safe et al.	Sanderson et al.	Hofmaier	
2,3,7,8-TCDD	1	1	1	1	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	0,5	-	0,01	0,30	0,51
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1	-	0,05	-	-
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1	-	-	-	-
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1	-	-	-	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01	-	-	-	-
OCDD	$1 \cdot 10^{-4}$	0,001	-	$3 \cdot 10^{-4}$	-	0,003
2,3,7,8-PCDF	0,1	0,1	0,43	0,09	-	0,17
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,05	0,003	-	-	-
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,5	0,6	1,4	0,28	-
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,2	0,49	-	-
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,06	0,15	-	-
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1	-	-	-	-
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1	0,03	-	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01	-	-	-	-
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01	-	-	-	-
OCDF	$1 \cdot 10^{-4}$	0,001	-	-	-	-

Die WHO- und NATO/CCMS-TE-Faktoren sind für drei PCDD/F-Kongener (1,2,3,7,8-PCDD, OCDD und OCDF) auf unterschiedliche Werte festgelegt. Verglichen mit den EROD-Bioassay-TE-Faktoren weist besonders der NATO/CCMS-TEF für 1,2,3,7,8-PCDD die größte Übereinstimmung mit dem EROD-TEF auf.

Schwirzer (1998) untersuchte im Gemisch 10 PCDD/F-Kongenere und stellte einen EROD-TEQ ungefähr 34 % höher als der NATO/CCMS-TEQ-Wert fest. Ein in dieser Arbeit dargestellter Vergleich zur Verwendung von TE-Faktoren bei der TEQ-Wert-Berechnung von luftgetragenen Emissionen zeigt keine großen Differenzen zwischen den WHO- und NATO/CCMS-TEQ-Werten (s. Kapitel 5.2.1 und 5.2.2). Aufgrunddessen und ihrer mittlerweile breiten Akzeptanz wurden zur Berechnung der in dieser Arbeit genannten TEQ-Werte die WHO-TEF verwendet.

3.3.2 PCB

Bis heute dürften weltweit etwa 1,5 Millionen Tonnen dieser Verbindungsklasse synthetisiert worden sein (Ballschmiter und Bacher, 1996; s. auch Abb. 3.6).

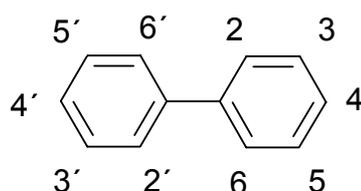


Abb. 3.6: Grundgerüst der polychlorierten Biphenyle (PCB)

Die persistenten polychlorierten Biphenyle (PCB) wurden z.B. als komplexe technische Gemische in großen Mengen für den Einsatz als nicht flammbare Kühl- und Schmierstoffe sowie als dielektrische Flüssigkeit für Transformatoren hergestellt. Neben dieser Altlast ist als weitere Quelle die industrielle Produktion technischer PCB-Mischungen zu nennen. Unerwünschte PCB-Bildung und das zu mindestens 10 % findet bei Verbrennungsprozessen statt (Sakai et al., 2001).

Toxische Wirkung haben nach tierexperimentellen und epidemiologischen Studien 16 PCB. Die Nomenklatur dieser Kongenere erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach Ballschmiter. In Tabelle 3.4 sind die Faktoren zur Berechnung von Toxizitätsäquivalenten für PCB-haltige Proben angegeben. Die Grundlage zur Festlegung der PCB-Faktoren bildet das 2,3,7,8-TCDD mit dem TEF-Wert von 1,0.

Tab. 3.4: Toxizitätsäquivalentfaktoren (TEF) für PCB (Ballschmüter) nach WHO (1998) und EROD-Bioassay (H4IIE-Zellen). Die EROD-TEF wurden bestimmt durch Hanberg et al. (1990), Schmitz et al. (1995), Safe et al. (1991), Sanderson et al. (1996) und Hofmaier (1999). Übersichtsartikel wurden von Behnisch et al. (2001 a und b) erstellt.

PCB Kongener		TEF					
Bezeichnung	#	WHO ^{human}	EROD				
			24 h	48 h	72 h	72 h	24 h
		1998	Hanberg et al.	Schmitz et al.	Safe et al.	Sanderson et al.	Hofmaier
3,3',4,4'-TeCB	77	$1 * 10^{-4}$	$8 * 10^{-4}$ bis 0,001	$1 * 10^{-4}$	$9 * 10^{-4}$	$3 * 10^{-4}$	$2,4 * 10^{-4}$
3,4,4',5-TeCB	81	$1 * 10^{-4}$	-	-	-	0,0069	-
2',3,4,4',5-PeCB	123	$1 * 10^{-4}$	-	$1 * 10^{-4}$	-	-	-
2,3',4,4',5-PeCB	118	$1 * 10^{-4}$	$2 * 10^{-6}$	$4 * 10^{-6}$	-	$< 1,5 * 10^{-6}$	-
2,3,3',5,6-PeCB	114	$5 * 10^{-4}$	-	$7 * 10^{-5}$	-	-	-
2,3,3',4,4'-PeCB	105	$1 * 10^{-4}$	$< 9 * 10^{-5}$	$1 * 10^{-5}$	-	$< 1,5 * 10^{-6}$	$2,8 * 10^{-5}$
3,3',4,4',5-PeCB	126	0,1	0,1	0,2	0,8	0,047	0,15
2,3',4,4',5,5'-HxCB	167	$1 * 10^{-5}$	$2 * 10^{-6}$	$8 * 10^{-6}$	-	-	-
2,3,3',4,4',5,-HxCB	156	$5 * 10^{-4}$	$1 * 10^{-4}$	$6 * 10^{-5}$	-	-	-
2,3,3',4,4',5',-HxCB	157	$5 * 10^{-4}$	$4 * 10^{-5}$	$5 * 10^{-5}$	-	-	-
3,3',4,4',5,5'-HxCB	169	0,01	$5 * 10^{-3}$	0,003	0,008	0,0015	0,0011
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	189	$1 * 10^{-4}$	-	$< 1 * 10^{-6}$	-	-	-

Die WHO-TE-Faktoren für PCB-Kongenerer liegen überwiegend höher als die EROD-TE-Faktoren. Dies zeigt sich auch in der Analyse eines PCB-Standardgemisches, deren Ergebnis ein um 20 % kleinerer EROD-TEQ-Wert im Vergleich zum WHO-Wert war (Schwirzer, 1998). Um die Schwankungen innerhalb der EROD-TEF zu erklären, müsste eine größere Datemenge vorhanden sein. Zur Bestimmung von PCB-TEF mittels EROD-Bioassay scheint eine Inkubationszeit der H4IIE-Zellen mit dem jeweiligen PCB-Kongener zwischen 24 h – 48 h sinnvoll.

3.3.3 Toxizität von PCDD/F und PCB

Die toxische Wirkung der PCDD/F und PCB stand im Jahr 1976 nach dem Seveso-Unglück im Mittelpunkt des öffentlichen Interesses. Wie im Vietnamkrieg (1962-1970), als die USA ein mit TCDD verunreinigtes Entlaubungsmittel auf eine 20

Millionen Hektar große Fläche aufbrachte, wurden akute Effekte, wie z.B. Chlorakne und Versagen bestimmter Leberfunktionen (Hepatotoxizität), beobachtet. Tausende Tiere starben unmittelbar. Zudem wirken diese Verbindungen über lange Zeiträume

- Reproduktionstoxisch: Nach dem Vietnamkrieg und dem Seveso-Unglück wurde ein deutlicher Anstieg an Totgeburten und Missbildungen festgestellt. Der unmittelbare Zusammenhang wird jedoch von einigen Experten bestritten. In Tierversuchen konnte für 2,3,7,8-TCDD ein erhebliches fötotoxisches und teratogenes Potential aufgezeigt werden. Die empfindlichste Spezies ist die Maus, bei der bereits eine Dosis von 1 ng/kg Körpergewicht/Tag teratogene Effekte bewirkt (Gaumenspalten, Schäden an Niere und Schilddrüse).
- Immuntoxisch: Tierexperimentelle Studien zeigen immunsuppressive Wirkungen (Hinsdill et al., 1980). Eine deutliche Zunahme der Sterberate durch Influenzaviren konnte z.B. bei Mäusen nach einer einmaligen Gabe von 10 ng/kg 2,3,7,8-TCDD festgestellt werden (Burelson et al., 1993).
- Tumorpromovierend: Als Tumorpromotoren werden Substanzen bezeichnet, die eine Krebserkrankung nicht eigenständig auslösen, aber deren Fortgang fördern (Viluksela et al., 2000). Zwei Ursachen konnten bisher dafür bei Dioxinen und dioxinähnlichen Molekülen festgestellt werden:
Der durch den Ah-Rezeptor vermittelte Einfluss von PCDD/F und PCB auf Wachstumsfaktoren und Hormone kann eine Proliferation der initiierten Zellen auslösen.
Die Metaboliten der Dioxine bzw. dioxinähnlichen Moleküle reagieren direkt mit der DNA. Im Fall des Benz(a)pyrens reagiert z.B. der Metabolit Benzpyrendiolepoxid. Eine Bezeichnung der Ausgangsverbindungen, wie Benz(a)pyren, ist auch sekundäre Karzinogene oder Präkarzinogene. Die letztendlich mit der DNA reagierenden Metaboliten, wie das Benzpyrendiolepoxid, werden als ultimate Karzinogene bezeichnet.

Die Bindung von Dioxinen sowie dioxinähnlichen Substanzen an den Ah-Rezeptor scheint die Voraussetzung für die Toxizität dieser Verbindungen zu sein. Die weiteren zellulären Mechanismen sind weitgehend unerforscht. Gesichert sind jedoch eine Expressionsveränderung von einer Vielzahl an Enzymen und Veränderungen im Hormonhaushalt (s. auch Kapitel 4.7).

3.4 Neue Quellen und Materialien aus der Technik

3.4.1 Elektronik- und Plastikschrött

Das thermische Rohstoff-Recycling von Kunststoffen und Elektronikprodukten erfordert genaue Kenntnisse über Schadstoffentstehung. Temperaturabhängigkeiten, Bildungsmechanismen und Toxizitätsbewertungen sind einige Kriterien, die bei der technischen Lösungssuche zur Wiederaufbereitung entscheidend sind. Ein Beitrag, Kunststoffe und Elektronikprodukte als Ressourcen für Energie und chemische Rohstoffe nutzen zu können, ist ein von Bockhorn und Mitarbeitern konstruierter Kugelkreislaufreaktor (Bockhorn et al., 1998).

In dem Prozess der fraktionierten Pyrolyse wird das Verbrennungsmaterial ohne Vorbehandlung in verschiedene Substanzklassen getrennt. Voraussetzung dafür sind unterschiedliche Zersetzungstemperaturen der zu trennenden Verbindungen. Der von Bockhorn und Mitarbeitern konstruierte Ofen ermöglicht bei niedrigen Temperaturen (330 – 450 °C) diese schrittweise Trennung von halogenhaltigem Kunststoffmaterial in aliphatische Komponenten, wie z.B. Styrol und in umweltschädigende Halogenverbindungen. Durch eine Hintereinanderschaltung von drei Kugelkreislaufreaktoren, die hinsichtlich des Stoff- und Wärmetransportes an die Besonderheiten des Ausgangsmaterials angepasst wurden, konnten die in dieser Arbeit analysierten Proben gewonnen werden (Kapitel 4.3).

3.4.2 Flammenschutzmittel

Neben dem geschilderten technischen Lösungsweg besteht ein weiterer Ansatz zur Verminderung von Rückständen und Emissionen. Dieser ist die Verwendung neuer Einsatz- bzw. Hilfsmittel. Als Beispiel dient hierfür die Flammenschutzmittelanwendung. Um die potentielle Entstehung von polyhalogenierten Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane im Brandfall oder beim Recycling zu vermeiden, wird die Entwicklung von phosphorhaltigen und halogenfreien Flammenschutzmitteln vorangetrieben. Die toxikologische Bewertung von einem neu entwickelten phosphorhaltigen und der Vergleich zu einem halogenhaltigen Flammenschutzmittel wird in Kapitel 4.4 dargestellt.

3.4.3 Pestizide

Pflanzenschutzmittel (Pestizide) besitzen toxische Eigenschaften und stehen schon seit einiger Zeit im Verdacht hormonaktive Wirkungen zu besitzen. Aus diesem Grund wurden sieben verschiedene Gemische bekannter und neu entwickelter Verbindungen in der vorliegenden Arbeit analysiert. Insgesamt enthielten diese sieben Gemische 84 Substanzen. Folgende Gemische wurden analysiert: Pyrethroide, Triazine/Triazole, Phosphorester, Phenolderivate, Acetylsäurederivate und diverse heterozyklische Verbindungen (Kapitel 4.5). Die Testung von Phosphorestern oder anderen aufgrund ihrer Struktur nicht zur Bindung mit dem Ah-Rezeptor fähigen Verbindungen sollte durchgeführt werden, um AhR-unabhängige CYP1A1-Induktionen festzustellen. Delescluse und Mitarbeiter zeigten dieses z.B. für das Insektizid Carbaryl (Delescluse et al., 2000) und die Arbeitsgruppe Yeh für Curcumin (Ciolino et al., 1998). Diese beiden Verbindungen aktivierten trotz der fehlenden strukturellen Voraussetzungen zur Bindung mit dem Ah-Rezeptor das CYP1A1-System. Abbildung 3.7 zeigt die Struktur von Curcumin.

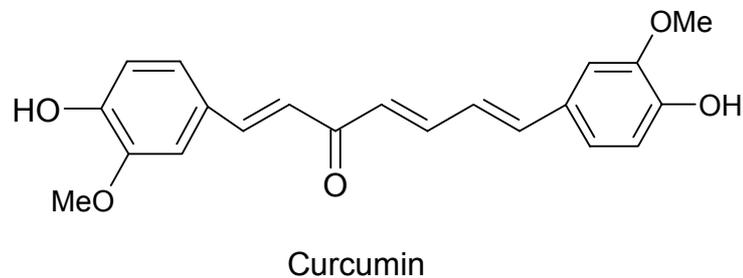


Abb. 3.7: Struktur von Curcumin

4 Methoden und Materialien

4.1 Probenahme von Emissionen und Prozessgasen

Die Probenahmen erfolgten isokinetisch nach VDI DIN 3499 Blatt 1 bzw. VDI DIN 2066, 1-8 ((VDI, 2001), (VDI, 1975)). Eine isokinetische Probenahme ist charakterisiert durch die Probenentnahme in der Geschwindigkeit des entströmenden Rauchgases. In Abbildung 4.1 ist das verwendete Probenahmesystem dargestellt.

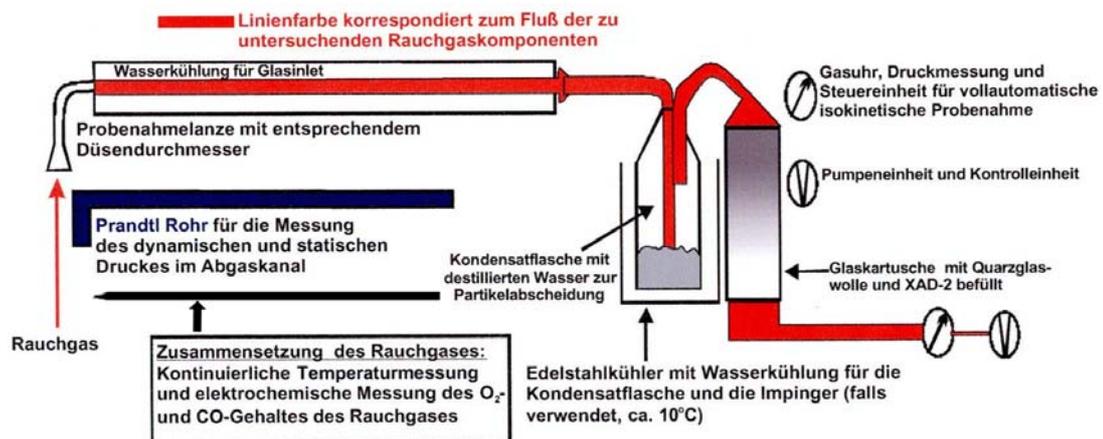


Abb. 4.1: Probenahmesystem nach VDI DIN 3499 Blatt 1 bzw. VDI DIN 2066 1-8

Als Adsorbens enthielt jede Glaskartusche 50 g XAD-2 Harz. Dieses vernetzte Polyesterol-Divinylbenzol-Kopolymer weist hohe Adsorptionsraten über einen breiten Siedebereich der untersuchten Substanzen auf. Die im Probenahmesystem variierbaren Parameter sind Druck und Temperatur. Durch Regulation des Unterdrucks und geeignete Wahl des Durchmessers der Probenahmedüse (8-12 mm) werden die Bedingungen zur isokinetischen Probenahme erfüllt (Lehnardt et al., 1998). Um eine bessere Partikelabscheidung zu erreichen und ein Durchbrechen

von Partikeln auf das Adsorbens zu verhindern, wurde eine Kondensatflasche mit destilliertem Wasser befüllt und eine mit gereinigter Quarzwolle gefüllte Kartusche dem Adsorbens vorgeschaltet. Für jede Probenahme wurden alle Glasteile und Adsorberkartuschen erneuert, so dass die Gefahr der Verschleppung von zu untersuchenden Substanzen in die nächste Probe ausgeschlossen werden konnte.

In die Auswertung einer isokinetischen Probenahme gehen die Abgasdichte, errechnet aus Abgasfeuchte und Abgaszusammensetzung, die Abgastemperatur und der dynamische und statische Druck im Abgaskanal ein. Um eine Vergleichbarkeit der gemessenen Konzentrationen zu ermöglichen, wurden die abgesaugten Volumina auf Normvolumina mit folgenden Bedingungen umgerechnet:

$$T = 0 \text{ } ^\circ\text{C}, p = 1013 \text{ mbar}, \text{O}_2 = 11 \text{ Vol}\%, \text{Feuchte} = 0 \text{ Vol}\%.$$

Die Verluste der Analyten, die z.B. durch Durchbruch oder chemische Zersetzung während und nach der Probenahme entstehen, wurden mittels isotope markierten Standards kontrolliert (s. Kapitel 5.1). Für Proben der instrumentellen Analytik wurden $^{13}\text{C}_6$ -1,2,3,4-TCDD und $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3, 7,8,9-HxCDD (500 pg/ μl), für die Proben der Bioanalytik 2,7-Dibenzo-*p*-dioxin (500 pg/ μl) verwendet.

4.1.1 *Abfallverwertungsanlage Deutschland*

Die Abfallverwertungsanlage (auch Müllverbrennungsanlage, MVA genannt) entspricht aufgrund der vorhandenen Minderungstechnologien dem Stand der Technik. In Abb. 4.2 ist ein vereinfachtes Schema dieser Anlage dargestellt. Der Abfalldurchsatz betrug ungefähr 10 t/h und die Feuerungswärmeleistung entsprach 22 MW. Der zur Erzeugung von Dampf benötigte Kessel besteht aus einem durchgehenden Zug mit darin befindlichen Wärmetauschern. Die Wärmetauscher werden mit mechanischen Klopferwerken im Turnus von zwei Stunden von den angebackenen Flugstäuben befreit. Die Aufenthaltszeit von zwei Sekunden bei mehr als 850 °C, festgelegt in der 17. BImSchV, liegt in acht Meter Höhe über dem Rost. Die bei der Verbrennung durch den Rost zugeführte Luft wird als Primärluft, die über das Brenngut geblasene Luft als Sekundärluft bezeichnet.

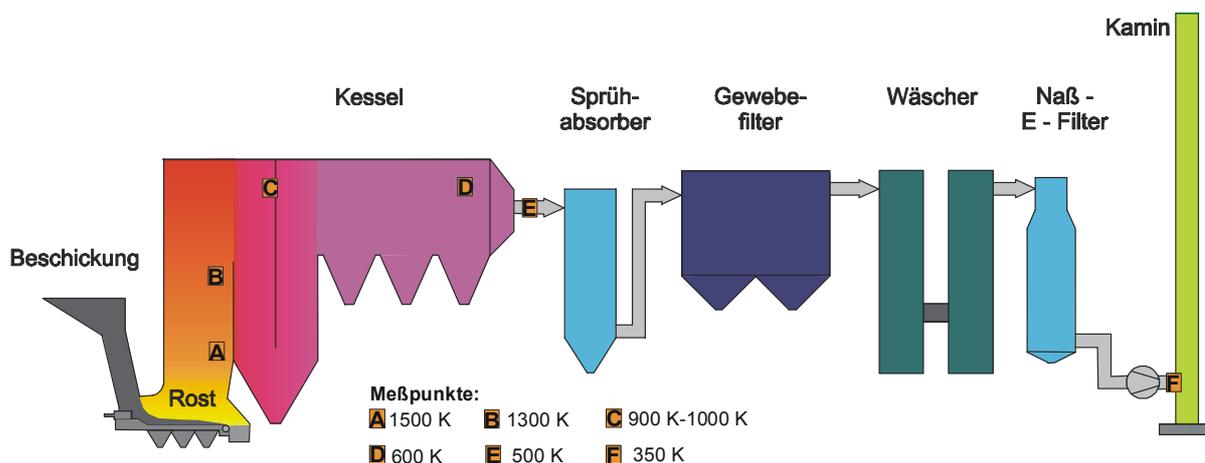


Abb. 4.2: Schema einer Abfallverwertungsanlage

Die Probenahmestellen befanden sich u.a. am Ende des Abhitzekeessels bei 200 °C und im Reingasbereich bei 90 °C. Tabelle 4.1 zeigt die Anzahl der Proben und die zur Untersuchung verwendeten Analysemethoden.

Tab. 4.1: Probenanzahl der Abfallverwertungsanlage

Probenahmestelle	Probenanzahl	Analytik
Reingas, 90 °C	9	Bioassays + instrumentelle Analytik
Ende des Abhitzekeessels, 200 °C	1	Bioassays + instrumentelle Analytik

Die genannten Proben wurden über einen Zeitraum von drei Wochen gezogen, weitere 28 Proben ausschließlich mit der instrumentellen Analytik bearbeitet und zu Studien über den Mechanismus der Dioxinbildung verwendet (Blumenstock, 2002). Die Durchführung der einzelnen Reinigungsschritte ist in Kapitel 4.2 aufgeführt.

4.1.2 Krankenhausabfallverbrennungsanlage (KMVA) Griechenland

Die Krankenhausabfallverbrennungsanlage (auch Krankenhausmüllverbrennungsanlage, KMVA genannt) stellt eine landestypische Verbrennungsanlage für Krankenhausmüll dar, die keine adsorptiven oder katalytischen Verfahren zur Abgasreinigung besitzen (Abb. 4.3).

Als Verbrennungsmaterialien dienten Plastikbeutel, Ampullen, Verbandsmaterial und auch Spritzenrückstände. Pro Tag wurden ungefähr 30 Säcke innerhalb einer Stunde

in den Feuerungsraum gegeben. Die Anlage lief täglich sechs Stunden, sechs Tage pro Woche und insgesamt 313 Tage im Jahr. Die Probenahme fand bei einer Temperatur von ungefähr 10 °C in 15 m Höhe statt.

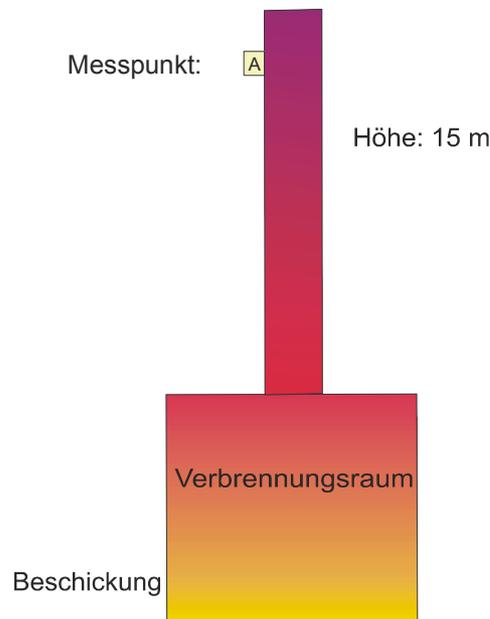


Abb. 4.3: Schema einer Krankenhausabfallverbrennungsanlage: Die Anlage weist keine adsorptiven oder/und katalytischen Minderungstechnologien auf.

Insgesamt wurden drei Proben entnommen, wovon eine Probe parallel den In-vitro-Bioassays und der konventionellen Analytik zugeführt wurde. Die Durchführung der einzelnen Reinigungsschritte ist in Kapitel 4.2 beschrieben.

4.1.3 Olivenölfabrik Griechenland

In der Fabrik wird Olivenöl durch die sogenannte „zweite Pressung“ gewonnen. Darunter ist folgender Prozess zu verstehen: Die Maische der ersten Pressung wird in einer ca. 20 m langen Drehtrommel bei 350 °C getrocknet, anschließend mit geringen Mengen Zitronenöl versetzt und in großen Tanks mit n-Hexan extrahiert. Das als Extraktionsmittel fungierende n-Hexan wird durch Kühlung und mittels einer damit auftretenden unterschiedlichen Dichte vom Olivenöl getrennt. Die Trennung vom organischen Lösungsmittel verläuft laut Hersteller rückstandsfrei. Das nach diesem Verfahren gewonnene Öl wird in Italien weiterverarbeitet und schließlich als Olivenöl zweiter Pressung auf den internationalen Markt gebracht.

Der Betrieb der Anlage ist mit starker Geruchsbelästigung verbunden und beträgt 15 h pro Tag, 6 Tage pro Woche und 95 Tage pro Jahr. Die Proben wurden in 20 m Höhe und auf einer der beiden Grobpartikeladsorptions-Zyklone entnommen. Auf einer der vier kleineren Zykclone für Feinpartikeladsorption konnte aus statischen Gründen nicht beprobt werden. In Abb. 4.4 ist die Anlage zur Trocknung der Olivenmaische und Abführung der Prozessgase schematisch dargestellt.

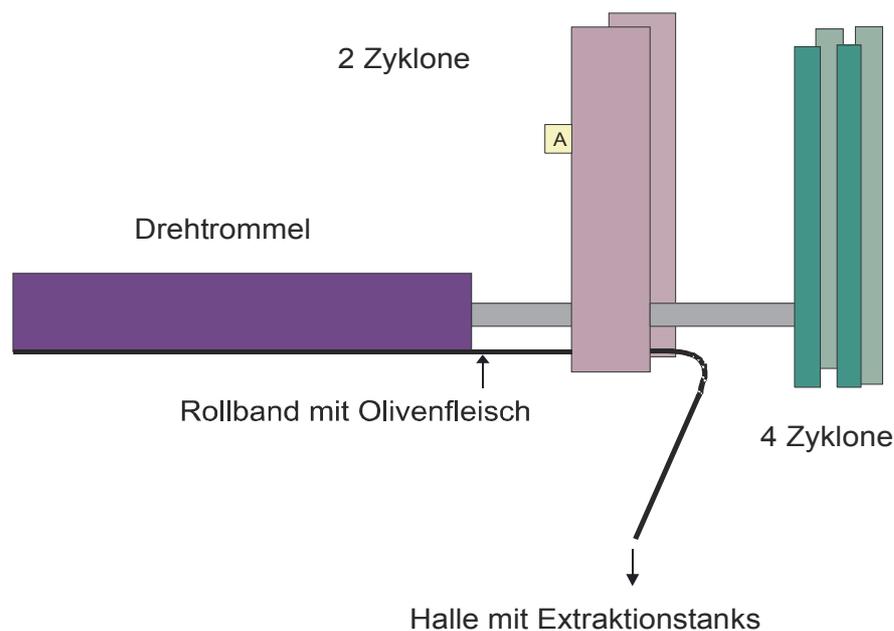


Abb. 4.4: Schema einer Olivenölproduktionsanlage: Die Anlage verfügt über insgesamt 6 Zykclone, die durch Partikeladsorption für Abgasreinigung sorgen. A kennzeichnet den Messpunkt.

Insgesamt wurden vier Proben gezogen, von denen drei ausschließlich mittels instrumenteller Analytik und eine mit den In-vitro-Testsystemen bearbeitet wurden (s. Kapitel 4.2).

4.1.4 Sekundäre Eisenverwertungsanlage Griechenland

In dieser zur griechischen Großindustrie zählenden Anlage werden aus osteuropäischem und griechischem Schrott u.a. diverse Brückenstützen hergestellt. Der Schrott, z. B. Altfahrzeuge oder Eisenbahnschienen, wird im Lichtbogenofen geschmolzen. Ein Schmelzyklus dauert zwischen 45 und 70 Minuten mit einer Unterbrechung von 15 bis 25 Minuten. Pro Zyklus wird eine Leistung von 35 MW

benötigt, um 75 Tonnen Schrott zu schmelzen. Die Abluft der Halle und die des Schmelztiegels wird unterschiedlichen Schornsteinen zugeführt. Die benötigten Proben wurden jeweils in 40 m Höhe entnommen. Die Anlage befindet sich im Dauerbetrieb und nur an 15 Tagen pro Jahr steht die Produktion. Das Volumen der Hallenabluft betrug ca. 170 000 m³ pro Stunde (normiert) und der Ausstoß am Prozessabluftschornein ca. 420 000 m³/h (normiert). In der nachfolgenden Abb. 4.5 ist das Anlagenschema zu sehen.

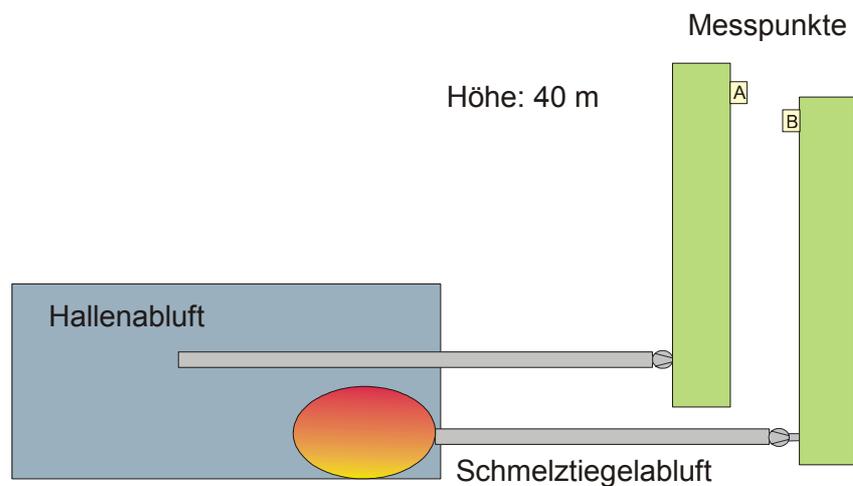


Abb. 4.5: Schema einer sekundären Eisenproduktionsanlage: Die Anlage verfügt über insgesamt zwei Schornsteine, die Hallenabluft und Prozessabluft abführen. A und B kennzeichnen die Messpunkte.

Zwei der insgesamt sechs Proben wurden der instrumentellen Analytik und den In-vitro-Bioassays zugeführt. Die restlichen vier Proben wurden ausschließlich mit den instrumentellen Methoden analysiert (s. Kapitel 4.2).

4.2 Extraktion und Reinigungsschritte von Emissionsproben

Die hier aufgeführten Arbeitsmethoden basieren überwiegend auf Standardarbeitsanweisungen nach EN 17025 (*standard operating procedures*, SOP) des akkreditierten Dioxinlaboratoriums des Institutes für Ökologische Chemie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg (DIN EN ISO/IEC 17025, 2000).

4.2.1 Extraktion

Die Extraktion der Emissionsproben erfolgte mit 500 ml-Soxhletapparaturen, 1 L Kolben und der kompletten XAD-2 enthaltende Glaskartusche. Für jede Emissionsprobe wurden 750 ml Toluol_{reinst} als Extraktionsmittel verwendet. Die Extraktionsdauer betrug 24 h. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer auf 2-3 ml bei 60 °C und 110 mbar eingeengt.

4.2.2 Einsäulen-cleanup-Bioassays

Die im Folgenden beschriebene Bioassay-Säule wird mit geringeren Mengen an Silikagelen auch als erster Schritt innerhalb der instrumentellen Analytik der PCDD/F verwendet (s. Sandwich-Säule).

4.2.2.1 Bioassay-Säule

Prinzip

Das Einsäulen-cleanup besitzt die Eigenschaften zweier in der instrumentellen Analytik angewandten Säulen: Vor- und Sandwichsäule. Mit dieser Methode werden Störfaktoren, zytotoxische Verbindungen und nicht persistente Induktoren des P450-Systems, abgetrennt (Schwirzer, 1998).

Die desaktivierte Silikagel-Schicht hält vor allem polare organische Verbindungen zurück. Durch die schwefelsaure Schicht werden oxidierbare Naturstoffe und PAK abgetrennt.

Durchführung

Die Säule wurde von oben nach unten mit folgenden Substanzen trocken gepackt: 10 g Natriumsulfat^a, 10 g aktives Silikagel^b, 20 g schwefelsaures Silikagel^c (imprägniert mit 44 Gewichtsprozent H₂SO₄), 40 g desaktiviertes Silikagel^d (imprägniert mit 4 Gewichtsprozent destilliertem H₂O) und 10 g Natriumsulfat^e. Die Konditionierung erfolgte mit 200 ml n-Hexan und 10 Volumenprozent Dichlormethan. Nach dem Auftrag des XAD-2-Extraktes wurde mit 870 ml n-Hexan und 8,7 ml Dichlormethan (als Gemisch) eluiert. Das vollständige Eluat wurde unter Vakuum auf 2-3 ml eingeeengt und anschließend unter Stickstoffstrom auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht.

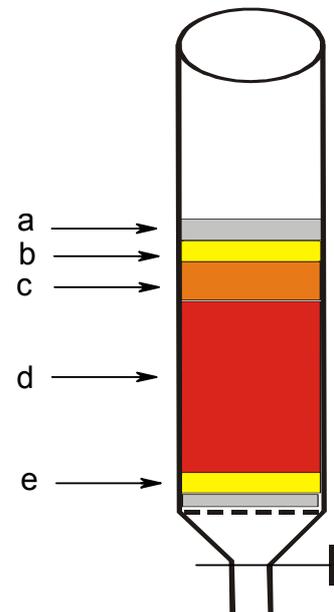


Abb. 4.6: Zusammensetzung der Bioassay-Säule

4.2.3 Säulenchromatographische Reinigung für die instrumentelle Analytik

Die Trennungsschritte der instrumentellen Analytik sind vielfältig und in den folgenden Schemata abgebildet. Abbildung 4.7 zeigt das PCDD/F-Flussdiagramm, die Abbildung 4.8 das PCB-Flussdiagramm. Die chromatographischen Reinigungsschritte sind in einzelnen Arbeitsvorschriften des Dioxinlaboratoriums, SOP (*standard operating procedure*), beschrieben.

In Kapitel 4.2.3.1 werden die einzelnen Reinigungsschritte hinsichtlich ihres Prinzips und der Präparation beschrieben.

Extraktion und Reinigungsschritte von Emissionsproben

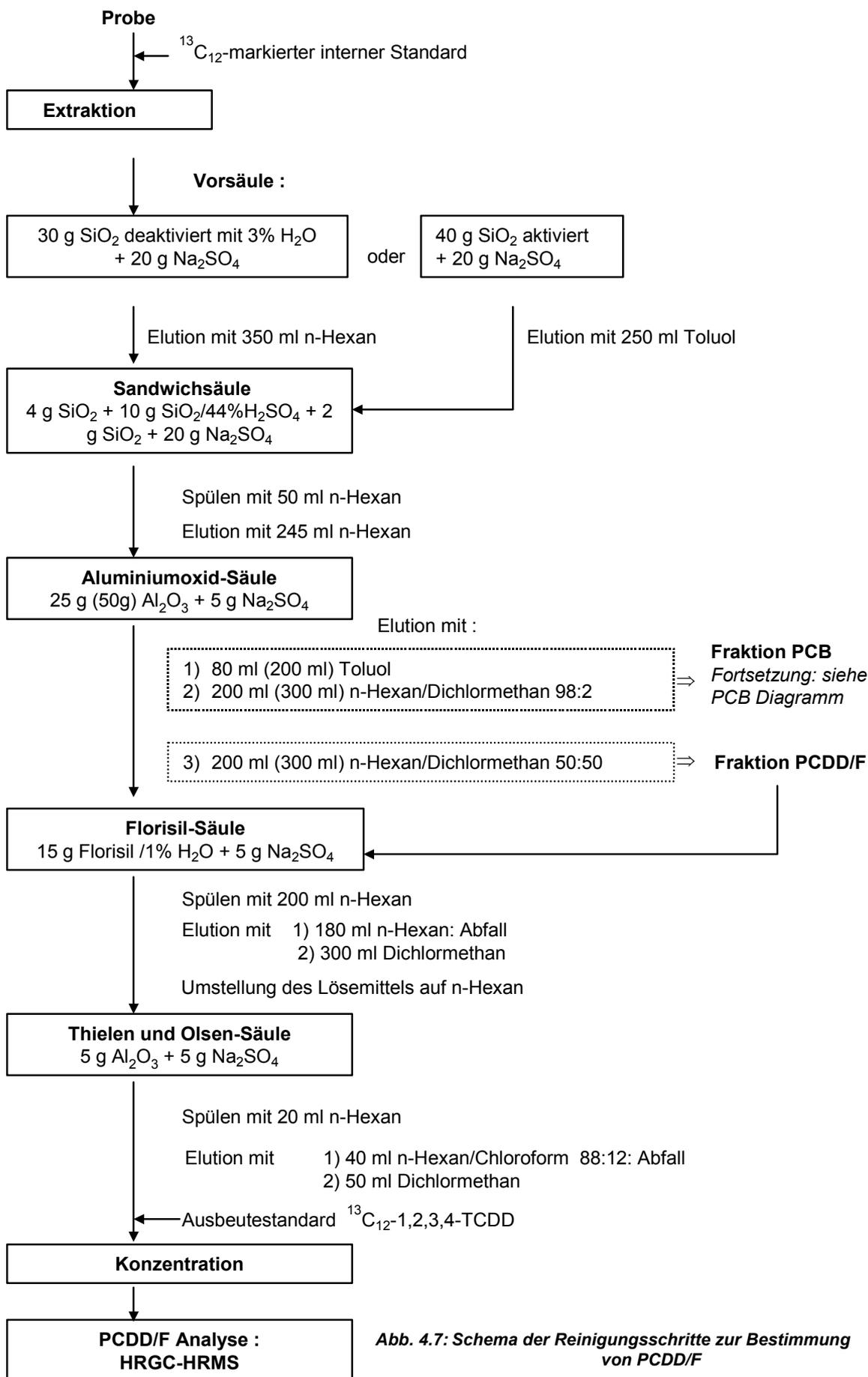


Abb. 4.7: Schema der Reinigungsschritte zur Bestimmung von PCDD/F

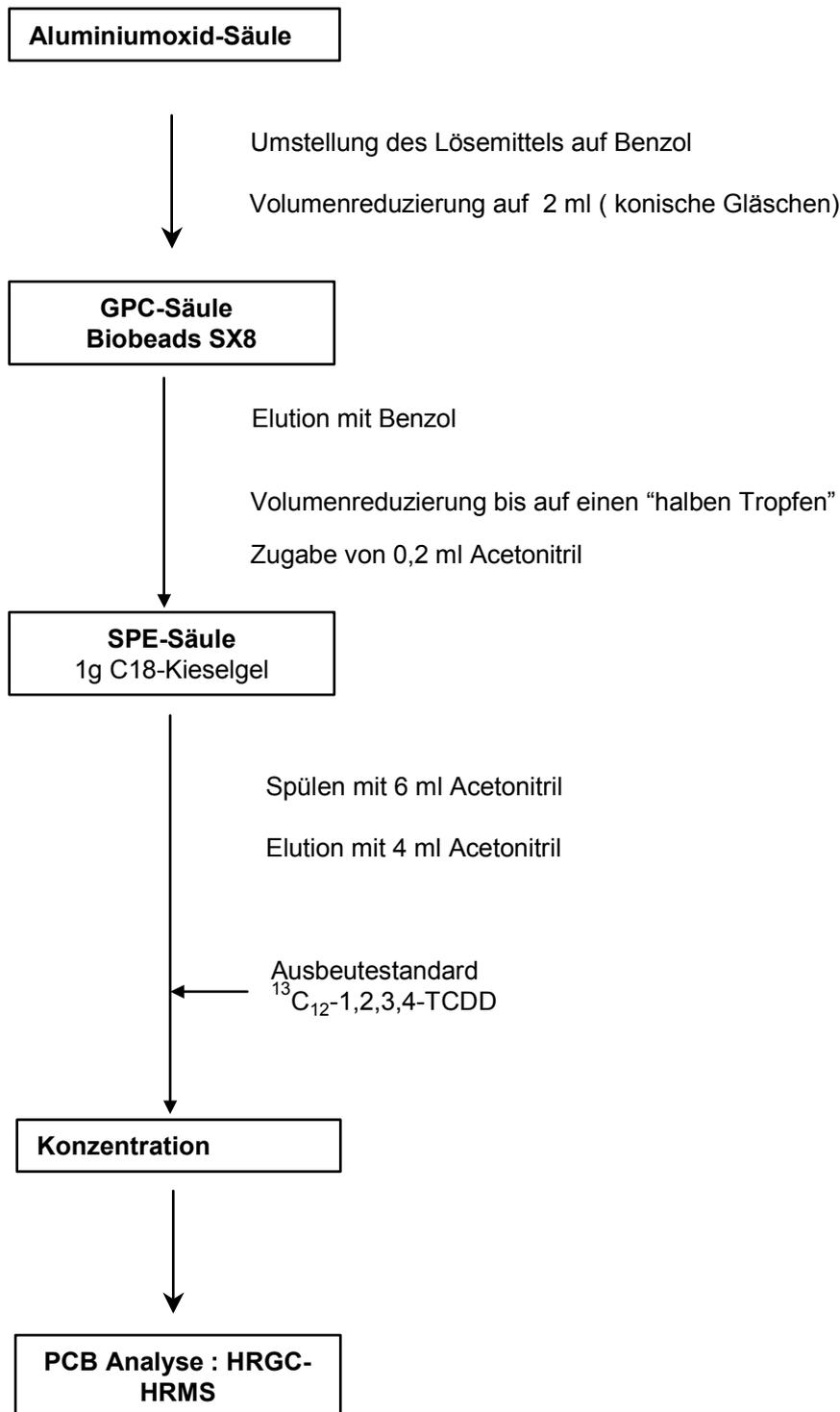


Abb. 4.8: Schema der Reinigungsschritte zur Bestimmung von PCB

4.2.3.1 Alox-Säule

Prinzip

Mit der Aluminiumoxid- (kurz: Alox-) Säule können Störkomponenten mit nur geringfügig abweichender physikalischer Polarität, z.B. PCB, PCN, PCDE und chlorierte monozyklische Aromaten, von den PCDD/F abgetrennt werden. Die Trennwirkung der Alox-Säule basiert auf der Wechselwirkung zwischen Lewis sauren Zentren des Adsorbens und den basischen Zentren der abzutrennenden Verbindungen, wobei vor allem 2,3,7,8-substituierte PCDD/F eine hohe Adsorptionsaffinität aufweisen (Ballschmiter und Bacher, 1996).

Durchführung

Die Alox-Säule wurde von oben nach unten mit folgenden Substanzen hergestellt: 5 g Natriumsulfat, 25 g Aluminiumoxid und 20 g Natriumsulfat. Das Konditionieren erfolgte mit 100 ml n-Hexan und 50 ml Benzen. Der auf 2-3 ml eingeeengte Extrakt der schwefelsauren Säule wurde beginnend mit 80 ml Benzen (F1-Fraktion), nachfolgend mit einem n-Hexan/Dichlormethan-Gemisch (98:2, v/v) (F2-Fraktion) und abschließend einem 200 ml n-Hexan/Dichlormethan-Gemisch (50/50, v/v) aufgetrennt. Die PCDD/F enthaltende Fraktion F3 wurde bei 60 °C und 550 mbar auf 2-3 ml mittels Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene F3-Extrakt wurde mit der Sandwich-Säule weiter aufgereinigt. Die PCB enthaltenden Fraktionen F1 und F2 wurden mit Gelpermeationschromatographie weiterverarbeitet.

4.2.3.2 Sandwich-Säule

Prinzip

In der Sandwich-Säule, auch schwefelsaure Silikasäule genannt, werden oxidierbare organische Verbindungen wie PAK durch die Schwefelsäure oxidiert/sulfoniert und anschließend durch Adsorption von den chemisch stabilen 2,3,7,8-substituierten PCDD/F abgetrennt (Ballschmiter et al., 1992).

Durchführung

Die Sandwich-Säule wurde von oben nach unten mit folgenden Substanzen hergestellt: 5 g Natriumsulfat, 4 g aktives Silikagel, 10 g schwefelsaures Silikagel (SiO₂ imprägniert mit 44 Gewichtsprozent H₂SO₄), 10 g aktives Silikagel und 5 g

Natriumsulfat. Die Säule (20 x 250 mm) wurde mit 100 ml n-Hexan konditioniert und nach Probenaufgabe mit 250 ml n-Hexan eluiert. Die Einengung des Extraktes erfolgte bei 60 °C und 550 mbar.

4.2.3.3 *Florisil[®]-Säule*

Prinzip

Mit der Florisil[®]-Säule werden noch im Extrakt enthaltene organische chlorierte Verbindungen wie PCB, PCN und PCDE von den PCDD/F abgetrennt. Die Trennwirkung von Florisil[®] (Magnesiumsilikat) basiert wie bei Aluminiumoxid auf der Lewis-Säure-Base-Wechselwirkung (Ballschmiter und Bacher, 1996). Durch geeignete Wahl des Laufmittels können Störkomponenten mit nur geringfügig unterschiedlicher Polarität abgetrennt werden.

Durchführung

Gefüllt wurde die Chromatographiesäule (20 x 250 mm) von unten nach oben mit 5 g Natriumsulfat, 15 g desaktiviertem Florisil (Florisil imprägniert mit 1 Gewichtsprozent destilliertem Wasser) und 5 g Natriumsulfat. Nach Spülen der Säule mit 200 ml n-Hexan und Auftragen der eingeeengten PCDD/F-Fraktion wurde nacheinander mit 180 ml n-Hexan und 300 ml Dichlormethan eluiert. Die n-Hexan-Fraktion enthielt überwiegend chlorierte organische Verbindungen und wurde verworfen. Die PCDD/F-haltige Dichlormethan-Fraktion wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers bei 60 °C und 980 mbar auf 1-2 ml eingeeengt.

4.2.3.4 *Thielen & Olsen-Säule*

Prinzip

Die Thielen & Olsen-Säule (Minialox-Säule) findet Anwendung, wenn eine Feinreinigung des Extraktes der Florisil[®]-Säule notwendig ist.

Durchführung

In einer Chromatographiesäule wurden 5 g Aluminiumoxid mit n-Hexan konditioniert. Die Elution der Probe erfolgte beginnend mit 35 ml Hexan/Chloroform (88/12, v/v), und dem Verwerfen diese Eluates. Mit 50 ml Dichlormethan als Elutionsmittel wurde daraufhin die TCDD-Fraktion erhalten.

4.2.3.5 *Gelpermeationschromatographie (GPC)*

Prinzip

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) trennt Verbindungen aufgrund ihrer Molekülgröße. Kleine Teilchen diffundieren in das Innere des Polyesterogels und verweilen dort länger als größere Moleküle, die vom Gel ausgeschlossen werden und infolgedessen zuerst eluieren. Folgende Verbindungen lassen sich mittels GPC-Säule abtrennen: Fettsäuren, PAK mit 5-7 aromatischen Ringen, Öle, Schwefel und einige Phthalsäureester.

Durchführung

Jeweils 2 ml wurden von den Fraktionen F1 und F2 der Alox-Säule auf die mit Polyesterogel Bio-Beads-SX-8 beschickte Säule gegeben. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 2,12 ml/min erfolgte die Elution mit 100 ml Benzen. Die ersten 60 ml Benzen wurden verworfen. Die PCB enthaltenden restlichen 40 ml wurden bei 60 °C und 450 mbar auf 2-3 ml eingengt.

4.2.3.6 *Überführung der Proben in Braunglasprobenfläschchen*

Bioassay

Alle mittels Rotationsverdampfer eingengten Probeneluate wurden schrittweise in 1,5 ml Braunglasprobenfläschchen überführt. Um das Eindampfen unter Stickstoffstrom bis zur Trockene zu vermeiden, wurde jedes Braunglasprobenfläschchen zuvor mit 200 µl DMSO versetzt. Das Endvolumen betrug bei allen Proben 200 µl DMSO.

Instrumentelle Analytik

Alle mittels Rotationsverdampfer eingengten Probeneluate wurden schrittweise in 1,5 ml Braunglasprobenfläschchen überführt, die zuvor mit 15 µl ¹³C₁₂-1,2,3,4-TCDD Ausbeutestandardlösung versetzt worden waren. Das Endvolumen betrug ca. 15 µl pro Braunglasfläschchen.

4.3 Elektronik- und Plastikschrött

4.3.1 Herkunft der Proben

Als Proben dienten Pyrolyse- bzw. Kondensationsprodukte aus gemischtem Elektronik (ES)- und Plastikschrött (PS). Sie wurden, wie auch Tabelle 4.2 zeigt, an verschiedenen Stellen des Ofens entnommen (Bockhorn et al., 1998).

Tab. 4.2: Pyrolyseproben aus einer Kaskade von drei Kugelkreislaufreaktoren

Proben-Nr.	Probenbeschreibung			
	Zustand	Ort	Temperatur	sonstiges
73	Öl	Kessel 1	330 °C	Ölabscheider, 20 % PS, 80 % ES
74	Pulver	Kessel 1	400 °C	Rückstand, ausgeheizt
75	Pulver	Kessel 1	400 °C	Rückstand, ES mit CaCO ₃
76	Öl	Kessel 2	400 °C	Kühlfalle
77	Öl	Ölabscheider 1	-	-
78	Öl	Ölabscheider 2	-	zäh

4.3.2 Extraktion

Extrahiert wurden von sechs Proben zwei Feststoffproben. Als Extraktionsmittel wurde Toluol_{reinst} verwendet. Nach 24 h Extraktion erfolgte die Trocknung über Natriumsulfat und die Toluol-Entfernung.

4.3.3 Säulenchromatographische Reinigung

Die vier Flüssigproben und die Extrakte wurden wie unter Punkt 2.2 beschrieben gereinigt und zwar beginnend mit der Bioassay-Säule. Sämtliche Reinigungsschritte der instrumentellen Analytik wurden durchgeführt. Näheres unter Anhang 8.3.1.

Die Vermessung der Proben mit der instrumentellen Analytik zeigte bei zwei Proben zu viele Störkomponenten, die mittels erneuter Thielen & Olsen-Säule und Florisil-Säule zum Teil beseitigt werden konnten.

4.4 Flammschutzmittel

4.4.1 *Herkunft der Proben und Extraktion*

Die analysierten Proben bestanden aus dem Kunststoff Polybutylenterephthalat (PBT) als Grundgerüst und Flammschutzmitteln. Als Flammschutzmittel wurden bromiertes Polystyrol und alkylierte Phosphorsäure eingesetzt. Die exakte Bezeichnung der eingesetzten Verbindungen darf hier aus patentrechtlichen Gründen nicht genannt werden. Beide Verbindungen wurden freundlicherweise von einem Flammschutzmittel herstellenden Betrieb zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden wie folgt präpariert (nähere Informationen sind in der Dissertation Milanov, N., in Vorbereitung zu finden):

Verbindung 1: PBT + 30% w/w Glaswolle + 4,5% w/w Sb_2O_3 + 9% w/w bromiertes Polystyrol

Verbindung 2: PBT + 30% w/w Glaswolle + 10% w/w alkylierte Phosphorsäure – Aluminiumsalz

Jeweils 1 g der Proben wurde mit Hilfe eines BIS-Laborofens bei 600 °C und mit einem N_2 -Fluß von 150 ml/min verbrannt. Die erhaltenen Kondensate wurden anschließend der säulenchromatographischen Reinigung ohne vorhergehende Extraktion zugeführt.

4.4.2 *Säulenchromatographische Reinigung*

Die säulenchromatographischen Reinigung wurde ausschließlich mit der Bioassay-Säule durchgeführt und verlief ohne Auffälligkeiten (Kap. 5.4.2).

4.5 Pestizide

4.5.1 *Herkunft der Proben*

Die in dieser Arbeit mit In-vitro-Testsystemen analysierten 84 Pflanzenschutzmittel wurden als Gemische getestet. Insgesamt wurden sieben verschiedene

Verbindungsklassen getestet, die zwischen 7 bis 21 Substanzen enthielten: Pyrethroide, Triazine/Triazole, Phosphorester, Phenolderivate, Acetylsäurederivate und diverse heterozyklische Verbindungen. Molekülgröße und Substituenten variierten bei den 84 Substanzen stark. Die Konzentration betrug bei allen sieben Verbindungsklassen 100 ng/µl. Einige getestete Pflanzenschutzmittel sind in Kapitel 5.4.3 dargestellt und in der Dissertation Pantiru, M.-E. (in Vorbereitung) näher beschrieben.

4.5.2 *Extraktion und Reinigung*

Es wurden weder Extraktion noch säulenchromatographische Reinigung vorgenommen.

4.6 **Interne Qualitätskontrolle mittels Flugasche**

4.6.1 *Herkunft der Probe*

Aus einer HausAbfallverwertungsanlage stammt die zur Qualitätssicherung genutzte Flugasche FAMS. Sie wurde im Jahr 1997 erhalten und in der darauffolgenden Zeit in regelmäßigen Abständen analysiert und intern mittels der instrumentellen Analytik validiert.

4.6.2 *Probenaufschluss und Extraktion*

Vor der Extraktion wurde aufgrund des hohen Carbonatgehalts ein Proben-aufschluss durchgeführt (SOP_Z01, Institut für Ökologische Chemie, GSF-Forschungszentrum): Die Einwaage von 0,5 g wurde in einem Becherglas bis zum Ende der CO₂-Bildung mit HCl versetzt. Anschließend wurde das mit einem Deckglas verschlossene Becherglas für 1 h in ein Ultraschallbad gestellt. Die Filtration der Suspension folgte mit zwei Glasfaserfiltern, Büchnertrichter und unter Wasserstrahlvakuum. Das erhaltene Filtrat war klar und wies nach Waschen des Rückstandes einen pH-Wert zwischen 6,0 und 7,0 auf. Der Rückstand wurde mit beiden Glasfaserfiltern über Nacht in einen Exsikkator gestellt. Nach 24 h Trocknung erfolgte die Extraktion mittels Papierhülse, Toluol und Soxhlett für weitere 24 h. Dem anschließenden Trocknen mit Na₂SO₄ folgte die Entfernung des Extraktionsmittels unter Hochvakuum (110 mbar) bis auf 2-3 ml. Das so vorliegende Extrakt der

Interne Qualitätskontrolle mittels Flugasche

Flugasche wurde auf die Hälfte des Gewichtes reduziert (Rückstellprobe R1, Lagerung bei –80 °C) und auf die Bioassay-Säule gegeben.

4.6.3 *Säulenchromatographische Reinigung Bioassay*

Die speziell für den EROD-Bioassay entwickelte Säule, die in Punkt 4.2.2.1 beschrieben ist, wurde angewandt. Zu beobachten war starke Oxidation, die jedoch nicht zu einem Durchbruch führte. Nach der Reduktion des Lösungsmittels und Überführung in 1,5 ml Probengläschen wurden Verdünnungsreihen hergestellt.

4.7 **EROD-Bioassay: Durchführung**

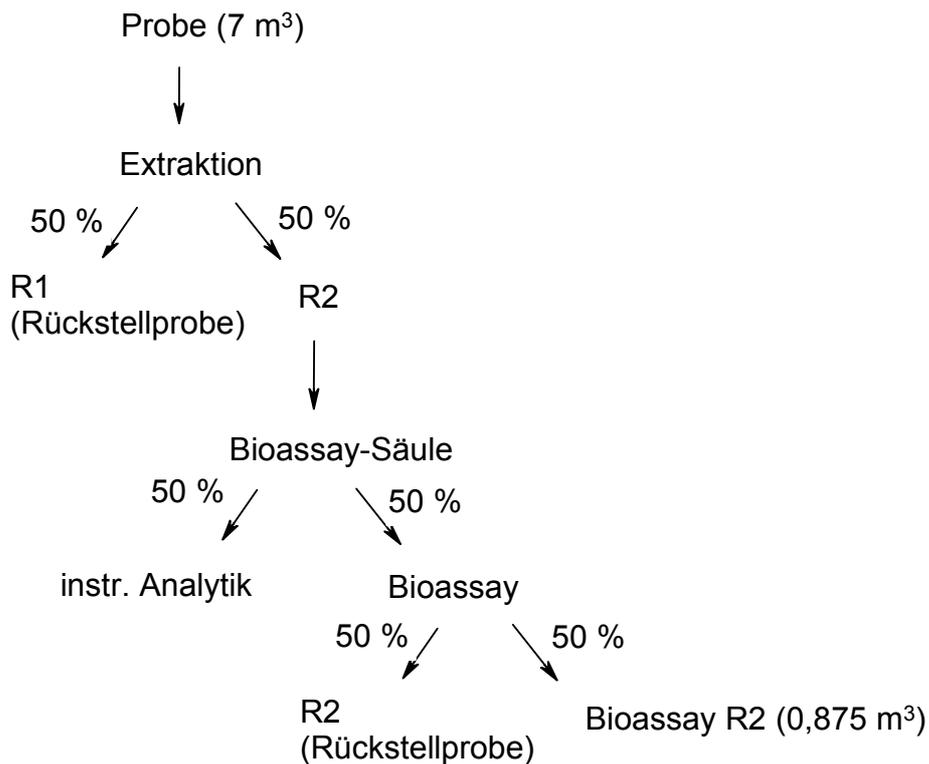
4.7.1 *Zellmaterial*

Bei der verwendeten Zelllinie H4IIEC/T3 handelt es sich um Zellen eines hepatozellulären Rattenkarzinoms H-35 [(Reuber, 1961) und (Pitot, 1964)]. Der Arbeitsgruppe von Prof. Wiebel (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Toxikologie, Neuherberg) wurde das Material 1977 von Dr. Thompson (NCL, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt und dort seit diesem Zeitpunkt kultiviert.

Während der experimentellen Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Zellchargen verwendet. Die CYP1A1-Induzierbarkeit der Zellchargen unterschied sich nur geringfügig (Daten nicht gezeigt). Der geringe Induktionsunterschied ist vernachlässigt worden, da die CYP1A1-Induktion aller im Bioassay gemessenen Umweltproben in Relation zu einer bei jeder Testreihe mitbestimmten 2,3,7,8-TCDD-Standardkurve gesetzt wurde.

4.7.2 *Durchführung*

Die Durchführung fand unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumbank (laminar flow) statt und nach den Arbeitsanweisungen (SOP_Z01-Z07) des Institutes für Ökologische Chemie. Folgende Abb. 4.9 zeigt die einzelnen Verdünnungsschritte:



Bioassay R2 (0,875 m³), gelöst in 500 µl DMSO/Isoprop

↓ 20 µl zu 3980 µl DMEM (Faktor 25)

Bioassay R2 (0,875 m³)/25

↓ 100 µl pro Loch aufgeben (Faktor 40)

Bioassay R2 (0,875 m³)/1000

Abb. 4.9: Verdünnungsschritte bei der Durchführung des EROD-Bioassays

Die Rattenhepatomzellen H4IIE wurden mit einer Startdichte von 10 000 Zellen in 100 µl DMEM pro Loch auf einer 96-Loch-Platte ausgesetzt. Nach 72stündiger Kultivierung erfolgte die Inkubation mit Emissions-, Umwelt- oder Chemikalienproben (100 µl DMEM/Probenmischung pro Loch). Die Probeninkubation fand in einem Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂-Gehalt für 24 h und 72 h statt. Nach anschließender Entfernung der DMEM/Probenmischung wurden die Zellen für eine weitere halbe Stunde mit der nicht fluoreszierenden Substanz 7-Ethoxyresorufin (8 µM + 10 µM Dicumarol) ohne Plattendeckel im Brutschrank inkubiert.

EROD-Bioassay: Durchführung

Das nach der Probeninkubation zugeführte 7-Ethoxyresorufin wird durch eine Deethylase, die dem P4501A1 zugeordnet ist, zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Die so ermöglichte Fluoreszenzmessung ist direkt proportional zur Konzentration von 2,3,7,8-TCDD und strukturähnlichen Substanzen.

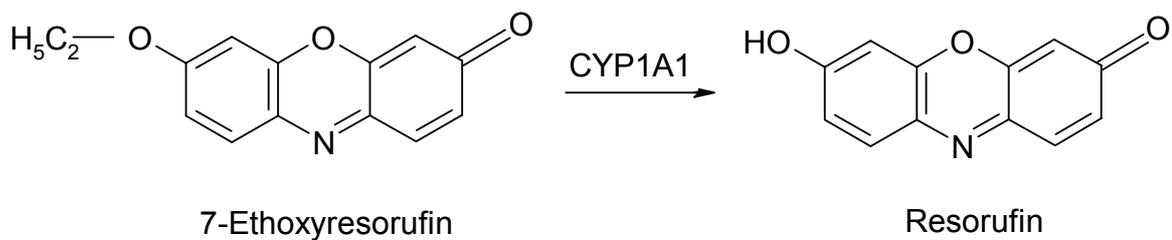


Abb. 4.10: CYP1A1-Deethylierungsreaktion von 7-Ethoxyresorufin

Die Reaktion zum fluoreszierenden Resorufin wurde mit 200 µl Ethanol pro Loch abgestoppt, die Platten geschüttelt und bei 535 nm Anregung und 590 nm Emission vermessen. Die Zellen enthaltenden Platten wurden mit PBS gewaschen und bei -20 °C für 24 h gelagert. Das Auftauen der Platten für den Proteintest nach der BCA-Methode fand mit 150 µl PBS bis zur Raumtemperatur statt. Die abschließenden Absorptionsmessungen zur Proteinbestimmung wurden bei 540 nm durchgeführt (s. auch Donato et al., 1993 a + b).

4.8 Östrogen-Hefe-Bioassay: Durchführung

Der hier vorgestellte Test erfolgte in zwei Varianten. Zum einen wurde mit 100 ml Erlenmeyer-Flaschen und Probenvolumina von 100 µl, zum anderen mit 96-Loch-Platten und Probenvolumina von 2 µl gearbeitet.

4.8.1 Zellmaterial

Bei der verwendeten Zelllinie *Saccharomyces cerevisiae* handelt es sich um gentechnisch veränderte Zellen, die in der Lage sind, den menschlichen Östrogenrezeptor zu exprimieren (Routledge und Sumpter, 1996).

Die Lagerung der Stocklösungen fand bei -80 °C und bei -20 °C statt. Die bis zu 1 ml Hefesuspension enthaltenden Eppendorfreaktionsgefäße wurden unmittelbar

nach dem Gebrauch wieder eingefroren und jede Zellsuspension maximal fünfmal verwendet. In nachfolgender Abbildung 4.12 sind Wachstumskurven dargestellt.

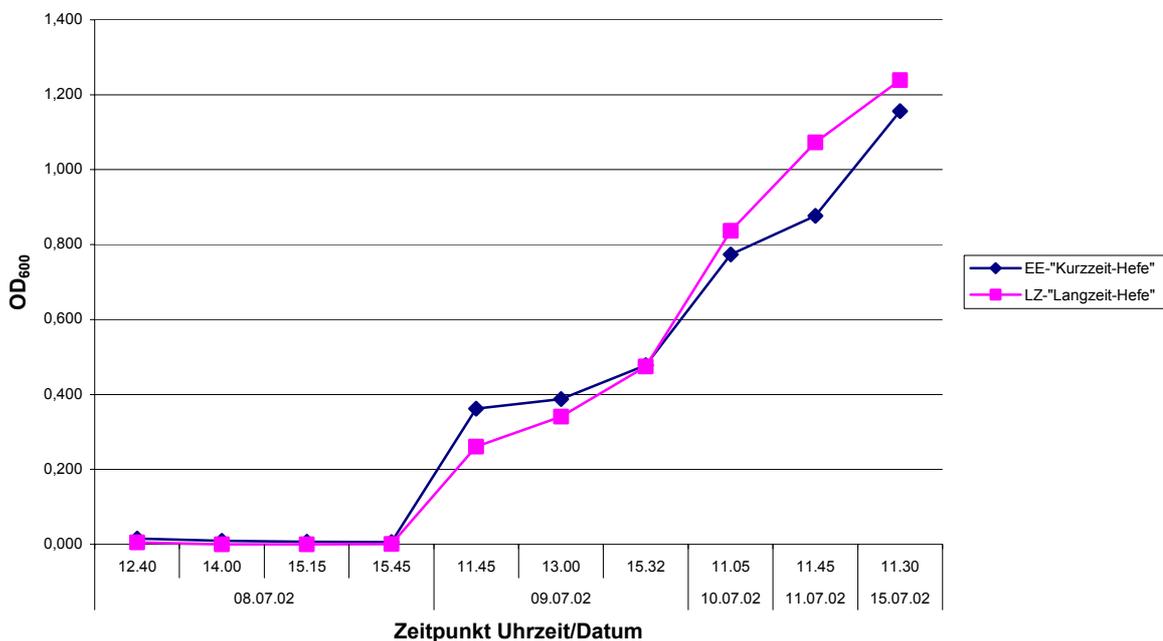


Abb. 4.11: Wachstumskurven von *Saccharomyces cerevisiae* (SUMPTER-Stamm)

Unter Kurzzeit-Lagerung ist eine Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für maximal vier Monate zu verstehen. Bei der Langzeit-Lagerung, die bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}/-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ stattfindet, ist die Hefe bis zu zwei Jahre ohne Aktivitätsminderung verwendbar (SOP_M03, Institut für Ökologische Chemie, GSF-Forschungszentrum).

4.8.2 Durchführung des Hefe-Östrogen-Bioassays mittels 96-Loch-Platten

Die Durchführung fand unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumbank (laminar flow) und nach SOP_M03 des Institutes für Ökologische Chemie statt.

Zuerst wurde das Wachstumsmedium der Hefen aus den folgenden Substanzen hergestellt (s. auch Anhang 8.2.1): 5 ml Glukose-Lösung, 1,25 ml L-Asparaginsäure-Lösung, 0,5 ml Vitaminlösung, 0,4 ml L-Threonin-Lösung, 125 μl Kupfer-II-sulfat-Lösung. Diese Lösungen wurden zu 45 ml Minimalmedium pipettiert, das sich in einer sterilen 100 ml Schott-Flasche befand. Nach Zugabe von 125 μl Hefe-Glycerin-Suspension aus dem Kryovial der 10-fach konzentrierten Stocklösung erfolgte unter Schütteln bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ die Inkubation für 24 h.

Am darauf folgenden Tag wurden die benötigten 96-Loch-Platten mit dem 17- β -Östradiol-Standard und den Proben belegt. Das aufgetragene Volumen war stets 2 μ l pro Loch, das Lösungsmittel DMSO/Isopropanol 4:1 (v/v). Während der Entfernung des Lösungsmittels bei Raumtemperatur auf den 96-Loch-Platten wurde frisches Wachstumsmedium mit einer Hefezahl von $4 \cdot 10^7/50$ ml aus der tags zuvor angesetzten Hefezellsuspension hergestellt. Anschließend wurden 500 μ l vom Farbstoff CPRG (c= 10 mg/ml) pro 50 ml Wachstumsmedium hinzugefügt. Dieses gut vermischte Versuchsmedium wurde mit 200 μ l pro Loch auf die Platten gegeben. Die 96-Loch-Platten wurden mit einem Plattenschüttler 2 min geschüttelt und anschließend in einem Brutschrank bei 32 °C für 24 h inkubiert. An den darauf folgenden zwei Tagen wurden die Platten jeweils 2 min geschüttelt und weiterhin bei 32 °C im Brutschrank inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von insgesamt 72 h erfolgte erneutes Schütteln für 2 min und das Absetzenlassen der Zellen bei Raumtemperatur für 1 h. Die anschließende Messung der Absorption erfolgte bei 550 nm und zur Berücksichtigung der Hefetrübung bei 620 nm.

4.8.3 Durchführung des Hefe-Östrogen-Bioassays mittels Erlenmeyerflaschen

Die Durchführung fand nach SOP_M01 des Institutes für Ökologische Chemie unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumbank (laminar flow) statt.

Vor Beginn der Zellstudien wurden folgende Lösungen hergestellt: Supplement Mix-, Additiv-, Kupfer(II)sulfat-Lösung, β -Galaktosidase-Puffer und β -Galaktosidase-Substrat-Lösung, SDS- und Stopplösung und das Basis-Wachstumsmedium (s. Anhang, Kapitel 8.2.1). Die Proben- und Standardlösungen (17- β -Östradiol, 0 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M) lagen gelöst in DMSO_{reinst} vor. Die Stocklösungen der Hefe, die bei -80 °C lagerten, wurden kurz vor dem Animpfen des Mediums in der Hand auf Raumtemperatur erwärmt und mit Hilfe einer Einkanalpipette suspendiert.

Am ersten Tag erfolgte ein Animpfen von 10 ml Basis-Medium mit 40 μ l frisch aufgetauter Stocklösung in einem 100 ml Erlenmeyerkolben (mit Einkerbung). Die Inkubation dieser Starterkultur dauerte 24 h bei 30 °C und 130 rpm. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde der OD₆₀₀-Wert photometrisch bestimmt (900 μ l Basis-Medium + 100 μ l Starterkultur; 1000 μ l Basis-Medium als Blank-Wert; Durchführung mit 1,5 ml Küvetten). Der OD₆₀₀-Wert lag bei den verwendeten Starterkulturen zwischen 0,4 und 0,5. Medien mit höheren OD₆₀₀-Werten wurden verworfen.

Anschließend wurden z.B. 150 ml Basis-Medium mit 150 µl Kupfer(II)sulfat-Lösung versetzt (Verhältnis immer 1:1). Zur Herstellung der Hauptkultur (= *working culture*) wurde die Menge der benötigten Starterkulturmenge errechnet zu:

$$(\text{Hauptkultur-V (z.B. 150 ml)} / \text{OD}_{600}\text{-Wert (Starterkultur)}) * 0,02 = x \text{ ml}$$

wobei: $\text{OD}_{600}\text{-Wert (Starterkultur)} = \text{OD}_{600}\text{-Wert}_{\text{gemessen}} * 10$

0,02 = empfohlener Start- OD_{600} -Wert der Hauptkultur

Die berechnete Menge an Starterkultur wurde mit x ml Basis-Medium (Gesamt-V z.B. 150 ml) in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben, der OD_{600} -Wert bestimmt und 150 µl Kupfer(II)sulfat-Lösung hinzugefügt (Verhältnis 1:1, Gesamt-V: Kupfer(II)sulfat-Lösung). Anschließend erfolgte die Inkubation für 16 h bei 30 °C und 130 rpm. Am dritten Tag fand die Kontrolle der Hauptkultur durch OD_{600} -Bestimmung statt (950 µl Basis-Medium + 50 µl Hauptkultur; 1000 µl Basis-Medium als Blank-Wert, 1,5 ml Küvetten). Der empfohlene und mit dem Verdünnungsfaktor korrigierte OD_{600} -Wert musste zwischen 0,1-0,3 liegen. Die Berechnung erfolgte zu:

$$(\text{benötigtes Testkultur-V (z.B. 500 ml)} / \text{OD}_{600}\text{-Wert (Hauptkultur)}) * 0,75 = x \text{ ml}$$

wobei: $\text{OD}_{600}\text{-Wert (Hauptkultur)} = \text{OD}_{600}\text{-Wert}_{\text{gemessen}} * 20$

0,75= empfohlener OD_{600} -Wert der Testkultur

Die errechnete Menge wurde zu x ml Basis-Medium (Gesamt-V z.B. 500 ml) in einen 1 L Erlenmeyerkolben gegeben, erneut der OD_{600} -Wert bestimmt (0,72-0,78) und gegebenenfalls durch Zugabe von Hauptkultur-Medium oder Basis-Medium korrigiert. Das so erhaltene Testmedium wurde mit jeweils 10 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben gefüllt, die zuvor mit 100 µl Proben- oder Standardlösungen (30 nM, 300 nM, 500 nM, 1 µM und 10 µM; effektive Testkonzentration: Faktor 100 niedriger) versetzt wurden. Als Leerprobe diente das Testmedium versetzt mit 100 µl DMSO, als Blank-Wert diente reines Basis-Medium. Die Inkubation der Hefezellen dauerte 2 h bei 30 °C und 130 rpm.

Nach beendeter Inkubation und kräftigem Schütteln der proben- bzw.-standardenthaltenden Kolben wurden 200 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorf-

reaktionsgefäße (ERG) pipettiert. Die noch Hefesuspension enthaltenden Erlenmeyerkolben wurden anschließend auf Eis gestellt und/oder bei +2 - 4 °C aufbewahrt. Zu den ERG wurden mit Hilfe einer Multipipette („Multipette“) jeweils 620 µl β-Galaktosidase-Puffer und 50 µl CHCl₃ pipettiert. Alle ERG wurden danach mit Hilfe eines Vortexers gemischt und für 5 min in einem 30 °C heißen Wasserbad unter Schütteln vorinkubiert. Zu jedem ERG wurden anschließend 200 µl β-Galaktosidase-Substrat-Lösung gegeben und die ERG erneut ins temperierte Wasserbad gestellt. Bei den gekühlten Hefesuspensionen erfolgte die OD₆₀₀-Bestimmung (zehnfach verdünnt, mit Basis-Medium auch als Blank und 1,5 ml Küvetten). Nach ungefähr 30 min war eine Gelbfärbung der Standardlösungen zu beobachten. Zu jedem ERG wurden 500 µl β-Galaktosidase-Stopp-Lösung hinzugefügt und der exakte Zeitpunkt notiert. Die Probensuspension (auch Leer- und Blankprobe) enthaltenden ERG wurden auch bis zur Gelbfärbung inkubiert, jedoch maximal sechsmal länger als die Standardlösungen (Zeitpunkt wurde notiert). Nach Zentrifugation der ERG (17 000 g, 15 min, RT) wurden die Überstände (1 ml) abgenommen, in 1,5 ml Küvetten pipettiert und bei 420 nm die Extinktion bestimmt (Basis-Medium als Referenz).

4.9 Luciferase-Bioassay: Durchführung

4.9.1 Zellmaterial

Bei der verwendeten Zelllinie H1L6.1c3 handelt es sich um rekombinante Maushepatomzellen, die mit einem Luciferase Reporter Plasmid pGudLuc6.1 transfiziert wurden (Garrison et al., 1996). Die Zellen wurden von M. S. Denison, Departement of Environmental Toxicology, Meyer Hall, University of California, Davis, CA, USA, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung und Inkubation erfolgte mit DMEM-Medium, das auch für die H4IIE-Zellen verwendet wurde.

4.9.2 Durchführung

Die Plattenbelegung erfolgte analog der EROD-Bioassay-Durchführung. Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

- Standardkonzentrationen um Faktor 100 erhöht (d.h.: 40 pg/Loch; 20 pg/Loch; 15 pg/Loch; 10 pg/Loch; 6 pg/Loch; 2,0 pg/Loch; 1,5 pg/Loch).

- Wachstum der H1L6.1c3-Zellen lag vor der Inkubation zwischen 90 – 100 % pro Loch.
- Inkubation fand zwischen 4-6 h statt.

Die mit Maushepatomzellen belegte 96-Loch-Platte wurde mit den Proben- und Standardkonzentrationen versetzt. Nach 4- bis 6-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 1,2%iger Glutaraldehydlösung/Loch fixiert und anschließend zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 20 µl einfach konzentrierter Zell-Lyse-Lösung, das Schütteln für 10-15 min bei RT und Einfrieren bei –20 °C. Das Auftauen auf RT wurde mit 180 µl PBS durchgeführt. Anschließend folgte das Entfernen der Zellen aus jedem Loch durch „Kratzen“ mit der Pipette, die Überführung in Eppendorfreaktionsgefäße einschließlich aller Blasen und Vortexen der Zellsuspension für 20 sek. Bei maximaler Geschwindigkeit fand das Zentrifugieren der ERG für 1 min statt. 50 µl des Überstandes wurden danach abgenommen, in weiße 96-Lochplatten pipettiert, mit 50 µl Luciferin/Loch versetzt und vermessen.

4.10 TaqMan[®]-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur gezielten Vermehrung von DNA (Saiki et al., 1988). Grundlage ist die zyklische Wiederholung von Denaturierung doppelsträngiger DNA, Anlagerung sequenzspezifischer gegenläufiger Oligonukleotid-Primer an die Einzelstrang-DNA und enzymatischer Kettenverlängerung des Gegenstranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-, Pfu-, Pvu- oder Pwo-Polymerase).

4.10.1 Theorie

Bei der TaqMan[®]-PCR (= 5'-Nuklease-Assay) liegt zwischen zwei spezifischen Olinukleotid-Primern ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Olinukleotid, die sogenannte TaqMan[®]-Probe. TaqMan[®]-Proben sind Sonden, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem Quencher markiert sind. Der Quencher ist intern eingebaut oder liegt am 3'-Ende. Durch seine Nähe unterdrückt er die Reporterfluoreszenzemission der intakten TaqMan[®]-Sonde. Bei Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-, 3'-Exonukleaseaktivität die TaqMan[®]-

Sonde in kleine Fragmente. Die damit stattfindende Loslösung des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes vom Quencher führt zur Reporterfluoreszenz, die dadurch die Synthese des spezifischen Zielstranges anzeigt.

4.10.2 Durchführung

Nach Inkubation der Zellen wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und anschließend die RNA nach dem Protokoll von Ausubel isoliert (Ausubel, 1999). Die c-DNA wurde aus 1 µg m-RNA mittels reverser Transkription und Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV, 200 U, Promega) gewonnen. Für die reverse Transkription wurden 50 nM Tris-HCl (pH = 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,25 mM dNTPs, 2 U RNAsin^R und als Primer 0,5 µg Oligo(dt)₁₅ eingesetzt (End-V = 20 µl). Nach Inkubation der Proben bei 37 °C für 5 min und Zugabe von M-MuLV fand eine erneute Inkubation bei 42 °C für 60 min statt. Das Stoppen der Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min erreicht. Die Lagerung der c-DNA fand bis zur Verwendung bei -20 °C statt (Naderi Kalali, B. et al., 2003).

Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Sequenzierungsprimer:

β-Actin:

5'-CGAAGGAGATTACTGCC-3' (Positionen: 940-957)

und

5'-GCCACCAATCCACACAGA-3' (Positionen: 1012R-1029R, GenBank accession no. NM-031144)

P450 1A1:

5'-CTGGTTCTTCCCTTTGGATACCCAGCCTTG-3' (Positionen 695-735)

und

5'-CCTAGGGTTGGTTACCACC-3' (Positionen: 990R-1008R, GenBank accession no. NM-012540)

TaqMan-Proben:

β-Actin:

5'(FAM)-AAGATCAAGATCATTGCTCCTCC-(TAMRA)-3'

P450 1A1:

5'(FAM)-TCATGAACTGTAGAACTTCTTATT-(TAMRA)-3'

4.11 Proteinbestimmung

4.11.1 *BCA-Methode*

Die Durchführung der BCA-Proteinbestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten mit einer BSA-Standarddeichkurve (Smith, 1985). 100 µl Proteinproben wurden mit 100 µl BCA-Kupfersulfatlösung (50:1, v:v) vermischt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Unter den alkalischen Reaktionsbedingungen wird die durch Cu(II) grünliche Lösung in Gegenwart von Proteinen zu Cu(I) reduziert. Es bildete sich ein violetter Cu(I)-Bicinchoninsäurekomplex, dessen Absorption bei 540 nm vermessen wurde.

4.12 Zytotoxizitätstest

4.12.1 *Theorie*

Dieser Zytotoxizitätstest, auch Resazurin-Test genannt, wurde zur Detektion von zytotoxischen Effekten eingesetzt und nach dem EROD-Bioassay durchgeführt. Er basiert auf der Metabolisierungsfähigkeit intakter Zellen, den zugesetzten blauen Indikator Resazurin zum roten Resorufin zu reduzieren. Die Fluoreszenz des roten Resorufins korreliert direkt mit der Zahl der lebenden Zellen. Bei 85 % intakter Zellen wurde der Test noch ausgewertet.

4.12.2 *Durchführung*

Nach dem EROD-Bioassay wurden die Zellen mit 50 µl 1,2 % Glutaraldehydlösung pro Loch am Boden fixiert und die Glutaraldehydlösung nach 5-10 min durch zweimaliges Waschen mit 2 x 200 µl/Loch PBS entfernt. Anschließend wurden 200 µl Resazurinlösung/DMEM-Kulturmedium (z.B. 200 µl Resazurinlösung in 19,8 ml DMEM-Kulturmedium) pro Vertiefung mit einer Mehrkanalpipette aufgebracht. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C mit Deckel erfolgte die Fluoreszenzmessung bei 535 nm Extinktion und 590 nm Emission (Gerät: Tecan Fluorostar). Die Fluoreszenzeinheiten wurden in Prozent zu einer Kontrollprobe (DMSO/Isopropanol

4:1, v/v) angeben. Abschließend wurden die Zellen enthaltenden Platten zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und bei –20 °C eingefroren.

4.13 Methoden zur Auswertung der Datensätze

Die in diesem Abschnitt erwähnten SOP sind im Fall der instrumentellen Analytik von Mitarbeitern des Dioxinlabors erstellt worden und seit dem Jahr 2001 für den entsprechenden Bereich akkreditiert.

Im Bereich der EROD-Bioassay-Analytik sind im Rahmen dieser Doktorarbeit und mit dem Ziel der Akkreditierung die notwendigen SOP erstellt worden.

4.13.1 Instrumentelle Analytik

Die nach der Probenaufarbeitung vorhandenen Lösungen wurden mit HRGC/HRMS vermessen. Die Auswertung der Daten ist im Folgenden kurz dargestellt.

Die Retentionszeiten der einzelnen Kongenere müssen mit dem internen Standard übereinstimmen. Desweiteren muß das Intensitätsverhältnis der beiden detektierten Molekülmassen weniger als +/- 15 % vom theoretischen Isotopenverhältnis abweichen. Das Signal-/Rauschverhältnis muss größer als 3 sein.

Die Bestimmung der Kongenere erfolgte über folgende Gleichung:

$$c_i = F_i * c_{js} * V_{js} / F_{js} * EW$$

- wobei:
- c_i = Gehalt des i-ten Kongeners
 - F_i = Peakhöhe/fläche des i-ten Kongeners
 - c_{js} = Konzentration des j-ten vor der Analyse zugegebenen Standards
 - V_{js} = Menge des j-ten vor der Analyse zugegebenen Standards
 - F_{js} = Peakhöhe/-fläche des j-ten vor der Analyse zugegebenen Standards
 - EW = Probeneinwaage

4.13.2 In-vitro-Bioassays

Die Auswertung fand nach SOP_Z06 und SOP_MO3 des Institutes für Ökologische Chemie statt und wird im Folgenden geschildert.

4.13.2.1 EROD-Bioassay

Der EROD-Bioassay besteht aus zwei einzelnen Testsystemen: Messung der spezifischen EROD-Aktivität und Proteinbestimmung nach der BCA-Methode (s. Kapitel 4.11.1). Die durch diese Testsysteme erhaltenen Rohdaten werden in eine Excel-Auswertungsdatei kopiert. Aus den vier für jede Konzentration erhaltenen Fluoreszenz- und Absorptionsdaten wird ein Mittelwert gebildet (s. auch Belegungsplan, Anhang, Kapitel 8.3.1). Von diesem Mittelwert erfolgt die Subtraktion des Blindwertes. Die korrigierten Absorptionsdaten ergeben nach linearer Regression die Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$). Anschließend findet die Bestimmung der spezifischen EROD-Aktivität nach folgender Formel statt:

$$\text{spez. EROD-Aktivität} = (\text{Fluoreszenzwert}^{\text{korrigiert}}) / (a * \text{mg Protein} * \text{min})$$

wobei a = gerätespezifischer Wert (hier: 21,35)

min = Dauer der Inkubation mit 7-Ethoxyresorufin (hier: 30 min)

Die spezifischen EROD-Aktivitäten des 2,3,7,8-TCDD Standards ergeben aufgetragen gegen den $\log(1/\text{Verdünnung})$ eine sigmoide Standardkurve (s. auch Abb. 5.1). Aus der entsprechenden 4-Parameter-Funktion (auch Hill-Funktion genannt) sind die relativen pg-Mengen an 2,3,7,8-TCDD für jede Probenkonzentration bestimmbar (Scheinost et al., 1997).

$$Y = D + (A-D) / (1 + (\frac{x}{C})^B)$$

wobei: A: Y-Wert der unteren Asymptote

B: relative Steigung am Kurvenmittelpunkt

C: X-Wert am Kurvenmittelpunkt

D: Y-Wert der oberen Asymptote

Aus der logarhythmischen Darstellung der spezifischen EROD-Aktivitäten der Probe gegenüber den $(1/\text{Verdünnungsstufen})$ ergibt sich im Idealfall auch ein sigmoider Kurvenverlauf (Abb. 4.12).

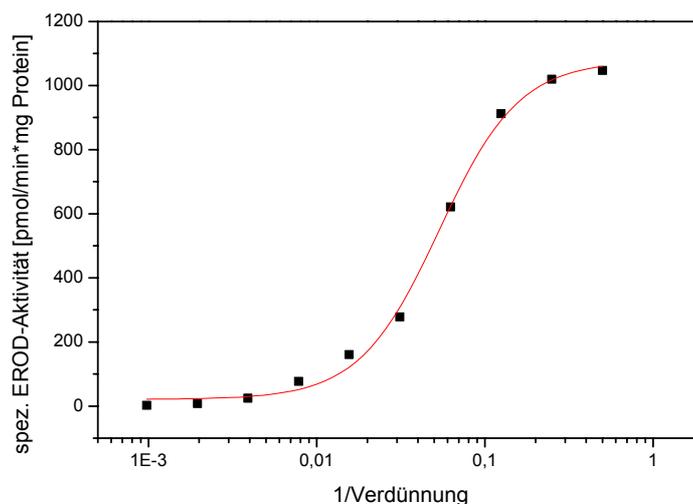


Abb. 4.12: Kurvenverlauf nach 72stündiger Inkubation der H4IIE-Zellen mit Flugasche

Der so ermittelbare EC₅₀-Wert liefert die korrekte Verdünnungsstufe zur Berechnung des I-TEQ-Wertes. Unter Einbeziehung der diversen Verdünnungsschritte innerhalb des Testes und des Probenansatzes lässt sich der I-TEQ-Wert bestimmen.

4.13.2.2 Östrogen-Hefe-Bioassay

Die Auswertung des Östrogen-Hefe-Bioassays basiert auf der gleichen Methode. Nach Messung der 96-Loch-Platte mit den Filtern 550 nm (Absorptionsmaximum des CPRG liegt bei 575 nm) und 620 nm (Trübung) werden die erhaltenen Absorptionsrohdaten in ein Excel-Arbeitsblatt kopiert.

Die Berechnung des korrekten Absorptionwertes folgt der Formel:

$$\text{Wert}^{\text{korrigiert}} = \text{chem. Abs.}_{(550 \text{ nm})}^{\text{P}} - (\text{chem. Abs.}_{(620 \text{ nm})}^{\text{P}} - \text{chem. Abs.}_{(620 \text{ nm})}^{\text{BLIND}})$$

wobei: P: Probe
 Blind: Blindwert

Ein sigmoider Kurvenverlauf der korrigierten Werte, logarhythmisch aufgetragen gegen die Konzentrationen (nM), beschreibt die Standardkurve durch 17-β-Östradiol.

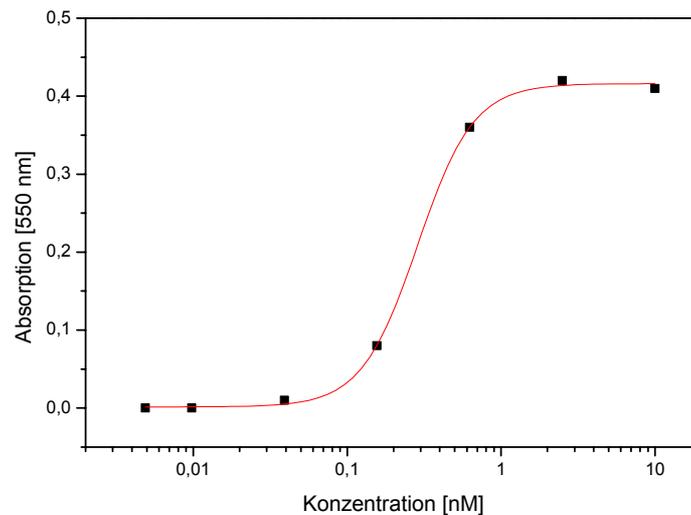


Abb. 4.13: 17- β -Östradiol Standardkurve nach 72 h ($c= 4,88 \text{ pM} - 10 \text{ nM}$; s. auch S. 131, Tab. 8.6).
 Logarithmische Auftragung der x-fachen Konzentration.

Daraus ergibt sich für die korrigierten Probenwerte bei verschiedenen Konzentrationen im Idealfall auch eine sigmoide Kurve. Der EC_{50} -Wert liefert dann das relativ zu 17- β -Östradiol östrogene Verhalten. In Abb. 4.13 ist die Standardkurve von 17- β -Östradiol dargestellt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten EC_{50} -Werte für den 96-Loch-Plattentest lagen zwischen 0,25–0,3 nM (d.h. 13,62 – 16,34 pg/Loch), die Bestimmungsgrenze bei 0,1 nM (d.h. 5,44 pg/Loch). Für den Flaschentest wurde der EC_{50} bei 1,5 nM (d.h. 4,1 ng/Flasche) und die Bestimmungsgrenze bei 0,8 nM (d.h. 2,2 ng/Flasche) detektiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Qualität der Daten

Die Reproduzierbarkeit der Probenahme kann nicht vollständig beurteilt werden, da Anlagen grundsätzlich nicht unter exakt gleichbleibenden Betriebsbedingungen arbeiten können. Um die Reproduzierbarkeit der Probenahme zu kontrollieren, wurden zusammen mit einem unabhängigen, akkreditierten Prüfinstitut zeitgleich Proben entnommen. Die Daten zeigten eine sehr gute Vergleichbarkeit über den gesamten Bereich der Probenahme und instrumentellen Analytik. Als Beispiel soll der Vergleich der Konzentrationen von niedrig chlorierten Homologensummen im Rohgas der Abfallverwertungsanlage Deutschland bei 200 °C dienen. In Tabelle 5.1 sind die Daten zweier Messungen dargestellt:

Tab. 5.1: Vergleich von I-TEQ-Werten beim Messpunkt 200 °C der Abfallverwertungsanlage in Deutschland

	Unabhängiges Prüfinstitut I-TEQ (ng/m³)	Eigene Probenahme I-TEQ (ng/m³)
1. Messung	2,56	2,57
2. Messung	5,95	5,99

Nähere Informationen zur Qualität des Datensatzes sind in der Dissertation Blumenstock, 2002, zu finden. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Kontrolle der Dioxin-Analysen aus Griechenland. Das Landesumweltamt NRW erhielt nach Extraktion der Emissionsproben von jeder Probe ein 50 % (Gewichtsprozent) Aliquot. Der Vergleich der Resultate nach der Aufarbeitung und Messung zeigte sehr gute Übereinstimmungen (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst ist die Datenqualität der instrumentellen Analytik abhängig von folgenden Kriterien, die zur Bestimmung der Kongenerenkonzentration alle erfüllt sein müssen (EN1948).

- Relative Retentionszeiten von analysierter Substanz und Standard müssen übereinstimmen.

- Die Wiederfindungsraten müssen zwischen 50 – 120 % liegen.
- Intensitätsverhältnis der beiden detektierten Molekülmassen muss weniger als +/- 15 % vom theoretischen Isotopenverhältnis abweichen.
- Signal-/Rauschverhältnis muss mindestens den Faktor drei aufweisen.
- Substanzmenge in der Probe muss um den Faktor drei größer als die Menge des Blindwertes sein.

Im Bereich der In-vitro-Testsysteme wurden die aus der Probenahme und anschließender Aufarbeitung gewonnenen Proben eingesetzt. Pro 96-Loch-Platte wurden 12 Löcher mit Blindwerten und acht Löcher mit Leerwerten belegt. Die Standard- und Probenkonzentrationen wurden vierfach aufgetragen, so dass sich eine Belegung mit 7 Standard- und 12 Probenkonzentrationen ergab. Die graphische Darstellung des Belegungsplanes ist im Anhang, Kapitel 8.3.1 zu finden. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse wurden mit mindestens zwei und höchstens acht voneinander unabhängigen Experimenten erzielt. Die EC_{50} -Abweichungen der 2,3,7,8-TCDD Standardkurven betragen zwischen 5 % und 15 %. Im Rahmen der internen Qualitätskontrolle wurde vor Beginn der Emissionsprobenanalytik eine im Institut für Ökologische Chemie als Kontrollsubstanz dienende Flugasche mit dem EROD-Bioassay analysiert und mit den Ergebnissen der konventionellen Analytik verglichen (Daten nicht gezeigt). Im Bereich des EROD-Bioassays zeigte die Teilnahme am ersten Dioxin-Ringtest für Bioassays die Qualität der erhobenen Daten. Erste mündliche Ergebnisse wurden auf der Dioxin-Konferenz im August 2002 von M. Engwall mitgeteilt und zeigten sehr gute Übereinstimmungen bei analysiertem Leberhomogenat.

5.1.1 *Wiederfindungsraten*

Die Wiederfindungsrate beziffert die Verluste der vor der Probenvorbereitung zugesetzten, isotopenmarkierten Standards während der Extraktion und Probenaufreinigung. Es wird dadurch möglich, eine qualitative Angabe zur Güte der Probenvorbereitung zu machen. Die Wiederfindungsraten werden nicht bei der Quantifizierung berücksichtigt, da davon ausgegangen wird, dass die Verluste der markierten Standards denen der nativen Analyten entsprechen. Die Bestimmung der Wiederfindungsraten erfolgt mittels eines direkt vor der Injektion zugesetzten, sogenannten Wiederfindungsstandards. Nach der US-EPA sollten

Wiederfindungsraten in der Spurenanalytik für Aromaten und Chloraromaten zwischen 50 % bis 120 % liegen (EPA, 1998). Die in dieser Arbeit beschriebenen Proben wurden mit einem Wiederfindungsstandard pro Substanzklasse analysiert. In Tabelle 5.2 sind die Wiederfindungsraten der mittels instrumenteller Analytik untersuchten Substanzklassen angegeben (verwendete Standardsubstanzen, s. Anhang, Kapitel 8.3.2).

Tab. 5.2: Wiederfindungsraten für Chloraromaten (Blumenstock, 2002)

Analyt	Isotopenmarkierter interner Standard	Wiederfindungsrate (%)
PCDD/F	DiCDD-OCDD; TriCDF-OCDF	45-132
PCB	MCB-DCB	41-96
PAK	6-Methylchrysen	41-62

Die Wiederfindungsraten der internen Standards liegen in dem vorgeschlagenen Bereich der US-EPA. Für die Probenahmestandards der PCDD/F lagen die Wiederfindungsraten bei nahezu 100 % und häufig sogar über 100 %. Die maximale Wiederfindungsrate des Probenahmestandards betrug 120 %. Im allgemeinen lagen die Wiederfindungsraten für die niedrig chlorierten und leicht flüchtigeren Verbindungen niedriger als für die schwer flüchtigen. Siebenfach und höher chlorierte zeigten auch niedrigere Wiederfindungsraten, da diese Substanzen aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften eine hohe Adsorption an den verwendeten Labormaterialien (Glasgeräte und Adsorbentien) besitzen.

5.1.2 Nachweisgrenzen EROD-Bioassay

Der aus dem kritischen Wert der Messgröße mit Hilfe der Kalibrierfunktion errechnete Gehalt heißt Nachweisgrenze x_N . Der kritische Wert der Messgröße y_{krit} ist gleich der Summe aus dem Leerwert y_L und dem einseitigen 95 % Prognoseintervall der Messergebnisse der Leerprobe. Die Nachweisgrenze entspricht der kleinsten Menge oder Konzentration eines Analyten, der mit dem Fehlerrisiko von kleiner als 5 % qualitativ nachgewiesen werden kann (Koch und Koch-Dedic, 1974).

y_{krit} ergab sich damit zu 20 pmol/min * mg Protein.

Die Nachweisgrenze x_N ergab sich daraus zu 0,026 pg 2,3,7,8-TCDD pro Loch, dies entspricht 0,8 pM. Die 0,8 pM-Berechnungen erfolgten mit Microcal[®]Origin und basieren auf folgender Abbildung 5.1.

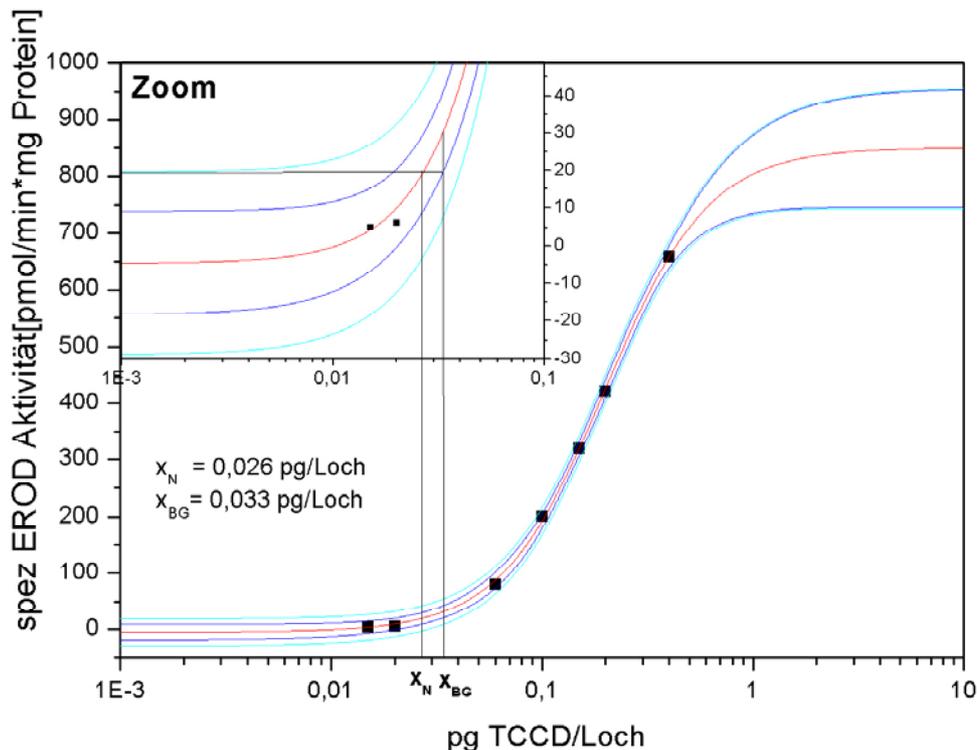


Abb. 5.1: Graphische Darstellung einer 2,3,7,8-TCDD-Standardkurve. Der EC_{50} -Wert liegt bei 0,2 pg/Loch, das entspricht 6,2 pM.

Desweiteren wurden die Bestimmungsgrenzen festgelegt. Die Bestimmungsgrenze x_{BG} ist der kleinste Gehalt bzw. die Konzentration eines Analyten, die mit einem Fehlerrisiko von kleiner als 5 % angegeben werden kann. x_{BG} wurde ebenso mit Hilfe von Microcal[®]Origin errechnet und ergab sich zu 0,033 pg 2,3,7,8-TCDD pro Loch. Als Bewertungskriterium für die Güte eines Analyseverfahrens gilt die Verfahrensstandardabweichung S_{X0} . Diese ergibt sich aus dem Quotienten der Reststandardabweichung S_{YX} und der Empfindlichkeit E (Funk et al., 1985). E entspricht hierbei der Steigung b der Vier-Parameter-Funktion an der Arbeitsbereichsmitte und wird aus deren erster Ableitung ermittelt.

$$b = f'(x) = -(A-D) \left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)^{-2} \cdot B \cdot \left(\frac{x}{C}\right)^{B-1} \cdot \frac{1}{C}$$

Qualität der Daten

wobei: $E = b(x)$
 $x = \sum x_i / N$

und es folgt: $E = 2610$

Die Reststandardabweichung errechnet sich nach folgender Gleichung zu

$$S_{YX} = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 4} = 68,4.$$

Daraus lässt sich eine Verfahrensstandardabweichung von 0,026 ermitteln:

$$S_{x0} = \frac{S_{yx}}{E} = 0,026.$$

5.1.3 *Blindwerte*

Zu jeder Messkampagne wurden Blindwerte aufgearbeitet. Verfälschung der Messergebnisse durch Kontaminationen der Glasgeräte, Adsorbentien etc. sind dadurch erkennbar und konnten bei keiner Probe festgestellt werden.

Bei der Durchführung der Bioassays erfolgte bei jedem Experiment die Analyse von Blind- und Leerwerten entsprechend des Belegungsschemas (s. Anhang, Kapitel 8.3.1).

5.1.4 *Diskussion*

Die Qualität der in dieser Arbeit erhobenen Daten kann hinsichtlich der instrumentellen Analytik als sehr gut bezeichnet werden. Die Abweichungen zu den Ergebnissen durch ein unabhängiges Prüfinstitut lagen unterhalb 1 %. Im Bereich der Bioassays zeigt ein Vergleich u.a. mit den Arbeitsgruppen Sakai (Behnisch et al., 2002) und Wiebel (Wiebel et al., 1996) die Datenqualität. Wiebel und Mitarbeiter detektierten mit der gleichen Zelllinie den selben EC_{50} -Wert von 0,006 nM für 2,3,7,8-TCDD (s. auch Abb. 5.1). Die im Ringtest bestimmten Abweichungen der EC_{50} -Werte von 6 % unterstreichen die Reproduzierbarkeit und Sensitivität dieses Testsystems. Im Bereich der Umweltprobenanalytik kann ein Vergleich zur Arbeitsgruppe Sakai hergestellt werden. Die in diesem Kapitel beschriebene Flugasche wurde von Behnisch et al. mit einem EROD-TEQ von 51,3 ng/g bestimmt (eigene Daten: 46,7

ng/g), und zwar unter Verwendung der gleichen H4IIE-Zelllinie (erhalten vom Institut für Toxikologie, Arbeitsgruppe Wiebel).

5.2 Emissionen einer Abfallverwertungsanlage

Die isokinetische Probenahme nach VDI DIN 3499 Blatt 1 bzw. VDI DIN 2066 1-8 der hier aufgeführten Emissionsproben betrug zwischen sechs und acht Stunden. Zusätzlich wurden an drei Tagen U-Glasrohre mit Hexan befüllt, gekühlt durch pulverisiertes Trockeneis und hinter XAD-2-Kartuschen geschaltet. Mit diesem Aufbau konnten Verbindungen erfasst werden, die das Harz möglicherweise passierten.

5.2.1 Instrumentelle Analytik

Insgesamt wurden neun Reingasproben von der untersuchten Abfallverwertungsanlage parallel mit Hilfe des EROD-Bioassays und der instrumentellen Analytik analysiert. Die HRGC/HRMS-Analysen zeigten folgende in Abb. 5.2 dargestellte Verteilung der Dioxine.

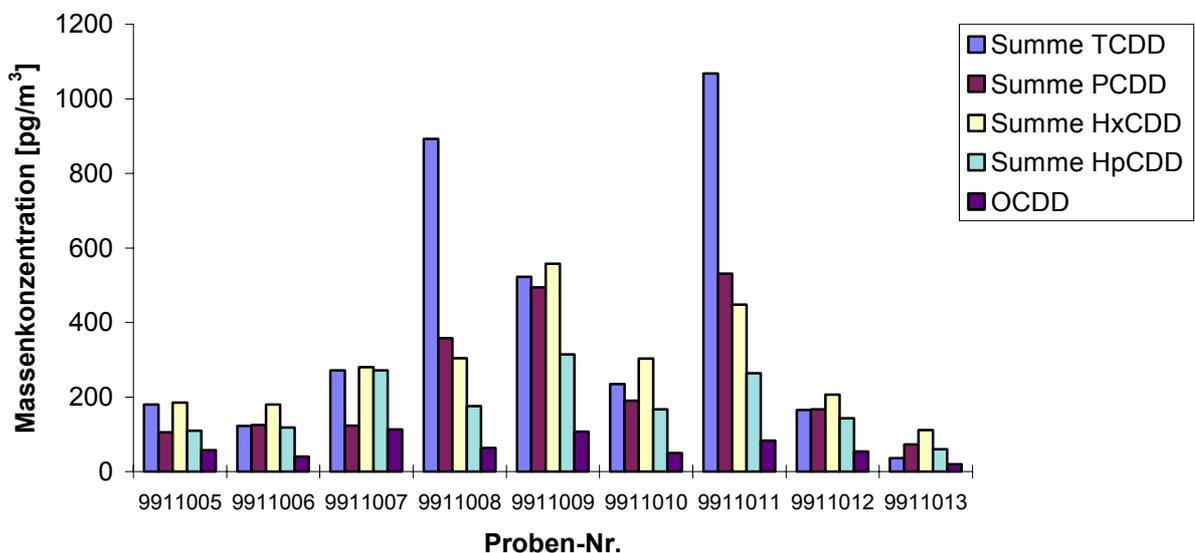


Abb. 5.2: Summe der TCDD, PCDD, HxCDD, HpCDD und OCDD einer MVA, ermittelt durch HRGC/HRMS-Analysen

Auffällig ist die hohe Konzentration an vierfach chlorierten Dibenzodioxinen in den Proben 08 und 11. Bei näherer Betrachtung zeigt sich, dass ausschließlich diese beiden Proben alle sieben für die Toxizität verantwortlichen Verbindungen aufweisen. 2,3,7,8-TCDD ist z.B. nur in diesen Proben vorhanden und konnte mit folgender Konzentration bestimmt werden: Probe (08) mit $30,9 \text{ pg/m}^3$ und Probe (11) mit $19,8 \text{ pg/m}^3$.

Die Messungen der Furan-Konzentrationen zeigen ein ähnliches Verteilungsbild. Auch hier sind in den Proben 08 und 11 die vierfach chlorierten Dibenzofurane am häufigsten vertreten. Die Substitution in den Positionen 2,3,7,8 ist in allen Proben zu finden, jedoch mit der höchsten Konzentration in den Proben 08 und 11. Das Substitutionsmuster der Furane ist in allen Proben: vierfach > fünffach > sechsfach > siebenfach > achtfach. In Bezug auf die für die I-TEQ-Wert-Berechnung relevanten Kongenere sind die in Abb. 5.3 gezeigten und in allen Proben vorkommenden zehn Furane entscheidend. Von den insgesamt neun Proben besitzen sieben in höchster Konzentration das 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF. Es folgt das Pentachlorfuran 1,2,3,7,8-PeCDF und anschließend das fast in gleich hoher Konzentration auftretende 2,3,4,6,7,8-HxCDF.

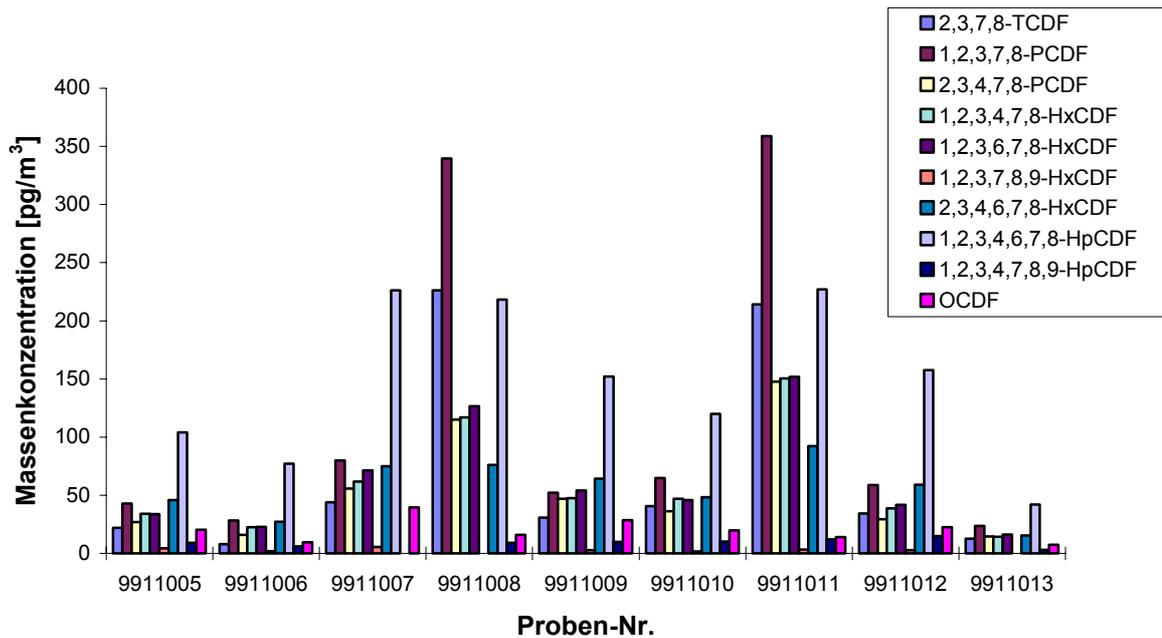


Abb. 5.3: Summe der zur I-TEQ-Wert-Bestimmung relevanten zehn Furane (MVA), ermittelt durch HRGC/HRMS-Analysen

Auffällig ist an den in Abb. 5.3 dargestellten Furankonzentrationen die schon erwähnte hohe Konzentration an 2,3,7,8-TCDF und die nur bei den Proben 08 und 11 relativ hohe Menge an 1,2,3,7,8-PeCDF.

Die Analytik der polychlorierten Biphenyle zeigt im Vergleich der I-TEQ-Werte höhere Werte für die Berechnung nach Safe (Abb. 5.4). Die durch diese Berechnung nach Safe erhaltenen I-TEQ-Werte basieren auf Faktoren, die 1990 festgelegt wurden. Mittlerweile finden die von der WHO 1998 festgelegten Faktoren häufiger Verwendung (Safe, 1990; WHO, 1998).

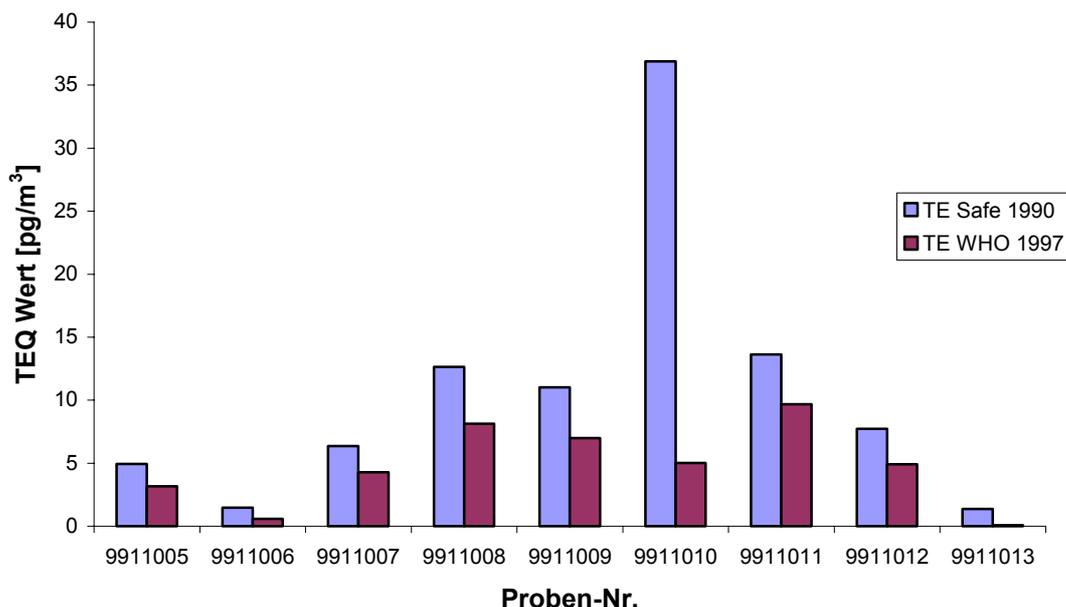


Abb. 5.4: Vergleich der PCB- I-TEQ-Werte nach Safe (1990) und der WHO (1998)

Besonders in Probe 10 kommt das im Vergleich zu den anderen Proben unterschiedliche Homologenmuster zum Ausdruck. Die nach Ballschmiter benannten Homologensummen PCB #4-15, PCB #16-39 und PCB #40-81 weisen eine bis zu vierfach höhere Konzentration in Probe 10 auf (Abb. 5.5).

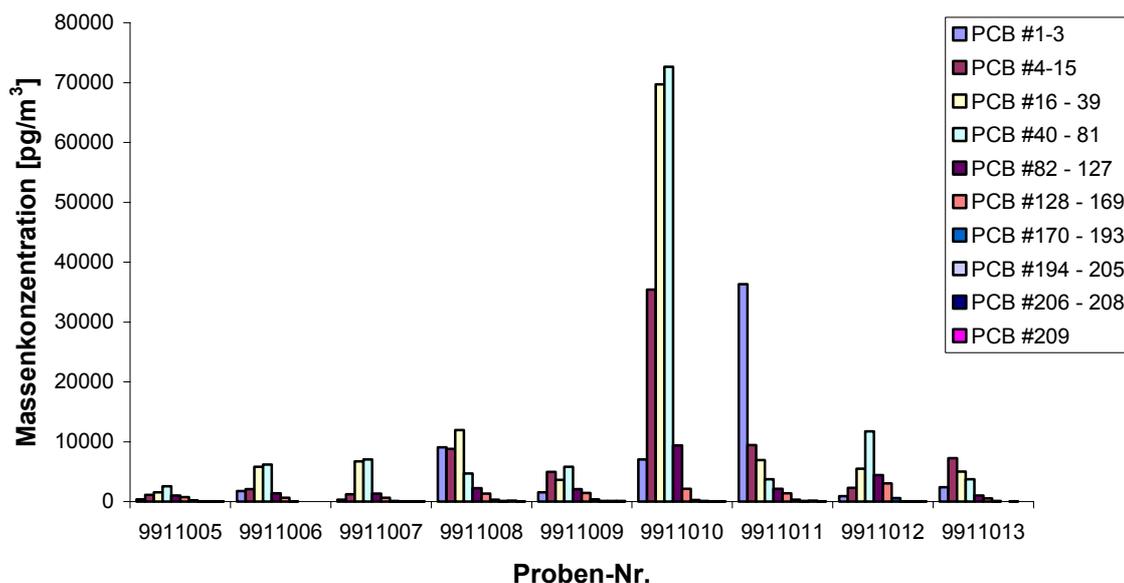


Abb. 5.5: Homologensummen nach Ballschmiter

Ein Vergleich der I-TEQ-Werte ermittelt für PCDD/F und PCB zeigt, dass die I-TEQ-Werte der PCDD/F (berechnet nach WHO, 1998) die Werte der PCB (berechnet nach WHO, 1998) zwischen Faktor 9 und 34 übertreffen. Die erhöhten Konzentrationen an PCDD/F sind auf die überstöchiometrischen Verbrennungsbedingungen in der Nachbrennzone (s. Kapitel 4.1.1, Abb. 4.2, Temperaturbereich: < 200 °C) zurückzuführen ((Vogg et al. (1987), Grabic et al. (1999)).

Das Auftreten von CO-Spitzen, die z.B. durch Sauerstoffmangel entstehen, ist an erhöhten Konzentrationen von PCB festzustellen. Die Probe 10 weist zum Beispiel den PCDD/F (berechnet nach NATO/CCMS, 1988)/PCB (Safe, 1990) niedrigsten Faktor von 1,2 und die höchste PCB-Konzentration mit 36,89 pg/m³ auf. Die Literatur ((Vogg et al., 1987); (Grabic et al., 1999)) und Untersuchungen von M. Blumenstock (Blumenstock, 2002) an einer Pilotverbrennungsanlage für Holzpyrolyse unterstreichen diese Beobachtung. In Tabelle 5.3 ist eine Übersicht der einzelnen Proben und ein Vergleich der TEQ-Werte erhalten durch Berechnung mit NATO/CCMS- und WHO-Faktoren gegeben. Sieben Emissionsproben der Abfallverwertungsanlage liegen in der Summe der TEQ-Werte für PCDD/F (NATO, 1988 und WHO, 1998) und PCB (WHO, 1998) unterhalb des Grenzwertes von 0,1 ng/m³. Zwei Emissionsproben (08 und 11) sind mit ungefähr 0,2 ng/m³ oberhalb dieses Grenzwertes. Die an diesen beiden Messtagen an der MVA vorliegenden Betriebsbedingungen waren provozierte CO-Spitzen und verlängerte Klopfpausen an den Kesselrohren.

Tab. 5.3: Zusammensetzung der TEQ-Werte von Reingas-Emissionsproben, ermittelt durch die instrumentelle Analytik. Die dargestellte Summe der PCDD/F und PCB enthält Rundungsfehler.

Proben-Nr. nach cleanup	instrumentelle Analytik TEQ-Wert (ng/m ³)				
	NATO/CCMS $\Sigma_{PCDD/F+PCB}$	WHO $\Sigma_{PCDD/F+PCB}$	NATO PCDD/F	PCB	WHO PCDD/F
9911005	0,036	0,036	0,033	0,003	0,033
9911006	0,021	0,021	0,020	0,0006	0,020
9911007	0,067	0,068	0,063	0,004	0,064
9911008	0,191	0,207	0,183	0,008	0,199
9911009	0,067	0,073	0,060	0,007	0,066
9911010	0,051	0,051	0,046	0,005	0,046
9911011	0,212	0,234	0,202	0,010	0,224
9911012	0,044	0,044	0,039	0,005	0,039
9911013	0,039	0,039	0,039	0,00006	0,039

5.2.2 EROD-Bioassay-Analytik

Sämtliche Emissionsproben der Abfallverwertungsanlage wurden auf CYP1A1-Induktionsfähigkeit mit Hilfe des EROD-Bioassays analysiert. Die Detektionsgrenze des EROD-Bioassays beträgt 0,8 pmol/L, d.h. 0,033 pg 2,3,7,8-TCDD oder strukturähnliche Verbindungen können pro Loch detektiert werden. Bei einem Normvolumen von 7 m³ würde die Mindestmenge an 2,3,7,8-TCDD bzw. strukturähnlichen Verbindungen 0,038 ng/m³ sein, denn:

$$0,033 \text{ pg/Loch} * 1 * 1000 * 8/7 \text{ m}^3 = 37,7 \text{ pg/m}^3$$

wobei: 0,033 pg/Loch = Detektionsgrenze des EROD-Bioassays
 1 = höchste Proben-c
 1000 = Verdünnungsfaktor im EROD-Bioassay, reduzierbar
 8 = Verdünnungsfaktor durch Reinigungsschritte, reduzierbar
 7 m³ = Beispiel eines Normvolumens

Eine Überwachung des Grenzwertes von 0,1 ng/m³ für Abfallverwertungsanlagen ist damit mit dem EROD-Bioassay möglich. Die nach der instrumentellen Analytik erhaltenen I-TEQ-Werte liegen größtenteils, wie in der oben aufgeführten Tabelle

dargestellt, zwischen $0,02 \text{ ng/m}^3$ und $0,07 \text{ ng/m}^3$. In Tabelle 5.4 sind die niedrigsten erwarteten EROD-TEQ-Werte aufgeführt, berechnet mit der Detektionsmindestmenge von $0,033 \text{ pg/Loch}$ 2,3,7,8-TCDD.

Tab. 5.4: EROD-TEQ-Werte berechnet mit dem Detektionslimit von $0,033 \text{ pg/Loch}$ und den entsprechenden Norm-Volumina

Proben-Nr. nach cleanup	Bioassay ng/m^3		instrumentelle Analytik (ng/m^3) WHO $\Sigma_{\text{PCDD/F+PCB}}$
	Norm-V	72 h erwartet	
05	9,26	0,029	0,036
06	11,45	0,023	0,021
07	7,78	0,034	0,068
08	5,55	0,048	0,207
09	6,51	0,041	0,073
10	7,69	0,034	0,051
11	6,86	0,038	0,234
12	7,77	0,034	0,044
13	9,91	0,027	0,039

Aufgrund dieser Berechnungen konnten zumindest zwei CYP1A1-Induktion durch die Emissionsproben erfolgen. Im Allgemeinen liegen die Faktoren, die das Verhältnis Bioassay und instrumentelle Analytik beschreiben (R_{ba}), probenabhängig zwischen 1 und 100, wobei die Faktoren zwischen 1-25 am häufigsten auftreten. Alle analysierten Proben waren daher z.B. durch Auftreten von Synergismus in der Lage, dass CYP1A1-System zu induzieren.

Die an der Abfallverwertungsanlage gezogenen Emissionsproben wurden durch den in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Reinigungsschritt bearbeitet, und nach diversen Verdünnungsschritten erfolgte die Inkubation der H4IIE-Zellen (Kap. 4.7.2). Nach 24- und 72stündiger Inkubationsdauer konnten keine Induktionen des CYP1A1-Systems durch sieben Reingasproben festgestellt werden. Keine Induktion fand auch bei den Proben statt, die der Durchbruchkontrolle dienten (Daten nicht gezeigt). Die Proben 08 und 11 induzierten das CYP1A1-System. Die ermittelten EROD-TEQ-Werte lagen bei 314 pg/m^3 für Probe 08 und 317 pg/m^3 für Probe 11. Die R_{ba} -Faktoren berechneten sich zu 1,5 (Probe 11, EROD-TEQ/I-TEQ), 1,4 (Probe 11, EROD-

TEQ/WHO-TEQ) und 1,6 (Probe 11, EROD-TEQ/I-TEQ), 1,5 (Probe 08, EROD-TEQ/WHO-TEQ). Für Probe 11 ist der entsprechende Induktionsverlauf des CYP1A1-Systems in Abb. 5.6 dargestellt.

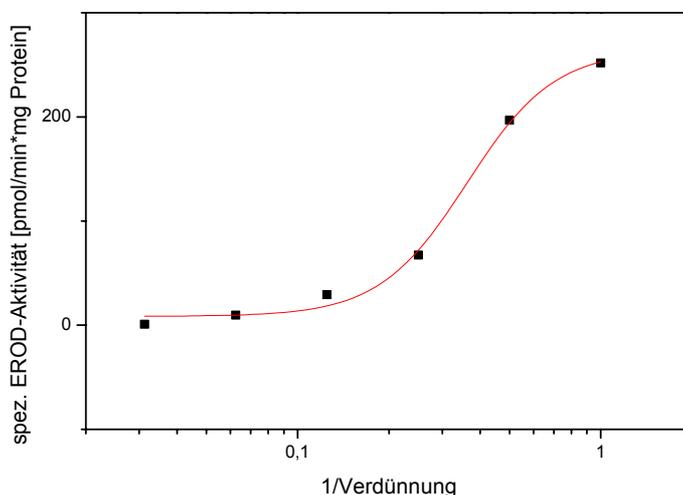


Abb. 5.6: Induktionsverlauf des CYP1A1-Systems durch die Reingasprobe Nr. 11

Desweiteren wurden die Emissionsproben auch ohne spezielles Bioassay-cleanup, d.h. direkt nach der Extraktion und Entfernung des Lösungsmittels, dem EROD-Bioassay zugeführt (im Folgenden als R1-Proben bezeichnet). Nach 72stündiger Inkubation der H4IIE-Zellen mit diesen Extrakten wurden CYP1A1-Induktionen gemessen, aus denen sich die in Abb. 5.7 dargestellten TCDD-Äquivalente errechnen ließen. Zytotoxizität wurde bei keiner der Proben in den getesteten Konzentrationen beobachtet. Die TCDD-Äquivalente lagen überwiegend zwischen 100 und 300 ng/m³, wohingegen Probe 08 den höchsten Wert von 713 ng/m³ aufweist. Die Abweichungen zwischen den voneinander unabhängigen Tests betragen zwischen 3 % und 14 %. Die Proben 09 (34 %) und 13 (29 %) zeigten Abweichungen zwischen den ermittelten TCDD-Äquivalente: 102-209 ng/m³ (Probe 09) und 92-167 ng/m³ (Probe 13).

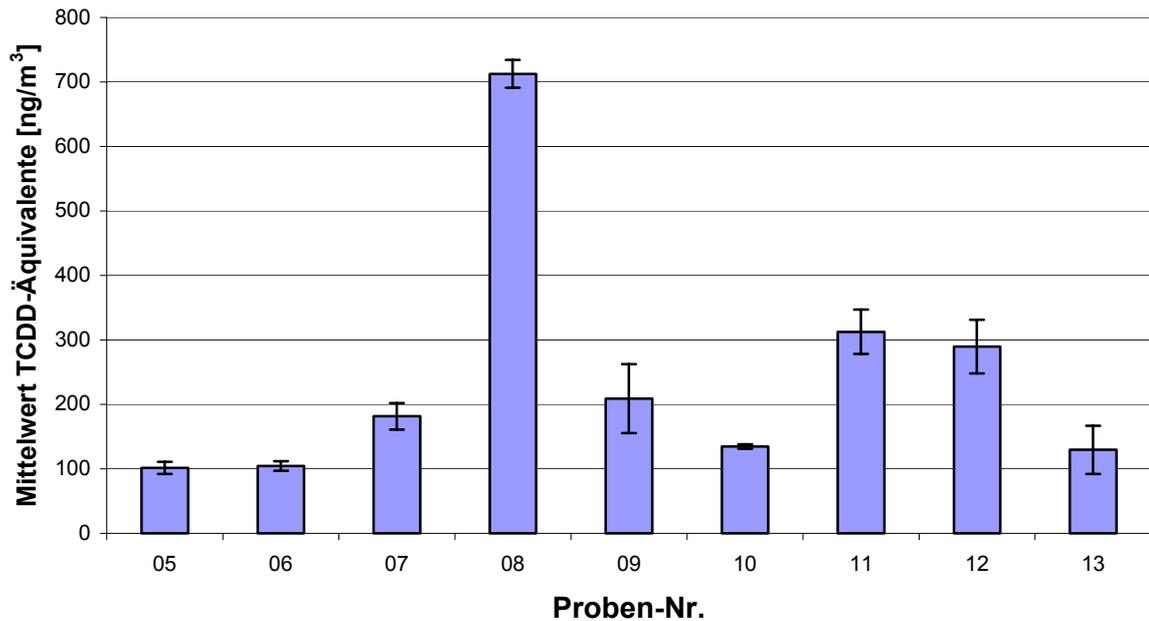


Abb. 5.7: TCDD-Äquivalente der Abfallverwertungsanlage nach 72 h und ohne Säulen-cleanup ($n = 3$)

Die Emissionsprobe Nr. 08 zeigt durchschnittlich 713 pg/m^3 TCDD-Äquivalente und Probe 11 gemittelt 313 pg/m^3 . Im Vergleich zu den TEQ-Werten (berechnet nach WHO, 1998) bedeuten das eine Induktionsminderung durch das Säulen-cleanup von 25-71 %.

5.2.3 Östrogenartige Effekte

Östrogenartige Effekte konnten für die mit dem EROD-Bioassay bereinigten Proben weder mit dem Flaschen- noch mit dem 96-Loch-Platten-Test festgestellt werden. Eine Detektion östrogenartiger Effekte ließ sich ausschließlich bei einer nicht gereinigten, also bei einer direkt nach der Extraktion konzentrierten Probe feststellen. Diese Probe (12) zeigt mit 1 m^3 ein östrogenes Verhalten wie $28,3 \text{ nM}$ 17- β -Östradiol.

5.2.4 Diskussion

Die Anlagenbedingungen an den Probenahmetagen waren nicht immer einheitlich und führten zu Verschiebungen im Homologenmuster. Vor allen Dingen sind die niedrig chlorierten PCDD/F empfindliche Parameter für verschlechterte Verbrennungsbedingungen. Das Auftreten von 2,3,7,8-TCDD an zwei verschiedenen Tagen (Proben-Nr. 08 und 11) lässt sich dadurch erklären. Das Vorhandensein vom

toxischsten Dioxin, dem 2,3,7,8-TCDD, führte zu einer starken Erhöhung der TEQ-Werte. Mit beiden Testmethoden (instrumentelle Analytik und Bioassay) konnte der dieser Ausstoß an Dioxinen und dioxinähnlichen Molekülen detektiert werden. Die Reingasproben 08, 09, 11 und 13 zeigten zusätzlich noch 1,2,3,7,8-PeCDD. Die höchste Konzentration wiesen Probe 11 mit 41,7 pg/m³ und Probe 08 mit 31,9 pg/m³ auf. In den Proben 08 und 11 waren mit 2,3,7,8-TCDD und 1,2,3,7,8-PeCDD zwei PCDD/F-Kongenere mit hohen TEF vorhanden. 1,2,3,7,8-PeCDD ist bei der Verwendung der TEF zur Berechnung der TEQ-Werte besonders entscheidend (s. Kapitel 3.3.1). Der Vergleich zwischen TEQ-Werten berechnet nach WHO (1998) und NATO/CCMS (1988) zeigt, dass bei den Proben 08 und 11 die größten Differenzen auftraten. Die Verwendung des TEF von 0,5 (NATO/CCMS) statt 1,0 (WHO) für 1,2,3,7,8-PeCDD wird durch die niedrigeren I-TEQ-Werte deutlich. Die R_{ba}-Faktoren ermittelt durch EROD-TEQ/WHO-TEQ sind geringfügig näher bei 1, so dass die Verwendung von WHO-Faktoren zur Berechnung der TEQ-Werte sinnvoller erscheint. Das Auftreten von erhöhten Furan-Konzentrationen bei den Proben 08 und 11 hängt auch mit den verschlechterten Verbrennungsbedingungen zusammen. Durch die provozierten CO-Spitzen tritt erhöhte Aromatenbildung und in hohen Konzentrationen unchloriertes Dibenzofuran auf, das zu einer verstärkten Bildung von PCDF beitragen kann (Blumenstock, 2002).

Eine Erklärung für die nicht stattfindende CYP1A1-Induktion bei sieben Reingasproben könnte im Homologenmuster der einzelnen Proben zu finden sein. Ein Grund liegt in der bevorzugten Chlorierung von Dibenzo-*p*-dioxin in den lateralen 2,3,7,8-Positionen. Das Nicht-Vorhandensein der 2,3,7,8-Kongenere in den anderen analysierten Proben lässt sich also mit der besonders hohen Reaktivität dieser Substitutionsprodukte erklären, die bei der Betrachtung von HOMO-LUMO-Elektronendichten deutlich werden (Wehrmeier et al., 1998). Die Probe 10 weist zum Beispiel einen durch die instrumentelle Analytik bestimmten I-TEQ-Wert ($\Sigma_{PCDD/F+PCB}$) von 0,051 ng/m³ auf, der mit einer Detektionsmindestmenge von 0,034 ng/m³ auch beim EROD-Bioassay feststellbar sein müsste. Dem I-TEQ-Wert von 0,051 ng/m³ liegen folgende fünf der sieben zur I-TEQ-Bestimmung relevanten PCDD/F zu Grunde: 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD und OCDD. Ein synergistisches Verhalten dieser Verbindungen liegt nicht vor und ist in diesen Konzentrationsbereichen auch nicht aus der Literatur bekannt. Für OCDD sind Zellstudien zum antagonistischen Verhalten im Institut für

Ökologische Chemie durchgeführt worden (Hofmaier, 1999). Eine inhibierende Wirkung von durchschnittlich 46 % konnte dabei festgestellt werden. Bezogen auf Umweltproben müsste für diesen Effekt jedoch eine ca. 850fach größere Menge OCDD gegenüber induzierenden Dioxinen vorliegen. Der Beitrag der polychlorierten Biphenyle zum Gesamt-I-TEQ-Wert der Emissionsproben ist, außer bei Probe 10, relativ gering. Additive, synergistische und antagonistische Effekte durch PCB untersuchte A. Hofmaier (1999) und stellte dabei PCB-abhängige Unterschiede fest, die aber aufgrund der geringen Konzentrationen in den Betrachtungen hier vernachlässigt werden können. Eine weitere Erklärung für die nicht bestimmbare Induktion des CYP1A1-Systems liegt in der EROD-Bioassay-Bestimmungsgrenze von 0,033 pg/Loch. Bei dem vorliegenden nicht synergistischen Verhalten der Emissionssubstanzen sind die vorhandenen Mengen an 2,3,7,8-TCDD-ähnlichen Verbindungen pro Loch zu gering. Nur Probe 10 wies einen Punkt oberhalb dieser Grenze auf. Die Erstellung eines sigmoiden Kurvenverlaufs und eine EROD-TEQ-Bestimmung waren jedoch mit einem Punkt oberhalb des Hintergrundes nicht möglich.

Die bei der Bestimmung der TCDD-Äquivalente von R1-Proben festgestellten Abweichungen unterhalb 15 % liegen in einem für biologische Testverfahren üblichen Bereich ((Schwirzer, 1998); (Hofmaier, 1999)). Die erhöhten Abweichungen (29 % (Probe 13) und 34 % (Probe 09)) können als tolerierbar bezeichnet und mit stark störenden Verbindungen erklärt werden, die aufgrund des fehlenden Cleanup-Schrittes noch vorhanden waren. Die Untersuchungen der R1-Proben zeigen deutlich den Effekt der EROD-Bioassay-Säule: Nicht persistente Verbindungen werden durch Oxidierung bzw. Sulfonierung abgetrennt, und das zytotoxische Potential von polaren Verbindungen wird stark verringert.

Die Einhaltung des Grenzwertes von 0,1 ng I-TEQ/m³ (17. BImSchV) ist seit fünf Jahren mittlerweile für viele in Deutschland betriebene Abfallverwertungsanlagen durch Sekundär- und Tertiärmaßnahmen kein Problem mehr. Die in dieser Arbeit vorgestellte und beprobte Anlage erreichte durchschnittlich 0,047 ng I-TEQ /m³ unter Berücksichtigung von sieben Reingasproben. Das deutsche Umweltbundesamt publizierte 1997 einen Beitrag über die Dioxinmissionen in Deutschland, wobei Hausabfallverwertungsanlagen im Durchschnitt 0,015 ng I-TEQ/m³ erreichen (UBA, 1997). Hochgerechnet auf eine Jahresverbrennungskapazität von 15,9 Mio. Tonnen ergibt dies 1,3 g I-TEQ/a oder ca. 2 % des Gesamt-I-TEQ (weniger als 70 g im Jahr

1999). Zur PCB Relevanz hinsichtlich von POPs erstellten Luthardt und Mitarbeiter (Luthardt et al., 2002) eine Übersicht von PCDD/F- und PCB-Emissionen industrieller Quellen aus den Jahren 1998 – 2000. Insgesamt wurden acht verschiedene Verbrennungsanlagen beprobt, u.a. auch zwei MVA mit einem unterschiedlichen Technologiestand. Die mit der in dieser Arbeit aufgrund ihrer Sekundärmaßnahmen vergleichbare Anlage erreichte eine PCDD/F-Konzentration von $0,0001 \text{ ng I-TEQ/m}^3$. PCB waren nicht vorhanden. Im Vergleich dazu erzielte die ältere Abfallverwertungsanlage einen Gesamtausstoß von $1,98 \text{ ng I-TEQ/m}^3$ mit einem PCB-Anteil von $0,341 \text{ ng I-TEQ/m}^3$. Alle acht Verbrennungsanlagen zeigten ein ähnliches PCB-Muster, das durch seinen hohen Anteil an PCB 126 auffällt. PCB 126 bildete den Hauptanteil der insgesamt mit maximal 16 % am Gesamt-TEQ beteiligten PCB. Die PCB-Durchschnittskonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit mit $0,005 \text{ ng I-TEQ/m}^3$ bestimmt, mit einem maximalen PCB-Anteil von 10 % am Gesamt-TEQ-Wert. Ein verstärktes Auftreten von PCB 126 wurde nicht festgestellt.

5.3 Emissionen von Verbrennungsanlagen in Griechenland

Die in dieser Arbeit dargestellten PCDD/F-Messungen an drei verschiedenen Verbrennungsanlagen im Norden und Westen Griechenlands fanden im Rahmen eines EU-Projektes statt. Ausgewählt wurden die Anlagen, eine Krankenhausabfallverbrennungsanlage, eine Sekundäreisenfabrik und eine Olivenölanlage, nach landestypischen Betrieben, da eine Erfassung von PCDD/F-Emissionswerten aus Griechenland noch nicht vorlag (s. auch Kapitel 4.1).

5.3.1 Krankenhausabfallverbrennungsanlage

Die in Kapitel 4.1.2 beschriebene und dargestellte Krankenhausabfallverbrennungsanlage (KVA) ist eine von ungefähr 250 weiteren Anlagen dieses Typs in Griechenland. Pro 30 000 Einwohner existiert eine vergleichbare Anlage, in den Großstädten besteht ein etwas größeres Verhältnis. Der Ofen der Anlage lief fünf bis sechs Stunden pro Tag, die nicht beprobte Nachbrenndauer betrug ungefähr zwei bis drei Stunden. Die Schornsteinhöhe von nur 15 m befand sich überwiegend auf gleicher Höhe mit den umliegenden Gebäuden des Krankenhauses, die zum Teil auch etwas höher waren. Durch nicht vorhandene Reinigungsschritte des

Verbrennungsgases, wie Partikelfilter, handelte es sich bei den KVA-Emissionen um Rohgas.

5.3.1.1 Instrumentelle Analytik

Die PCDD/F-Konzentrationen der KVA liegen im Vergleich mit anderen beprobten Anlagen sehr hoch. Bei einem Hauptstrom von 780 m^3 pro Stunde und einem I-TEQ-Wert von 418 ng/m^3 werden stündlich $326 \text{ } \mu\text{g}$ I-TEQ ausgestoßen. Diese Fracht und die Betriebsdauer der Anlage von 900 h pro Jahr führen zu einem Emissionsausstoß von $0,3 \text{ g}$ pro Jahr. Eine Tonne Krankenhausmüll emittiert 7000 m^3 , so dass annähernd $2900 \text{ } \mu\text{g}$ I-TEQ/t kalkuliert werden können. Der jährliche PCDD/F-Ausstoß aller griechischen KVA durch diese Art von Krankenhausmüllverbrennung kann damit auf 153 g I-TEQ berechnet werden.

5.3.1.2 EROD-Bioassay-Analytik

Eine weitere Probe der KVA wurde parallel mit der instrumentellen Analytik und mit dem EROD-Bioassay untersucht. Die Werte der instrumentellen Analytik gleichen den im vorherigen Abschnitt beschriebenen und sind in der nachfolgenden Tabelle 5.5 dargestellt.

Tab. 5.5: Darstellung der durch instrumentelle Analytik und EROD-Bioassay ermittelten I-TEQ-Werte

	KVA-Abluft
24 h-Bioassay (ng/m^3)	867
72 h-Bioassay (ng/m^3)	423
WHO (ng/m^3)	418
Faktor $\text{I-TEQ}^{\text{Bioassay}72 \text{ h}} / \text{I-TEQ}^{\text{WHO}}$	1,0
Faktor $\text{I-TEQ}^{\text{Bioassay}24 \text{ h}} / \text{I-TEQ}^{\text{Bioassay}72 \text{ h}}$	2,1
Haupt-V-strom (m^3/h)	780
Fracht WHO ($\mu\text{g/h}$)	326
Fracht Bioassay^{72 h} ($\mu\text{g/h}$)	330
Fracht WHO (g/a), 250 Anlagen	153
Fracht Bioassay^{72 h} (g/a), 250 Anlagen	155

Bei der Analyse durch den EROD-Bioassay wurden 24 h- und 72 h-Messungen durchgeführt. In der Kombination mit gleicher Probenbelegung und Verwendung von derselben Zellpassage ist die Unterscheidung zwischen persistenten und nicht

persistenten Verbindungen möglich. Der durch die 24 h-Messung ermittelte I-TEQ-Wert von 867 ng/m³ ist ungefähr zweimal höher als der 72 h I-TEQ-Wert von 423 ng/m³. Innerhalb von 48 h fand der Abbau von PAK und anderen metabolisierbaren Verbindungen statt. Die Induktion des CYP1A1-Systems erfolgte anschließend durch die sogenannten PBTs (*persistent bioaccumulative and toxic*). Abb. 5.8 zeigt den Metabolisierungseffekt.

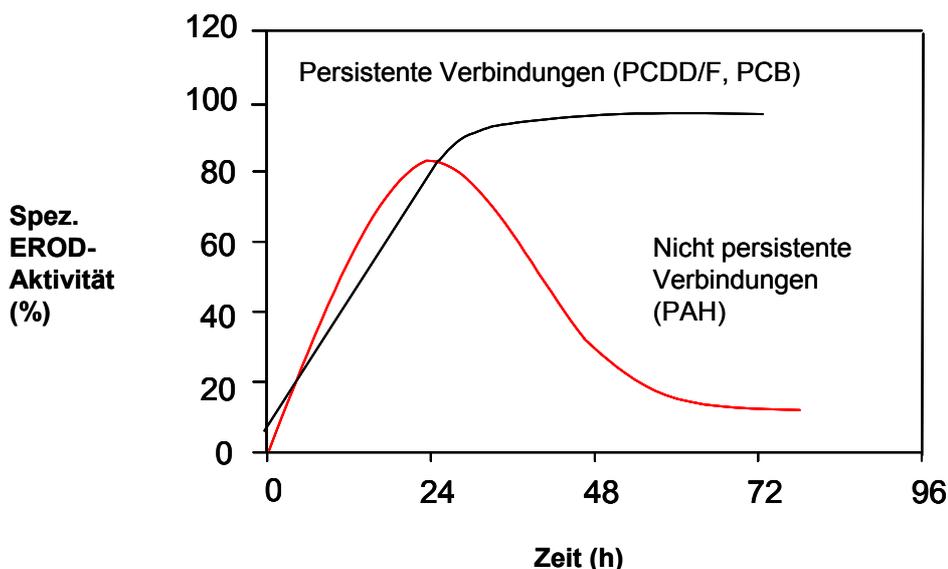


Abb. 5.8: Induktionsverhalten von nicht persistenten Verbindungen und PBT. Nach 72stündiger Inkubation sind nur die persistenten Verbindungen wie PCDD/F und PCB für die CYP1A1-Induktion verantwortlich.

Unter der Berücksichtigung der KVA-Betriebsdauer und eines Hauptvolumenstroms von 780 m³/h ergibt sich eine durch die instrumentelle Analytik (berechnet nach WHO) bestimmte Fracht von 326 µg/h und durch den 72 h-EROD-Bioassay ein I-TEQ von 330 µg/h und 620 mg/a. Berechnet auf ein Jahr emittieren die ungefähr 250 KVA in Griechenland einen durch die instrumentelle Analytik ermittelten I-TEQ-Wert von 153 g und einen durch die Bioanalytik festgelegten I-TEQ-Wert von 155 g.

5.3.1.3 Östrogenartige Effekte

Effekte durch endokrine Disruptoren konnten von den Emissionen der KVA detektiert werden. Sie traten jedoch nur bei zwei Proben auf und befanden sich unterhalb des Bestimmungsbereiches von 0,1 nM 17-β-Östradiol (96-Loch-Platten-Test) bzw. 0,8 nM 17-β-Östradiol (Flaschentest).

5.3.2 Sekundäre Eisenverwertungsanlage

An der sekundären Eisenverwertungsanlage im Norden Griechenlands dienten zwei Messstellen der Konzentrationsbestimmung von polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen und -furanen. Zum einen wurde die Hallenabluft und zum anderen die direkte Prozessabluft analysiert. Der Schmelzprozess durch den Lichtbogenofen wird an 350 Tagen im Jahr mit 75 Tonnen Schrott (Altautos, Bahnschienen etc.) pro Zyklus durchgeführt. An einem Tag finden 10 Zyklen statt, so dass ungefähr 262 kt Schrott in einem Jahr geschmolzen werden.

5.3.2.1 Instrumentelle Analytik

Die durch Gewebestaubfilter gereinigten Emissionen wiesen abhängig von ihrem Probenahmeort unterschiedliche I-TEQ-Werte auf. In der Werkshalle des Betriebes wurde die Schmelze in bestimmte Formen gegossen, wie zum Beispiel Brückenträgerstreben. Die dabei entstehenden PCDD/F-Konzentrationen liegen um den Faktor 57 niedriger als die der Prozessabluft. Folgende Tabelle zeigt die ermittelten Emissionswerte (Tab. 5.6).

Tab. 5.6: Vergleich der durch die instrumentelle Analytik bestimmten I-TEQ-Werte der sekundären Eisenverwertungsanlage

Emissionstyp	$\Sigma_{\text{PCDD/F}}$ I-TEQ (ng/m ³)	Haupt-V- strom	Fracht PCDD/F I-TEQ (µg/h)	Betriebsdauer (h/a)	Emissions- ausstoß I-TEQ (g/a)
Prozessabluft	0,8	171 895	138	5 733	0,8
Hallenabluft	0,014	422 415	5,9	3 000	0,02

Im Vergleich zur KVA ist die PCDD/F-Emission dieser Anlage mit insgesamt 0,8 g pro Jahr etwas höher. Kalkuliert auf das geschmolzene Material werden 3,5 µg I-TEQ/t ausgestoßen, was in Bezug auf Emissionsdaten aus anderen Ländern im gleichen Bereich liegt (Quass et al., 2000 a). Unter Berücksichtigung der Gesamtanzahl von zwei, die in Griechenland von diesem Anlagentyp existieren, kann die jährliche PCDD/F-Emission auf 1,6 g I-TEQ abgeschätzt werden.

5.3.2.2 *EROD-Bioassay-Analytik*

Die Erfassung der PCDD/F-Konzentrationen mittels EROD-Bioassay erfolgte mit einer 24 h-Messung und einer 72 h-Messung. Die durch den Faktor $\text{Bioassay}^{24\text{ h}}/\text{Bioassay}^{72\text{ h}}$ deutlich werdende Metabolisierung der dioxinähnlichen Substanzen beträgt 2,9 (Prozessabluft) und 13,2 (Hallenabluft). In pg/m^3 bedeutet das für die Prozessabluft eine Reduzierung des I-TEQ von $5\,271\text{ pg}/\text{m}^3$ auf $1\,815\text{ pg}/\text{m}^3$ und für die Hallenabluft von $304\text{ pg}/\text{m}^3$ I-TEQ auf $23\text{ pg}/\text{m}^3$ I-TEQ. Vergleicht man die 72 h-Werte mit denen für diese Emissionsprobe durch die instrumentelle Analytik ermittelten Werte (WHO), erhält man einen R_{ba} -Faktor ($\text{Bioassay}^{72\text{ h}}/\text{instrumentelle Analytik}$) von 2,3 (Prozessabluft) und 1,6 (Hallenabluft). Die emittierten Frachten der beiden Prozesse berechnen sich für das Schmelzen auf $311\text{ }\mu\text{g}/\text{h}$ und für die Werkshalle auf $10\text{ }\mu\text{g}/\text{h}$. In Griechenland existieren insgesamt zwei Anlagen diesen Typs, so dass der Gesamtausstoß an Dioxinen bzw. dioxinähnlichen Substanzen aus diesem Industriezweig mit $5,5\text{ g}$ pro Jahr (EROD-Bioassay) kalkulierbar ist. Tabelle 5.7 fasst die Daten und den Vergleich mit den instrumentell ermittelten Werten zusammen.

Tab. 5.7: Daten der sekundären Fe-Verwertungsanlage: 24 h- und 72 h-Werte durch EROD-Bioassay ermittelt. Daten der instrumentellen Analytik berechnet mit Faktoren der WHO.

	Prozessabluft	Hallenabluft
24 h-Bioassay (ng/m^3)	5,3	0,30
72 h-Bioassay (ng/m^3)	1,8	0,02
WHO (ng/m^3)	0,80	0,01
Faktor $\text{I-TEQ}^{\text{Bioassay}^{72\text{ h}}}/\text{I-TEQ}^{\text{WHO}}$	2,3	1,6
Faktor $\text{I-TEQ}^{\text{Bioassay}^{24\text{ h}}}/\text{I-TEQ}^{\text{Bioassay}^{72\text{ h}}}$	2,9	13,2
Haupt-V-strom (m^3/h)	171 895	422 415
Fracht WHO ($\mu\text{g}/\text{h}$)	138	6
Fracht Bioassay^{72 h} ($\mu\text{g}/\text{h}$)	311	10
Fracht WHO (g/a), 2 Anlagen	2,4	
Fracht Bioassay^{72 h} (g/a), 2 Anlagen	5,4	

5.3.2.3 *Östrogenartige Effekte*

Eine Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität und damit eine Detektion von östrogenähnlichen Effekten wurde weder mit dem Östrogen-Flaschen-Test noch mit

dem 96-Loch-Platten-Test festgestellt (LOD (17- β -Östradiol) = 0,3 nM beim 96-Loch-Platten-Test und 1,5 nM beim Flaschen-Test).

5.3.3 Olivenölfabrik Griechenland

In Griechenland befinden sich ungefähr 200 Anlagen zur Gewinnung von Olivenöl aus der zweiten Pressung. Das in Kapitel 4.1.3 dargestellte Schema zeigt die Emissionsmessstelle oberhalb der ersten Zyklonen. Ein typisches Merkmal dieser Anlage ist der diskontinuierliche Betrieb von 15 h pro Tag und der Jahresbetrieb von 95 Tagen. Die jährliche Produktion von ungefähr 20 000 Tonnen Olivenöl ist mit einer starken Geruchsbelästigung verbunden, die bisher nicht durch einfache Maßnahmen reduziert werden konnte.

5.3.3.1 Instrumentelle Analytik

Zwei Proben wurden ausschließlich mit der instrumentellen Analytik untersucht. Der in einer Drehtrommel bei 350 °C getrocknete Olivenfleischrückstand führte zu Emissionen von 15 030 m³/h, die PCDD/F-Verbindungen, vermessen mit HRGC/HRMS-Analyse, unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen. In folgender Tabelle sind die ermittelten Daten dargestellt (Tab. 5.8).

Tab. 5.8: Daten der durch die instrumentelle Analytik bestimmten I-TEQ-Werte einer Olivenölfabrik in Griechenland

Anlagentyp	$\Sigma_{\text{PCDD/F}}$ I-TEQ (ng/m ³)	Haupt-V- strom (m ³ /h)	Fracht PCDD/F I-TEQ ($\mu\text{g/h}$)	Betriebsdauer (h/a)	Emissions- ausstoß I-TEQ (g/a)
Olivenöl- anlage	0,017 ^{LOD}	15 030	0,3	1 000	0,0003

5.3.3.2 EROD-Bioassay-Analytik

Der EROD-Bioassay erfasst sämtliche Dioxine bzw. dioxinähnliche Verbindungen, die, wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, bestimmte Struktureigenschaften aufweisen. Der Vergleich (R_{ba} -Faktor) mit den I-TEQ-Werten der instrumentellen Analytik gibt dabei Hinweise auf eventuell auftretende synergistische Effekte oder nicht erfasste Verbindungen.

Die gleichzeitig durch HRGC/HRMS und EROD-Bioassay analysierte Probe der Olivenölfabrik wies den hohen R_{ba} -Faktor (Bioassay^{72 h}/instrumentelle Analytik^{WHO}) von 35 auf. Abbildung 5.9 zeigt einen Vergleich dieser R_{ba} -Faktoren von allen drei Anlagen (s. 5.3.4).

Der durch die instrumentelle Analytik feststellbare I-TEQ-Wert liegt unterhalb des LOD von 17,0 pg/m³. Demgegenüber stehen 546 pg/m³ ermittelt aus dem Bioassay. Die von dieser Anlage emittierte stündliche Fracht berechnet sich nach dem Bioassay auf 8,8 µg (instrumentelle Analytik, auf Basis des LOD: 0,3 µg/h). Unter Berücksichtigung der Anlagenanzahl in Griechenland und der durchschnittlichen Betriebsdauer konnte eine Fracht pro Jahr von 2,4 g (Bioassay) bzw. 0,03 g (instrumentelle Analytik, auf Basis des LOD) festgestellt werden.

5.3.3.3 Östrogenartige Effekte

Die Emissionen der Olivenölfabrik zeigten mit beiden Testdurchführungen keine Wirkung auf den humanen Östrogen-Rezeptor der gentechnisch veränderten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen.

5.3.4 Diskussion

Die PCDD/F-Untersuchungen an drei verschiedenen Anlagentypen in Griechenland zeigen deutliche Emissionsunterschiede. Die Gründe liegen einerseits in den unterschiedlichen Verbrennungsmaterialien bzw. Erhitzungsmaterialien (Olivenölfabrik), andererseits in den unterschiedlichen Betriebstechniken.

Der sehr geringe Anteil an PCDD/F-Kongeneren in den Emissionen der Olivenölfabrik deutet auf geringe Konzentrationen an chlorhaltigen Ausgangsverbindungen hin. Der Anteil an Pestiziden bzw. an chlorhaltigen Pestiziden ist auf dem verwendeten Olivenfleisch scheinbar sehr gering. Die großtechnische Anlage zur Eisenproduktion aus Altschrott liegt mit 0,8 ng I-TEQ/m³ (instrumentelle Analytik) oberhalb des europäischen Grenzwertes von 0,1 ng I-TEQ/m³. Die 1,8 ng I-TEQ/m³ aus dem EROD-Bioassay (72 h) und die Messwerte von vier weiteren, ausschließlich mit der instrumentellen Analytik bestimmten PCDD/F-Konzentrationen, zeigen auch I-TEQ-Werte oberhalb des Grenzwertes (Tab. 5.9).

Tab. 5.9: Vergleich von I-TEQ-Werten griechischer Verbrennungsanlagen, ermittelt durch die instrumentelle Analytik

Emissionstyp	$\Sigma_{\text{PCDD/F}}$ I-TEQ (ng /m ³)	Haupt-V-strom (m ³ /h)	Fracht $\Sigma_{\text{PCDD/F}}$ I-TEQ (µg/h)	Emissions- ausstoß I-TEQ (g/a)
Fe-Anlage Prozessabluft	2,1	171565	123	0,7
Fe-Anlage Hallenabluft	0,3	449019	361	1,1
KVA	324,8	1108	360	0,3
Olivenölanlage	0,017 ^{LOD}	13237	4	0,003

Schwankungen innerhalb des Emissionsausstoßes sind auch produktionsbedingt und treten bei allen bisher beprobten Anlagen auf. In Anbetracht des jährlichen PCDD/F-Ausstoßes von 2 – 5 g zeigt dieser Industriebereich trotz der Grenzwertüberschreitung ein relativ erfolgreiches Einsetzen von den vorhandenen Sekundärmaßnahmen. Das Fehlen von Sekundärmaßnahmen, ein hoher Chlorgehalt der Ausgangsmaterialien und das Ab- und Anschalten des Verbrennungsprozesses sind bei der KVA verantwortlich für die hohen Frachten pro Stunde (330 ng).

Die in Abb. 5.9 dargestellten Faktoren zeigen zum einen das Verhältnis des biologischen Testsystems zur instrumentellen Analytik, zum anderen den Metabolisierungseffekt bzw. die Persistenz von Emissionssubstanzen.

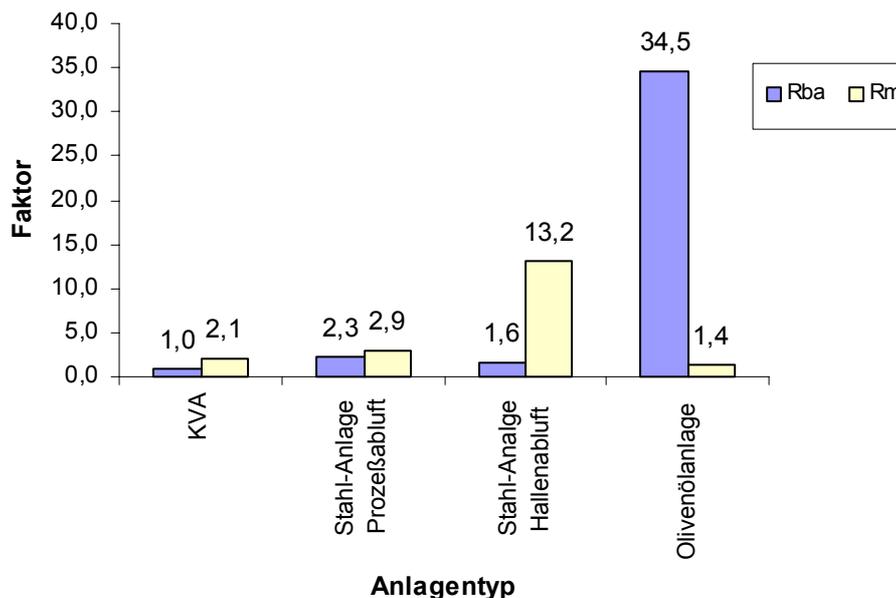


Abb. 5.9: Faktoren R_{ba} ($EROD-Bioassay^{72h}/instr. Analytik^{WHO}$) und R_m ($EROD-Bioassay^{24h}/EROD-Bioassay^{72h}$)

Das zwischen $EROD-Bioassay^{72h}$ und instrumenteller Analytik auch als R_{ba} -Faktor bezeichnete Verhältnis zeigt folgende Effekte an (s. auch (Schramm et al., 1999)): Ein Wert oberhalb 1 kennzeichnet durch die instrumentelle Analytik nicht messbare oder additive, synergistische Effekte der Kongenere. Besonders auffällig ist dieser Effekt bei der Olivenölfabrik und erklärbar durch eine Anzahl von aromatischen Verbindungen, die auch für die große Geruchsentwicklung verantwortlich sein können. Der zweite in Abb. 5.9 dargestellte Metabolisierungsfaktor kann als R_m bezeichnet werden und zeigt bei der Hallenabluft der Fe-Anlage einen relativ hohen Wert, der einen großen Anteil an nicht persistenten Verbindungen (z.B. PAK) in der analysierten Probe anzeigt (s. auch Abb. 5.8).

Der Vergleich zwischen instrumenteller Analytik und $EROD-Bioassay$ zeigt die Bedeutung der biologischen Analytik, denn ausschließlich durch die biologische Analyse ist das vollständige toxikologische Potential erfassbar. Desweiteren ermöglicht der $EROD-Bioassay$ durch die Anwendung auf 96-Loch-Platten ein Screening, das bei negativem Ergebnis die aufwendige Reinigung für die PCDD/F- und PCB-Analyse überflüssig macht. Die instrumentelle Erfassung von Dioxin- und Furanemissionen beruht nämlich auf einer äußerst aufwendigen und teuren Analytik,

die in vielen Bereichen weitgehend standardisiert und weltweit anerkannt ist. Die hohen Kosten führen jedoch zu Erfassungsproblemen der Dioxin- und Furanemissionen, so dass aus vielen Ländern keine vergleichbaren Daten zu erhalten sind. Einige Länder, wie z.B. Ungarn, schätzen daher die Dioxin- und Furanemissionen ihres Landes ab (Fiedler, 2001). Die Abschätzung von Dioxin- und Furaneinträgen in die Umwelt ist jedoch erschwert durch die Tatsache, dass es für Dioxine und Furane keine Produktionsstätten gibt und auch keine Export-/Importstatistiken oder spezielle Anwendungsmuster dieser unerwünschten Nebenprodukte vorhanden sind. Die einzige Lösung zur Erfassung liegt darin, möglichst alle potentiellen Quellen zu untersuchen. Keine Daten lagen bis vor einiger Zeit auch aus Griechenland und Portugal vor. Neuste Messungen aus Portugal (Quaß et al., 2000 b) zeigen z.B. für eine veraltete Krankenhausabfallverbrennungsanlage einen Ausstoß von PCDD/F mit 100 ng I-TEQ/m^3 an. Eine Anlage moderneren Typs erreichte sogar einen Wert unterhalb $0,1 \text{ ng I-TEQ/m}^3$. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse aus Griechenland zeigen im Vergleich dazu für eine Krankenhausabfallverbrennungsanlage ca. 325 ng I-TEQ/m^3 und unterstreichen noch einmal die Relevanz von modernen Verbrennungstechnologien. Ohne diese erreicht Griechenland allein durch die Krankenhausabfallverbrennungsanlagen einen jährlichen Ausstoß an PCDD/F von 155 g I-TEQ . Im Vergleich dazu lag der PCDD/F-Gesamtausstoß für Deutschland im Jahr 1995 bei ca. 330 g I-TEQ (UNEP, 1999) und wurde für 1997 auf 70 g I-TEQ prognostiziert (UBA, 1997).

5.4 Analyse ökotoxikologisch relevanter Materialien und Einzelsubstanzen

Die Analyse ökotoxikologisch relevanter Materialien und Einzelsubstanzen und der Vergleich mit bereits bioanalytisch bestimmten Wirkungsstärken war als weiteres Ziel dieser vorliegenden Arbeit definiert.

5.4.1 Elektronik- und Plastikschrutt

Die durch eine spezielle Verbrennungstechnik erhaltenen und in Kapitel 4.3 beschriebenen Proben wurden mit der instrumentellen (PCDD/F-Analyse) und der bioanalytischen Methode vermessen.

5.4.1.1 Instrumentelle Analytik

Von den insgesamt sechs Proben stellte sich eine Probe (73) als besonders problematisch heraus. Sie konnte aufgrund der extrem hohen Verunreinigungen nicht näher charakterisiert werden. Auch Nachreinigungen, z.B. mittels GPC-Säule, konnten den hohen Anteil an Störsubstanzen nicht eliminieren. In den Proben-Nr. 74 und 75 befand sich der geringste Gehalt an Dioxinen (9,8 ng/kg und 1,0 ng/kg). Die mit Dioxinen höher belasteten Proben konnten mit folgenden I-TEQ-Werte (nach WHO, 1998) bestimmt werden: Probe 76 zeigte einen I-TEQ-Wert von 955 ng/kg. Probe 77 war um Faktor 7 niedriger belastet (I-TEQ = 138 ng/kg) und in Probe 78 wurde ein I-TEQ-Wert von 25,5 ng/kg bestimmt.

5.4.1.2 EROD-Bioassay-Analytik

Auch bei der Analyse mit dem EROD-Bioassay stellte sich bei Probe 73 ein zu den anderen Proben differenziertes Induktionsverhalten ein. Nach einem sigmoiden Kurvenverlauf beginnt mit einer Verdünnung kleiner als 1:100 zur Ausgangskonzentration ein stetiger Abfall der spezifischen EROD-Aktivität. Eine höhere Konzentration führt also in diesem Bereich zu einer geringeren Enzymaktivität. Der EROD-TEQ-Wert wurde für diese Probe auf 32,8 mg/kg berechnet. In Abb. 5.10 ist der entsprechende Induktionsverlauf dargestellt (A), bei dem Zytotoxizität ausgeschlossen werden konnte.

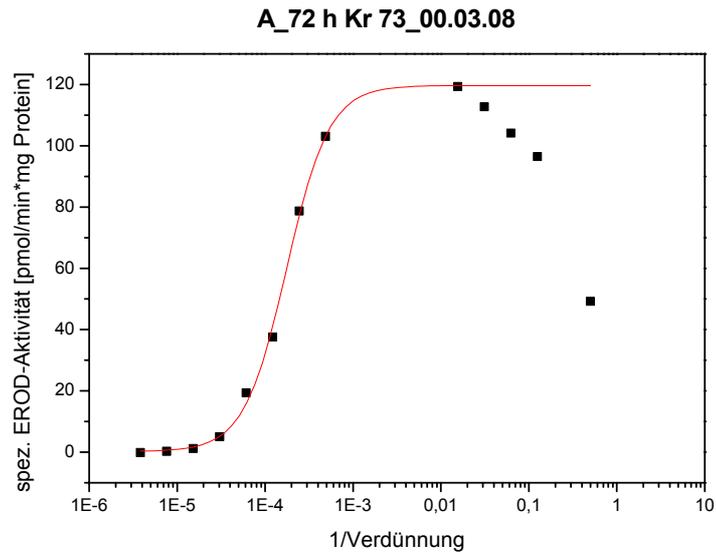


Abb. 5.10: Induktionsverhalten der Kugelkreislaufreaktorprobe 73 nach 72stündiger Inkubation

Die Proben 74 und 75 zeigten nach 72stündiger Inkubation ein Induktionsverhalten unterhalb der Detektionsgrenze von 3,1 pM. Bei Probe 76 wurde ein EROD-TEQ-Wert von 118 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gemessen. Die höchste Belastung an dioxinähnlichen Substanzen wies Probe 77 mit 89 mg/kg auf (B). In Probe 78 wurden 521 – 656 $\mu\text{g}/\text{kg}$ detektiert (C).

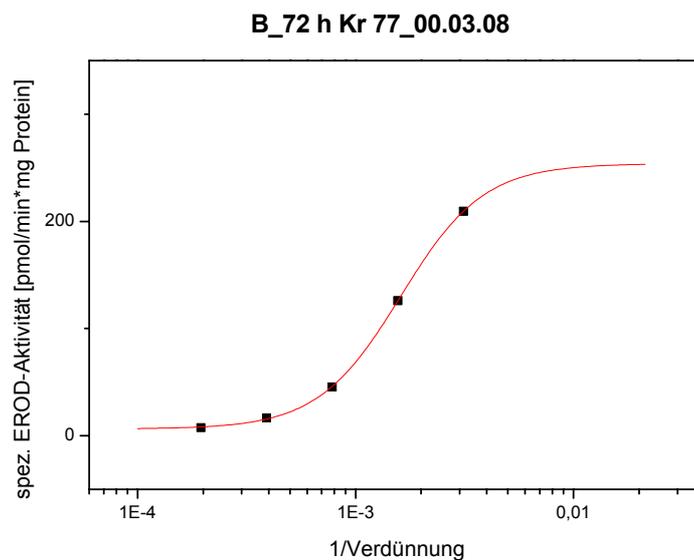


Abb. 5.11: Induktionsverhalten der Kugelkreislaufreaktorprobe 77 nach 72stündiger Inkubation

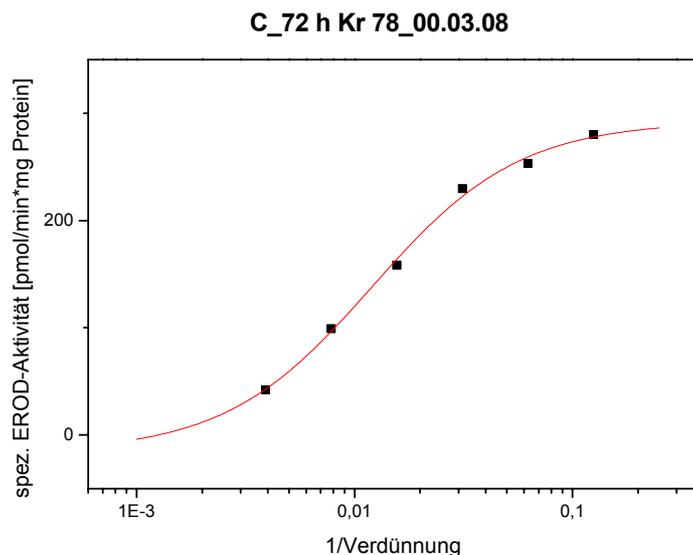


Abb. 5.12: Induktionsverhalten der Kugelkreislaufreaktorproben 78 nach 72stündiger Inkubation

5.4.1.3 Östrogenartige Effekte

Auswirkungen auf die β -Galaktosidase-Aktivität sind bei zwei von sechs Proben detektiert worden. In Tabelle 5.10 ist die Zusammenstellung der östrogenartigen Effekte dargestellt.

Tab. 5.10: Östrogenartige Effekte der Verbrennungsproben Elektronik-/Plastikschrött

Proben-Nr.	β -Galaktosidase-Aktivität	
17- β -Östradiol	+	EC ₅₀ = 0,36 nM
78	< 0,1 nM	-
77	+	1g entsprechen 1,2 μ M 17- β -EE
76	+	1g entsprechen 1,4 μ M 17- β -EE
75	< 0,1 nM	-
74	-	-
73	-	-

Die Proben 73 und 74 zeigten keine Effekte auf die β -Galaktosidase-Aktivität. Unterhalb des Detektionslimits von 0,1 nM (graphisch ermittelt) induzierten die Proben 75 und 78. Probe 77 verhielt sich mit 1 g wie 1,2 μ M 17- β -Östradiol. Bei Probe 76 wurde mit 1 g ein östrogenes Verhalten von 1,4 μ M 17- β -Östradiol detektiert (Daten nicht gezeigt).

5.4.1.4 Diskussion

Die aus fraktionierter Pyrolyse erhaltenen Plastik- und Elektronikproben eines Kugelkreislaufreaktors (Bockhorn et al., 1998) weisen stark unterschiedliche Belastungen mit Dioxinen und dioxinähnlichen Molekülen auf (Tab. 5.11).

Tab. 5.11: I-TEQ-Werte von Verbrennungsproben Elektronik-/Plastikschrott

Proben-Nr.	instr. Analytik ^{PCDD/F} I-TEQ ^{WHO}	EROD-Bioassay I-TEQ ^{72h}	Probenbeschreibung
73	-	32,8 mg/kg	Öl, Kessel 1, 330 °C
74	9,8 ng/kg	< 3,1 pM	Pulver, Rückstand Kessel 1, 400 °C
75	1,0 ng/kg	< 3,1 pM	Pulver, CaCO ₃ , Kessel 1, 400 °C
76	955 ng/kg	118 µg/kg	Öl, Kessel 2, 400 °C
77	138 ng/kg	89 mg/kg	Öl, Ölabscheider 1
78	25 ng/kg	521-656 µg/kg	Öl, Ölabscheider 2

Alle öligen Proben induzieren das CYP1A1-System. Der Vergleich der I-TEQ-Werte zeigt hohe R_{ba} -Faktoren (EROD-Bioassay^{72h}/instrumentelle Analytik) an. Die hohen R_{ba} -Faktoren zwischen 124 (Probe 76), $645 \cdot 10^3$ (Probe 77) und $21 \cdot 26 \cdot 10^3$ (Probe 78) deuten auf einen hohen PCB-Anteil und/oder mit der instrumentellen Analytik nicht messbare oder additive, synergistische Effekte hin. Die in pulverisierter Form vorliegenden Proben zeigen geringe I-TEQ-Werte. Der Grund könnte bei Probe 74 am Ausheizen des betreffenden Kesselrückstandes liegen. Eine mögliche Ursache bei Probe 75 wäre die CaCO₃-Zufuhr zum Elektronikschrott, die letztendlich zur Bildung von CaCl₂, CO₂ und H₂O führt und damit eine Entstehung von polychlorierten aromatischen Verbindungen vermindert.

Die in den drei Ölen vorliegenden PCDD/F und dioxinähnlichen Substanzen zeigen unterschiedliche Toxizitätsäquivalente, was für eine erfolgreiche Trennung hinsichtlich der toxischen Effekte spricht. Eine genauere Analyse der einzelnen Verbindungen würde genauere Hinweise auf die Trennungsqualität des Kugelkreislaufreaktors geben. Für das bei Probe 73 auffällige CYP1A1-Induktionsverhalten, hohe Induktion bei niedrigen Konzentrationen und niedrige Induktion bei hohen Konzentrationen, können verschiedene Mechanismen die Ursache sein. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, transformiert der AhR-Arnt-Ligand-Komplex in den Zellkern und bindet an spezifische regulatorische Sequenzen der

DNA. Durch Bindung an diese sogenannten XRE (*xenobiotic responsive elements*) wird die Transkription der nachfolgenden Gene aktiviert, die eine Induktion des CYP1A1 zur Folge hat. Dieses allgemein akzeptierte Modell der CYP1A1-Induktion wurde von Delecluse und Mitarbeitern als einzige Induktionsmöglichkeit in Frage gestellt (Delecluse et al., 2000). Delecluse zeigt CYP1A1-Induktion durch Induktoren auf, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften nicht Liganden des Ah-Rezeptors sind. Signaltransduktionswege über RARE (*retinoid acid responsive element*) oder Tyrosinkinasen stehen zur Diskussion. Die unbekannt Substanzen der Probe 73 können damit durch direkte Wechselwirkungen oder rezeptorvermittelt zu einer Signalverstärkung führen. Die in Abb. 5.10 dargestellte Induktion des CYP1A1-Systems durch Probe 73 kann also auch auf einen weiteren Rezeptor hindeuten, dessen Auswirkungen ein absinkendes CYP1A1-Signal ist. Die verminderte EROD-Aktivität kann auch auf supressive Eigenschaften von Substanzen hindeuten, die konzentrationsabhängig sind. Eine weitere Möglichkeit könnte folgende zu sein: Die von Ma und Baldwin aufgezeigte Superinduktion des CYP1A1 kommt scheinbar durch Störung der TCDD-induzierten AhR-Degradation zustande. Voraussetzung dafür sind Substanzen, die den 26S-Signalweg beeinflussen (Ma und Baldwin, 2002). Die Folge ist eine erhöhte Menge an AhR und CYP1A1-Induktion. Auf die untersuchte Probe 73 bezogen könnte dies der Grund für die spezifischen EROD-Aktivitäten bis 120 pmol/min*mgProtein sein. Eine Erhöhung der Konzentration könnte jedoch zur Verminderung an AhR-Menge oder zu geringeren Interaktionen zwischen AhR/ARNT und DNA führen (Ma und Baldwin, 2000 und Reick et al., 1994). Die Folge wäre ein Abfall der spezifischen EROD-Aktivität.

5.4.2 *Flammschutzmittel*

Die zwei in Kapitel 4.4 beschriebenen Flammschutzmittel enthaltenden Kunststoffproben (jeweils 1 g) wurden nach der Verbrennung ohne Extraktion, jedoch mit dem EROD-Bioassay-Reinigungsschritt bearbeitet. Eine Bestimmung mittels instrumenteller Analytik wurde nicht durchgeführt. In Abbildung 5.13 sind die Grundgerüste der untersuchten Substanzen gezeigt.

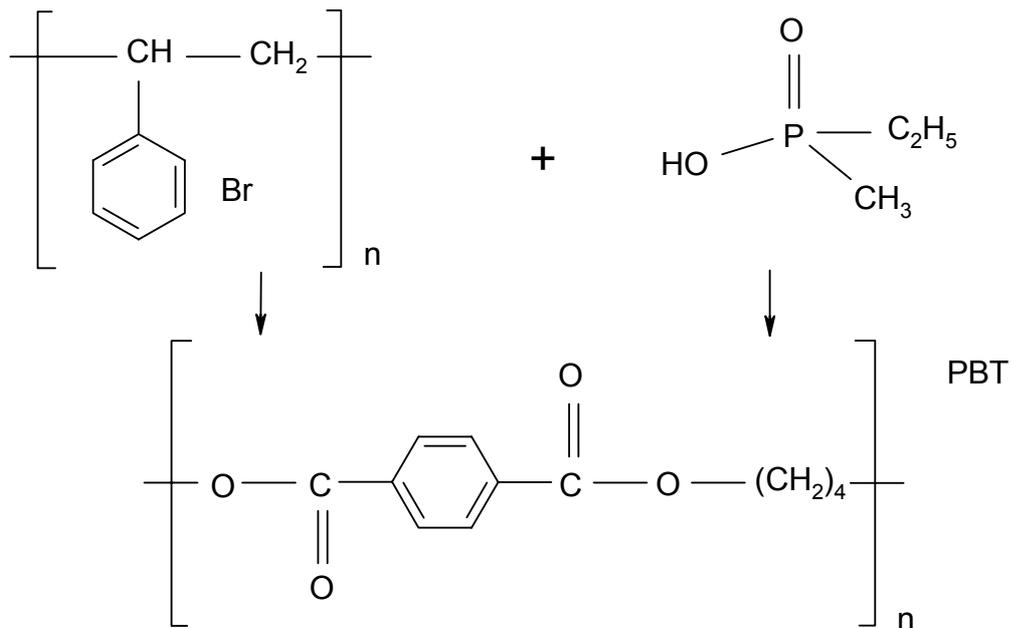


Abb. 5.13: Reaktionsschema zur Herstellung der Kunststoff-Flammschutzmittelprobe

5.4.2.1 EROD-Bioassay-Analytik

Nach 24- und 72stündigen Inkubationen der Rattenhepatomzellen mit den Verbrennungsprodukten erfolgte die Bestimmung der Deethylase-Aktivität. Die Tabelle 5.12 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 5.12: EROD-TEQ-Werte der Flammschutzmittel-enthaltenden Kunststoffverbindungen; der nicht bestimmbare (n.b.) TEQ-Wert nach 72 h (Probe 14) zeigte Induktionseffekte unterhalb der Bestimmungsgrenze (0,8 pM).

Proben-Nr.	Inkubationszeit	TEQ-Wert ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
14	24 h	0,58-0,69
14	72 h	n.b.
15	24 h	648-880
15	72 h	96-165

Probe 14 enthielt phosphorhaltige Verbindungen, die keinen Induktionseffekt auf das CYP1A1-System hervorriefen. In Probe 15 waren bromierte Verbindungen vorhanden. Nach 24 h Inkubation konnten zwischen 648-880 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EROD-TEQ detektiert werden. Nach 72 h und erfolgtem Metabolismus einiger Verbindungen reduzierte sich der TEQ-Wert auf 96-165 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mit einem R_m -Faktor von 4 - 9.

5.4.2.2 *Östrogenartige Effekte*

Es konnte eine sehr schwache Aktivitätserhöhung der β -Galaktosidase für beide Proben festgestellt werden. Beide Erhöhungen lagen jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,1 nmol/L (96-Loch-Plattentest).

5.4.2.3 *Diskussion*

Die größten Verbraucher von Flammschutzmitteln sind die USA (40 % der Weltgesamtmenge), mit 28 % folgt Westeuropa und mit 22 % Japan. In der Elektroindustrie sind z.B. 1/6 der eingesetzten Kunststoffe mit Flammschutzmitteln ausgerüstet, die wiederum zu 40 % auf halogenhaltigen Verbindungen basieren (ZVEI, 1998). Halogenverbindungen sind die gebräuchlichsten Flammschutzmittel, da sie unabhängig vom Kunststoff einsetzbar sind. Hutzinger zeigte, dass neben den Brandbedingungen auch Flammschutzmittel auf Basis bromierter Diphenylether zu einer erhöhten Bildungswahrscheinlichkeit von PBrDD/F führen (Hutzinger, 1990). Diese Ergebnisse können mit der dargestellten CYP1A1-Induktion der bromierten Verbrennungsprobe bestätigt werden.

Die Entwicklung halogenfreier Flammschutzmittel wurde ab 1990 verstärkt durchgeführt und fand in Phosphorverbindungen eine Gruppe, die einen weiten Anwendungsbereich abdeckt. Zu den neueren Entwicklungen in dieser Gruppe gehören die Organo-Phosphorverbindungen, die z.B. bei den Gehäusewerkstoffen Polyesterol und Polycarbonat zum Einsatz kommen. Die Fähigkeit zur CYP1A1-Induktion dieser Flammschutzmittel wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht und zeigte keinen Effekt auf dieses Enzymsystem. Das neu entwickelte Produkt zum Flammschutz kann dadurch im Hinblick auf dioxinähnliche Wirkung als (ökotoxikologisch) unbedenklicher als die bromierte Verbindung eingestuft werden.

5.4.3 *Pestizide*

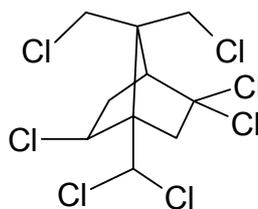
Pestizide wurden vor allem in den letzten 50 Jahren verstärkt angewandt. Sie breiten sich in der Umwelt aus und sind inzwischen in den technologisch fortgeschrittenen Ländern in fast allen menschlichen und tierischen Geweben, in Böden und Nutzpflanzen sowie im Grundwasser und in Flüssen und Seen nachzuweisen. Pestizide (Biozide) umfassen Insektizide, Herbizide und Fungizide. Einige der wichtigsten Typen der gegenwärtig eingesetzten Verbindungen sind in Tabelle 5.13 aufgelistet.

Tab. 5.13: Einteilung der wichtigsten Pestizidgruppen nach ihren Anwendungsbereichen und einige der Wirkstoffen zugrundeliegenden Stoffklassen

Pestizidgruppe	Anwendung	Stoffklasse (Anwendung)
Insektizide	Insektenabtötung	halogenierte Kohlenwasserstoffe (z.B. DDT, Lindan); Pyrethroide Phosphorsäureester (z.B. Malathion, Parathion); Carbamate (Pyramat)
Fungizide	Pilzvernichtung	unterschiedliche Stoffklassen; häufig metallorganische Verbindungen (mit Sn, Zn, Hg ^{in BRD seit 1988 verboten})
Herbizide	Unkrautvernichtung	Phenoxy-carbonsäuren heterozyklische Verbindungen (z.B. Paraquat)

Die hier aufgeführten Handelsnamen sind in der BRD zugelassene Produkte. Eine Reihe bekannter Pestizide wie Lindan, Carbaryl und PCP sind entsprechend der Pflanzenschutz-Anwendung-VO vom 27.02.1988 verboten.

Zu den nicht mehr verwendeten Insektiziden gehört auch Toxaphen, ein aus über 670 Substanzen bestehendes Gemisch. Bekannt ist Toxaphen auch unter den folgenden Namen wie Camphechlor, Chlorocamphen, Polychlorocamphen und chloriertes Camphen (s. Abb. 5.14). Das in der BRD verbotene Toxaphen ist in einigen afrikanischen Staaten und in Asien jedoch immer noch im Gebrauch. Die Analyse und Risikoabschätzung dieser und der noch weltweit angewendeten Substanzen ist damit immer noch von großer Bedeutung.



2,5,5,8c,9b,10a,10b-Heptachlorbornan

Abb. 5.14: Struktur einer von 670 existierenden Toxaphenverbindungen

Durch die häufige Anwendung bis zum Ende der 80er Jahre akkumulierte das schlecht wasserlösliche Insektizid Toxaphen in der Umwelt und führte bei hohen Dosen zu Schädigungen der Lunge, des zentralen Nervensystems und der Nieren. Die Auswirkungen dieses immer noch vorhandenen Pestizids in niedrigen Dosen ist noch unbekannt. Tierversuche mit Toxaphen kontaminiertem Wasser und Futter zeigten Schädigungen u.a. an der Leber, den Nieren und dem Immunsystem. Die letale Dosis (oral) für Ratten liegt bei 80 – 90 mg/kg, der EC_{50} -Wert bei *Daphnia magna* bei 10 µg/L (48 h).

Die Synthese und Anwendung neuer Pestizide ist aufgrund von Resistenzen, Umweltschäden und neuen Verordnungen zwingend notwendig. Die Basis bilden diverse Stoffklassen, wie z. B. Phosphorester-, Phenol-, Benzol- und Essigsäurederivate. Pyrethroide und Triazine sind weitere Beispiele für mögliche Pestizidsubstanzen. In Abb. 5.15 sind einige der getesteten Pestizide dargestellt.

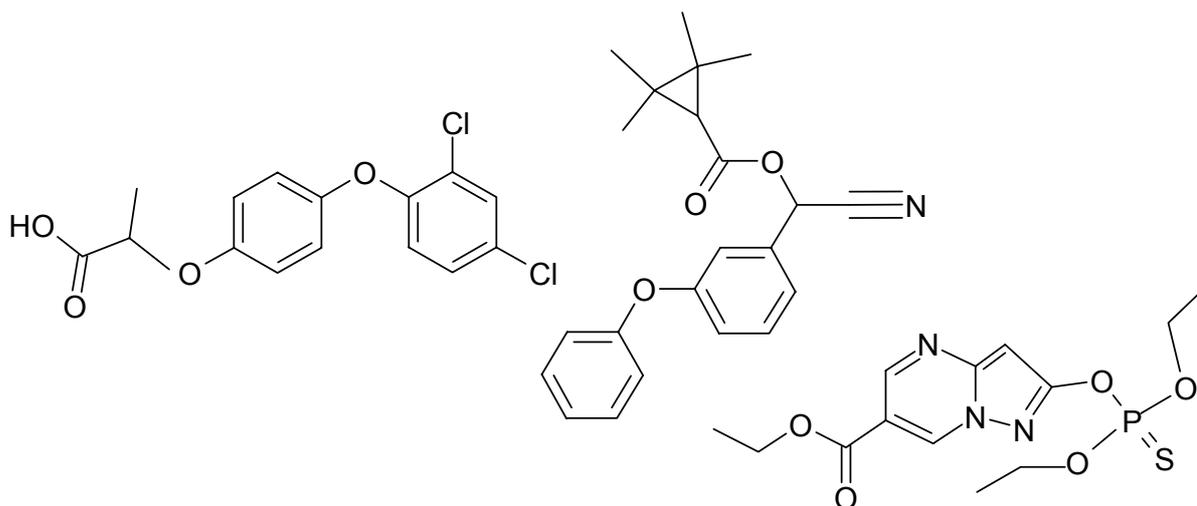


Abb. 5.15: Drei Strukturen von 84 getesteten Pestizidsubstanzen, die sich in sieben Gemischen befanden

Insgesamt wurden sieben Gemische mit einer Konzentration von jeweils 100 ng/ μ l DMSO/Isopropanol (4:1, v:v) getestet. Die sieben Gemische bestanden aus 3 – 21 Einzelsubstanzen, die zum Teil chlorhaltig waren und aus patentrechtlichen Gründen hier nicht vollständig gezeigt werden dürfen. Die Testung von Phosphorestern oder anderen aufgrund ihrer Struktur nicht induktionsfähigen Substanzen wurde durchgeführt, um eine eventuell auftretende AhR-unabhängige CYP1A1-Induktion festzustellen. Delescluse und Mitarbeiter zeigten dieses z.B. für das Insektizid Carbaryl auf (Delescluse et al., 2000).

5.4.3.1 EROD-Bioassay-Analytik

In der vorliegenden Arbeit konnte eine schwache Induktion des CYP1A1-Systems durch das technische Toxaphengemisch ($c = 1 \mu\text{M}$, d.h. 0,5 pmol/Loch) festgestellt werden. Die Induktion lag jedoch unterhalb des linearen Detektionsbereiches und entsprach bei einer maximalen spezifischen EROD-Aktivität von 100 % durch 2,3,7,8-TCDD nur 6,5 % (Daten nicht gezeigt).

Die in Gemischen vorliegenden 84 Verbindungen zeigten keine Induktion des CYP1A1-Systems. Die Aktivitätsmessungen der CYP1A1-Deethylase erfolgten nach 24-stündiger Inkubation. Mögliche additive und synergistische Effekte können mit diesem Ergebnis auch ausgeschlossen werden.

5.4.3.2 *Östrogenartige Effekte*

Östrogenartige Wirkungen von den Pestizidgemischen (100 ng/µl) und vom technischen Toxaphengemisch (2 pmol/Loch) konnten nicht festgestellt werden. Die Analyse wurde mit dem 96-Loch-Platten-Test durchgeführt und zeigte keine Aktivitätssteigerung der β -Galaktosidase (LOD (17- β -Östradiol) = 0,1 nM beim 96-Loch-Platten-Test und 0,8 nM beim Flaschen-Test).

5.4.3.3 *Diskussion*

Die weltweite Produktion an Pestiziden steigt jährlich und beträgt derzeit etwa 5 Millionen Tonnen. Die gesetzliche Regelung des Pestizidgebrauchs ist in der EU und Ländern außerhalb der EU unterschiedlich. So ist das bekannte Herbizid Atrazin (wird hauptsächlich im Maisbau eingesetzt) in Österreich seit 1994 verboten. Derzeit überprüft die EU mit einem toxikologischen Bewertungsverfahren, ob Atrazin auf eine Positivliste gesetzt und damit auch wieder in Österreich zugelassen werden darf. In beiden Bioassays zeigten die untersuchten z. T. chlor- und bromhaltigen Substanzen keine Induktionseffekte, d.h. es kann dioxinähnliches und östrogenähnliches Verhalten in den getesteten Konzentrationen ausgeschlossen werden. Ausgeschlossen werden kann durch das beschriebene Experiment auch ein additives oder synergistisches Verhalten dieser Substanzen.

Toxaphen führt beim Menschen zu einer diffusen Stimulation des Zentralnervensystems (Korte et al., 1979) und bei Ratten und Mäusen in hoher Dosis zu einer Häufung von Leberkarzinomen. Die Toxizität und Karzinogenität von Toxaphen hängt stark von der Zusammensetzung des Gemisches ab und zeigte in dieser Arbeit mit einer Konzentration von 1 µM, das entsprach 0,5 pmol/Loch, keine Induktion des CYP1A1-Systems. Über die Toxizität einzelner Komponenten ist bisher wenig bekannt. Aufgrund der selektiven Anreicherung einiger Verbindungen wären weitere Analysen interessant, wobei besonders die Änderung der Toxizität hinsichtlich der Stellung von Chloratomen untersucht werden sollte (Coelhan et al., 1998). Die Trennung der einzelnen Toxaphen-Verbindungen aus dem Gemisch stellt jedoch aufgrund der ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften eine besondere analytische Herausforderung dar.

5.4.4 Cannabinoide

Cannabis enthält bis zu 60 verschiedene zum Teil psychoaktive Verbindungen. Das bekannteste Cannabinoid ist das Tetrahydrocannabinol (THC). Folgende THC-Verbindungen sind bekannt: Δ^9 -THC, Δ^8 -THC und Δ^6 -trans-THC. In der Hanfpflanze kommt überwiegend Δ^9 -THC vor, das für die berauschende Wirkung verantwortlich zu sein scheint. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil des Cannabisharzes ist das Cannabidiol (CBD). CBD selbst ist nicht psychoaktiv, kann aber Effekte von THC beeinflussen. Die betäubende/ermüdenden Eigenschaften des THC werden unterstützt, die erregende Wirkung vermindert. Ein weiterer Bestandteil ist das Cannabinol (CBN), dessen Wirkung der des CBD ähnelt (Lit.: www.cannabis-archiv.de). Die Abbildung 5.16 zeigt Δ^9 -THC, CBD und CBN.

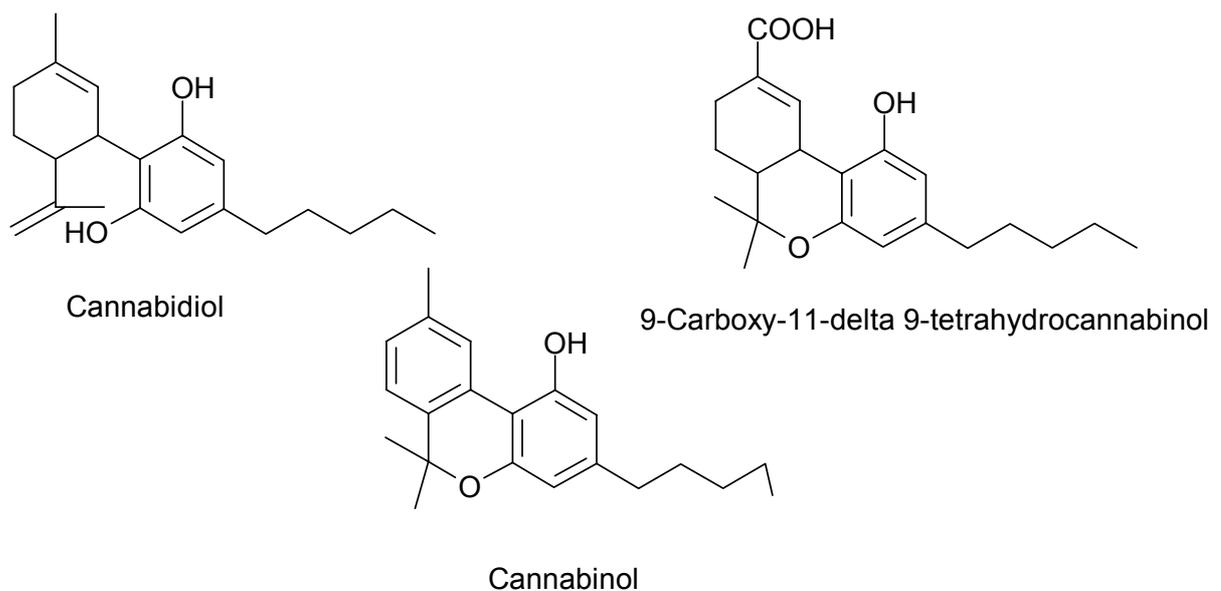


Abb. 5.16: Strukturen der Cannabis-Verbindungen Δ^9 -THC, CBD und CBN

5.4.4.1 EROD-Bioassay-Analytik

Bei der Analyse des Cannabisrauch-Hauptstromes (Cannabis-Menge: 1,02 g; keine Anwendung der Bioassay-Säule) konnte eine konzentrationsabhängige und eine sich unter dem Bestimmungslimit (1,05 pM) befindende Induktion festgestellt werden. Der getestete Konzentrationsbereich lag zwischen 0,25 – 4,0 mg/ml bzw. 0,13 – 2,0 µg/Loch. Toxizitätseffekte traten ab 4,0 mg/ml auf (nur 75 % lebende Zellen, Daten

nicht gezeigt). Induktion konnte oberhalb einer effektiven Konzentration von 0,5 mg/Loch detektiert werden, was jedoch immer unterhalb von 0,1 pg/Loch 2,3,7,8-TCDD-Äquivalenten lag.

Von den Einzelsubstanzen Δ^9 -THC (c= 39,8 μ M), CBD (c= 10,2 μ M) und CBN (c= 1,3 μ M) zeigte nur Δ^9 -THC einen leichten Induktionseffekt, der sich wie der Cannabisrauch-Hauptstrom unterhalb des Detektionslimits befand.

5.4.4.2 *Östrogenartige Effekte*

Die Cannabis-Hauptstrom-Probe zeigte östrogenartige Effekte. Mit einem EC_{50} von 0,07 g/L weist 1 g der analysierten Cannabis-Hauptstrom-Probe ein östrogenes Potential wie 0,58 nmol 17- β -EE auf. Die Analyse der Einzelsubstanzen zeigte, dass weder die Substanzen Cannabidiol, CBD (c= 81,2 nmol/Loch), Cannabinol, CBN (c= 10,4 nmol/Loch) noch Δ^9 -THC (c= 318 nmol/Loch) östrogenartige Effekte hervorrufen konnten. Analysiert wurde mit dem 96-Loch-Platten-Test mit einer Bestimmungsgrenze von 0,1 nM.

5.4.4.3 *Diskussion*

Roth und Mitarbeiter (Roth et al., 2001) stellten CYP1A1-Induktion durch Teerrückstände von Tabak- und Marijuana-Zigaretten fest. Die durch Marijuana-Zigaretten gesteigerte Enzymaktivität war um 40-50 % geringer als die durch Tabak-Zigaretten. Durch Δ^9 -THC-Zugabe zur Tabak-Zigarette reduzierte sich die Enzymaktivität auf 56 % (konzentrationsabhängig), so dass auf inhibierende Wirkungen durch Δ^9 -THC geschlossen wurde. Untersuchungen zur Induktionsfähigkeit des Δ^9 -THC wurden im Rahmen der Studie nicht durchgeführt. Die in dieser Arbeit durchgeführte und unterhalb der Bestimmungsgrenze liegende Induktion von CYP1A1 durch eine Cannabis-Hauptstrom-Probe könnte aus den folgenden zwei Gründen zu keiner Enzymaktivitätssteigerung führen: Zum einen kann ein erhöhter Gehalt an Δ^9 -THC in der verwendeten Cannabis-Sorte vorhanden sein und damit Enzym-Hemmung auftreten. Die Konzentrationen an Δ^9 -THC schwanken von Anbauggebiet zu Anbauggebiet und sind wetterabhängig. Eine andere Möglichkeit kann die Konzentration an induzierfähigen Substanzen sein, die im Zigarettenrauch um ein Vielfaches geringer ist als im Teer. Die detektierbare, aber nicht bestimmbare Induktion des CYP1A1 durch Δ^9 -THC könnte auf Interaktionen des Δ^9 -THC mit dem Ah-Rezeptor hinweisen (s. auch Kapitel 5.5.3.3).

Über die Interaktion von cannabinoiden Verbindungen mit dem Östrogen-Rezeptor gibt es in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse. Erste Untersuchungen von Rawitch und Mitarbeiter (Rawitch et al., 1977) zeigten spezifische Bindungen zwischen Δ^9 -THC und Östrogen-Rezeptoren aus Ratten-Gebärmutter. Chakravarty und Naik (Chakravarty und Naik, 1983) untersuchten mit diversen In-vitro-, In-vivo- und Ex-vivo-Techniken die möglichen Effekte von Δ^9 -THC auch mit Ratten-Östrogen-Rezeptoren, wobei ein eindeutiger Beweis der Interaktion ausblieb. Sauer und Mitarbeiter (Sauer et al., 1983) schloss auch Bindungen zwischen Δ^9 -THC, CBN und dem Östrogen-rezeptor aus. Diese mit zytosolischen Östrogen-rezeptoren der Ratten-Gebärmutter durchgeführten Experimente stehen nicht im Widerspruch zu Studien mit MCF-7-Zellen. Ruh (Ruh et al., 1997) kam mit den Ergebnissen der Brustkrebszellen zu dem Schluss, dass cannabinoide Verbindungen, wie Δ^9 -THC und CBD, nicht als Xenoöstrogene fungieren. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstützen diese Schlussfolgerung. Durch die östrogenartige Wirkung des Cannabis-Hauptstromes, die auch Sauer (Sauer et al., 1983) feststellte, liegen Hinweise auf die Induktionsfähigkeit unbekannter Substanzen im Hauptstrom vor. Weitere Studien sind für die Identifikation dieser Substanzen des Cannabis-Hauptstrom-Rauches erforderlich.

5.4.5 *Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)*

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe bestehen aus mindestens drei kondensierten Benzolkernen und enthalten außer C und H keine anderen Atome. Sie werden gebildet, wenn organische Stoffe bei Temperaturen über 700 °C verbrennen bzw. einer Pyrolyse unterliegen. Pflanzen und Bakterien synthetisieren außerdem einige Vertreter der PAK. Elf von 40 PAK, die toxikologisch und ökotoxikologisch relevant sind, sind starke Karzinogene, weitere zehn PAK sind schwach karzinogen bzw. mutagen. Die Karzinogenität beruht auf der schon geschilderten (s. Kapitel 2.3.3 und 4.7.1) Bildung reaktiver Metaboliten durch P450-Oxygenasen vom Typ CYP1A1/A2. Ob und in welchem Ausmaß die stets vorhandenen Spuren von PAK und die bei ihrem Metabolismus gebildeten reaktiven Metaboliten Anlass zu Veränderungen der DNA und Entstehung von Mutationen sind, ist weitgehend unbekannt.

5.4.5.1 EROD-Bioassay-Analytik

Die in dieser Arbeit getesteten PAK waren Anthracen, Chrysen, Fluoranthen und dessen Metabolit 3-Hydroxy-Fluoranthen (Abb. 5.17).

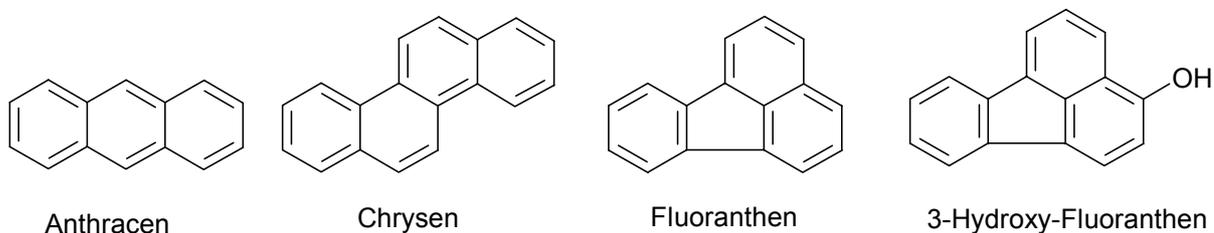


Abb. 5.17: Strukturen von Anthracen, Chrysen, Fluoranthen und 3-Hydroxy-Fluoranthen

Der EROD-Bioassay weist bei 0,8 pM das Detektionslimit und bei 6,2 pM den EC₅₀-Wert auf. Anthracen zeigte bei einer Konzentration von 0,13 µmol/Loch keinen Induktionseffekt. Kein Induktionseffekt konnte auch bei Fluoranthen (5 µmol/Loch) festgestellt werden. 3-Hydroxy-Fluoranthen (5 µmol/Loch) und Chrysen (44,2 pmol/Loch) induzierten das CYP1A1-System, jedoch unterschiedlich stark. In Tab. 5.14 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tab. 5.14: Relative TEF-Werte nach 24 h und 72 h für vier PAK. Die Berechnung erfolgte im Vergleich zu 2,3,7,8-TCDD, dem der TEF-Wert 1 zugeordnet ist. Das Verhältnis zwischen den EC₅₀-Werten der PAK zum EC₅₀-Wert vom 2,3,7,8-TCDD ergab die aufgeführten rel. TEF.

PAK	rel. EROD-TEF ^{72 h}	rel. EROD-TEF ^{24 h}	rel. EROD-TEF ^{24 h} Hofmaier
Anthracen	n.b. ($< 5 \cdot 10^{-6}$)	n.b. ($< 5 \cdot 10^{-6}$)	n.b.
Chrysen	$4,4 \cdot 10^{-6}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	n.b.
Fluoranthen	n.b. ($< 1,2 \cdot 10^{-7}$)	$2,1 \cdot 10^{-7}$	n.b.
3-Hydroxy-Fluoranthen	n.b. ($< 1,2 \cdot 10^{-7}$)	$5,0 \cdot 10^{-6}$	-

Die bei den nicht bestimmbaren relativen EROD-TEF aufgeführten Werte beziehen sich auf die Annahme, dass die maximal eingesetzte Konzentration den EC₅₀-Wert entspricht. Der tatsächliche EROD-TEF muss, falls er in Zukunft bestimmbar wird, unter den aufgeführten Wert liegen. Der Vergleich mit den von Hofmaier ermittelten relativen TEF-Werten zeigt nur beim Anthracen Übereinstimmung.

5.4.5.2 Östrogenartige Effekte

Getestet wurden die östrogenähnlichen Eigenschaften von Anthracen und Chrysen mit dem 96-Loch-Platten-Test. Für beide Substanzen konnten keine Auswirkungen auf die β -Galaktosidase-Aktivität festgestellt werden. Die Analyse der östrogenartigen Eigenschaften von Fluoranthen und 3-Hydroxy-Fluoranthen fand ausschließlich mit dem Flaschentest statt. Es konnte keine Aktivitätssteigerung der β -Galaktosidase detektiert werden.

5.4.5.3 Diskussion

Die Bestimmung der In-vitro-CYP1A1-Induktion von Anthracen, Chrysen und Fluoranthen wurde von mehreren Arbeitskreisen untersucht und führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die in der vorliegenden Arbeit für Anthracen nicht festgestellte EROD-Induktion stimmt mit anderen Ergebnissen aus In-vitro-Bioassays überein (z.B. (Fent und Jung, 2000) und (Machala et al., 2001)). Anthracen scheint damit nicht als Induktor des CYP1A1 zu fungieren. Für Fluoranthen gibt es unterschiedliche Induktionsnachweise der EROD-Aktivität. Bosveld (Bosveld et al., 2002) detektierte eine Aktivität, jedoch mit einer LEC (*lowest effective concentration*) von 9,98 μ M, wobei eine EC_{50} -Bestimmung nicht durchgeführt wurde bzw. werden konnte. Fluoranthen und besonders 3-Hydroxy-Fluoranthen können mit den vorliegenden Ergebnissen daher als sehr schwache Induktoren eingestuft werden. Der Effekt von Chrysen in vitro auf das CYP1A1-System zeigt mit einem EC_{50} von 1,4 μ M eine im Vergleich zum Anthracen höhere Induktionsfähigkeit. Die Fähigkeit zur Induktion des CYP1A1-Systems durch PAK scheint abhängig von der Anzahl der aromatischen Ringe zu sein. Eine Anzahl von mehr als drei Ringen führt zu einer erhöhten Induktionsfähigkeit. Dies lässt sich mit dem Vorhandensein der Bay-Region erklären und einer weiteren Bindungsregion des Ah-Rezeptor (s. auch Kapitel 4.7.1). Für den Ah-Rezeptor existieren scheinbar zwei Klassen von Induktoren. Die eine Klasse ist strukturähnlich mit dem 2,3,7,8-TCDD, das an eine relativ kleine Bindungsfläche des Rezeptors bindet. Voraussetzung dafür sind eine planare Konfiguration und ein bestimmtes Substitutionsmuster. Die zweite Bindungsfläche des Ah-Rezeptors scheint etwas größer zu sein und bindet bevorzugt chlorfreie Polyaromaten wie Benz(a)pyren (Marquardt und Schäfer, 1994).

Der Vergleich der Ergebnisse verdeutlicht die Notwendigkeit eines einheitlichen und anerkannten Systems für die Erfassung biologischer Endpunkte (s. auch Kapitel

5.1.4). In Abhängigkeit von verwendeter Spezies und individueller Durchführung variierten die für Chrysen ermittelten und mit der Literatur verglichenen Daten um den Faktor 20.

5.4.6 Phenolische Verbindungen, Biphenyl und TCDQ

Zur Erweiterung der im Institut für Ökologische Chemie unternommenen Untersuchungen von ökotoxikologisch relevanten Substanzen erfolgte die Analyse diverser Einzelsubstanzen, die aufgrund ihrer Struktureigenschaften mögliche Effekte auf das CYP1A1-Systems haben könnten und über deren Wirkung hinsichtlich dieses Systems keine Angaben bekannt sind. Alle nachfolgend aufgeführten Substanzen besitzen ökologische und/oder medizinische Relevanz. In Abbildung 5.18 sind die Strukturen dargestellt und die Induktionseffekte anschließend beschrieben.

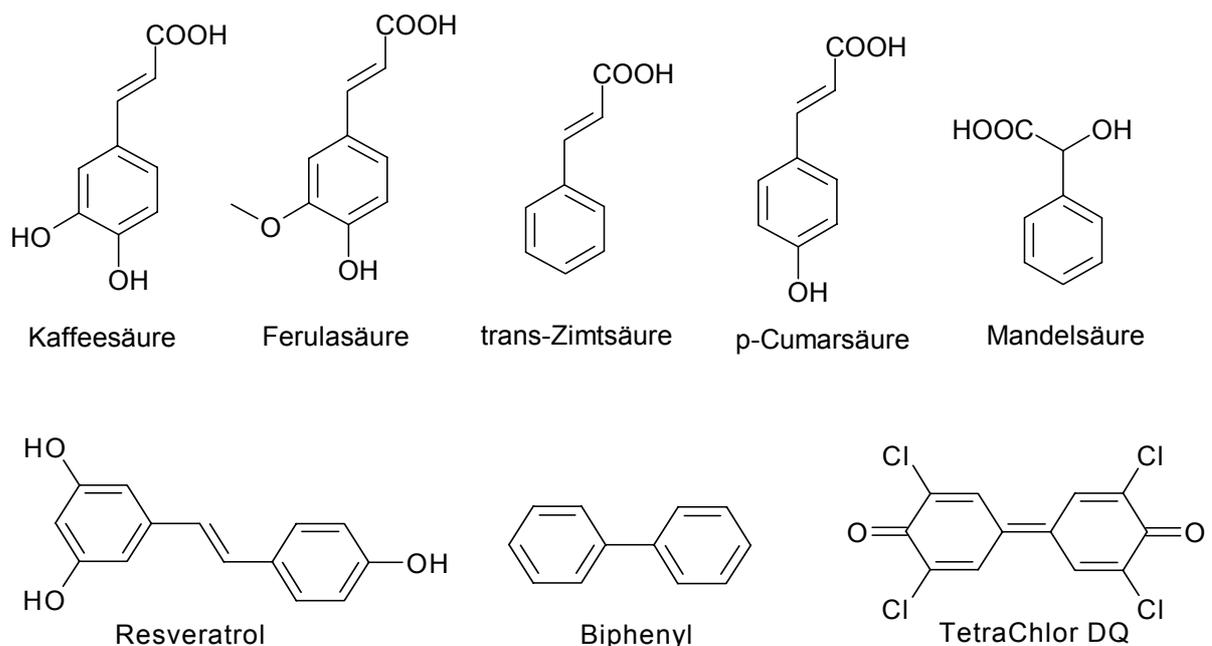


Abb. 5.18: Strukturen von getesteten Einzelsubstanzen

Phenolsäuren, wie die Cumar- und Kaffeesäure, gehören neben den Flavonoiden und Gerbstoffen zu der Gruppe der Polyphenole und kommen in nahezu allen Samenpflanzen vor. Dadurch gehören sie vermutlich zu der am meisten aufgenommenen Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Für die Pflanze haben diese Stoffe eine Schutzwirkung gegenüber äußeren, schädigenden Einflüssen und so kommen sie in den äußeren Schichten wie Schalen oder Blätter in

sehr hohen Konzentrationen vor. Resveratrol kommt u.a. im Rotwein vor und gilt als gesundheitsfördernde Substanz. Es soll gegen Thrombosen, Arteriosklerose und auch bei der Krebsprophylaxe wirksam sein.

Tetrachlor DQ, auch TCDQ oder 3,3',5,5'-Tetrachlor-4,4'-Diphenyloquinon genannt, besitzt keine der genannten Eigenschaften, sondern steht in der Diskussion dioxinähnliches Potential zu besitzen. TCDQ kommt u.a. in Flugaschen von Abfallverbrennungsanlagen vor und bildet sich unter oxidativen Bedingungen aus phenolischen Vorläufern, wie z.B. Phenol oder 2-Methyl-6-Methoxyphenol (Otto et al., 1998).

5.4.6.1 EROD-Bioassay-Analytik

Die Induktionsversuche der H4IIE-Zellen mit den beschriebenen Substanzen erfolgten für 24 h und 72 h. Nach 24 h konnte eine schwache Induktion des CYP1A1-Systems bei vier Substanzen (Resveratrol, Tetrachlor DQ, *p*-Cumar- und Mandelsäure) festgestellt werden. Keine Induktion ließ sich bei Kaffeesäure, Pyren, Biphenyl, Ferula- und Zimtsäure nach 24 h detektieren. Nach 72stündiger Inkubation zeigte keine der Substanzen Induktionseffekte. Die folgende Tabelle 5.15 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 5.15: Zusammenfassung der CYP1A1- Induktionsexperimente durch Einzelsubstanzen

Substanz	Konzentration pro Loch	CYP1A1-Induktion 24 h
Biphenyl	0,57 µmol	keine Induktion
Mandelsäure	0,16 µmol	< 0,1 pg/Loch (Detektionslimit)
Kaffeesäure	0,37 nmol	keine Induktion
Ferulasäure	0,31 µmol	keine Induktion
<i>p</i> -Cumarsäure	0,43 µmol	< 0,1 pg/Loch (Detektionslimit)
Zimtsäure	0,38 µmol	keine Induktion
Resveratrol	0,84 nmol	< 0,1 pg/Loch (Detektionslimit)
TCDQ	0,78 nmol	< 0,1 pg/Loch (Detektionslimit)

5.4.6.2 Östrogenartige Effekte

Alle auf CYP1A1-Induktion getesteten Substanzen wurden hinsichtlich der Interaktion mit dem Östrogen-Hormon-Rezeptor analysiert. Resveratrol (0,64 µmol/Loch) und TCDQ (9,24 nmol/Loch) zeigten 17-β-EE ähnliches Verhalten. Die nicht aufgeführten

Substanzen konnten die Aktivität der β -Galaktosidase nicht erhöhen. Resveratrol zeigte einen EC_{50} -Wert von 130 μ M, TCDQ lag unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,1 nM (17- β -Östradiol).

Die Substanzen mit östrogenartigem Verhalten wurden auch auf mögliche Interferenzen mit dem Farbstoff CPRG getestet, die jedoch keine Substanz aufwies (Daten nicht gezeigt).

5.4.6.3 *Diskussion*

Bei dem Vergleich der getesteten Substanzen untereinander können die sehr schwachen bis gar nicht vorhandenen Induktionsfähigkeiten auf das CYP1A1-System nicht auf strukturelle Unterschiede zurückgeführt werden. Ein Grund für die nicht vorhandene Induktion nach 24 h kann in dem bereits stattgefundenen Metabolismus liegen. Zum anderen könnten Bindungen zum Ah-Rezeptor nicht möglich sein, so dass eine Induktion des CYP1A1 nicht stattfindet. Die zum Teil wegen ihrer inhibierenden Wirkung auf P450-Systeme bekannten Substanzen, wie z.B. Resveratrol ((El Attar und Virji, 1999), (Chun et al., 1999): CYP1A1; (Ciolino und Yeh, 1999): CYP1A1; (Chan und Delucchi, 2000): CYP3A4), scheinen nach den vorliegenden Ergebnissen keine Induktionsfähigkeit auf das CYP1A1 auszuüben.

Das östrogene Potential von Resveratrol wurde mehrfach in der Literatur beschrieben ((Gehm et al., 1997), (Ashby et al., 1999) und (Bowers et al., 2000)). Beresford und Mitarbeiter stellten ein mit dem Faktor 7 000 schwächeres östrogenes Potential im Vergleich zum EE fest (Beresford et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde ein mit dem Faktor 3 250 schwächere östrogenes Potential festgestellt ($EC_{50} = 130 \mu$ M). Dieser Unterschied könnte trotz der gleichen verwendeten Zelllinie in der unterschiedlichen Handhabung und Selektion des Hefeklons bestehen.

Für TCDQ veröffentlichte McKinney toxikologische Daten und stufte es mit einem geringeren Potential als 2,3,7,8-TCDD und höherem Potential als OCDD ein (McKinney et al., 1987). Die durch diese Arbeit vorliegenden Ergebnisse weisen TCDQ in der getesteten und nicht toxischen Konzentration von 7,8 μ M als sehr schwachen Induktor des CYP1A1-Systems aus. Die Bindung zum Ah-Rezeptor ist trotz der planaren Struktur nicht besonders ausgeprägt.

5.5 Untersuchungen zur CYP1A1-Induktion

Interaktionen zwischen den einzelnen Zytochrom-P450-Systemen haben eine entscheidende Bedeutung auf die Aktivität der einzelnen Systeme. Zum Ausdruck kommen die Interaktionen zum Beispiel bei der Wirkung von Arzneimitteln. Die meisten lipidlöslichen Arzneimittel werden nicht unverändert ausgeschieden, sondern zuerst mittels Phase I- und/oder Phase II-Reaktionen metabolisiert. Durch die in der Regel über Zytochrom P450-Enzyme vermittelten Phase I-Reaktionen ändert sich häufig die Aktivität der Substanz (quantitativ) oder sogar das pharmakologische Wirkprofil (qualitativ).

Für den Metabolismus von Arzneimitteln sind vor allem die Familien CYP1, CYP2 und CYP3 verantwortlich. Die CYP befinden sich hauptsächlich in der Darmwand und in der Leber, wo sie die Absorption und damit die Halbwertszeit entscheidend beeinflussen können. Quantitativ am wichtigsten ist CYP3A, auf das 70 % der gesamten CYP-Menge im Darm und 30 % in der Leber entfällt ((Shimada et al., 1994) und (Watkins et al., 1987)). Jedes zweite durch CYP metabolisierte Arzneimittel ist Substrat von CYP3A4 und jedes zwanzigste ein Substrat von CYP1A2 (Benet et al., 1996). Die Zytochrom-P450-Enzyme sind relativ substratspezifisch, was bedeutet, dass für die Prävention von Arzneimittel-Interaktionen Kenntnisse über die Identität der beteiligten Enzyme essentiell sind.

Die Induktion der Enzyme kann auf Transkriptionsebene (wie auch zum Beispiel bei den Dioxinen), Translations- und/oder Post-Translationsebene (zum Beispiel durch Alkohol beim CYP2E1) stattfinden. Bei Induktion auf Transkriptions- und Translationsebene erfolgen messbare Aktivitätsänderungen der CYP im allgemeinen erst nach wenigen Tagen bis maximal 2-3 Wochen. Nach Absetzen des Induktors können diese Effekte jedoch noch der langen Halbwertszeit von Proteinen entsprechend tagelang wirken. Die induzierenden Eigenschaften von Alkohol (CYP2E1) und Rauchen (CYP1A2) führen letztendlich dazu, dass doppelte und höhere Dosen notwendig sein können, um dieselben Wirkstoffkonzentrationen von gewünschten Substanzen im Körper aufrecht zu erhalten.

Die Wirkung von Substanzen ist aber nicht nur induzierend. Auch inhibierende Effekte beeinflussen CYP-Interaktionen, was zu einer abschwächenden Wirkung führen kann. Eine Inhibierung der Enzyme kann auf verschiedenen Ebenen ablaufen.

Die Wirkung von Emissionen und ökotoxikologisch relevanten Substanzen auf das CYP1A1 wurde in den Kapiteln 5.3 und 5.4 beschrieben. Die Induktionsfähigkeit dieser in der Umwelt existierenden Verbindungen kann zu unerwünschten Effekten im Körper führen, alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie Arzneimitteln. Neben den schon erläuterten Interaktionen im Zytochrom-P450-System sind auch Wirkungen auf das Immunsystem (z.B. auf Interleukin-6 und Gluthathion-S-Transferase) bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunrelevante Einzelsubstanzen und das Rauchen von Cannabis hinsichtlich ihrer Wirkung innerhalb des auf CYP1A1-Basis bestehenden EROD-Bioassays näher analysiert. Desweiteren wurden der Induktionsweg der analysierten Emissionen und das mögliche additive Verhalten von Einzelsubstanzen mit Umweltproben untersucht.

5.5.1 Induktionsweg der Emissionsproben

Klassische Induktoren des CYP1A1-Systems sind hydrophob, planar oder coplanar (s. auch Kapitel 4.7.1). Die Induktion des CYP1A1 beginnt in der Regel mit der Bildung eines Ah-Rezeptor-Induktor-Komplexes, gefolgt von der Initiierung der P450-Oxygenase-Transkription. Nach Transkription der P450-Oxygenase-m-RNA findet die Synthese des Enzyms statt und das neu synthetisierte Enzym oxigeniert zum Beispiel den Induktor.

Die meisten toxischen Wirkungen der Dioxine oder dioxinähnlichen Substanzen werden durch Aktivierung des AhR vermittelt. Die dabei zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Die Frage, wie die CYP1A1-Induktion reguliert wird und ob es noch andere Induktionsmöglichkeiten ohne Ah-Rezeptor-Komplex-Bildung gibt, beschäftigt seit einiger Zeit verschiedene Arbeitskreise ((Delescluse et al., 2000) und (Ma und Baldwin, 2002)). Um den Induktionsweg von Emissionen zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit mit zwei Zelllinien gearbeitet, die keinen Ah-Rezeptor aufweisen. Diese Varianten der Reuber Rattenhepatomzellen 5L (Moore und Weiss, 1982) mit den Klonen 5L-rBP-8 und 3-DNP wurden auf die gleiche Weise kultiviert und inkubiert wie die für den EROD-Bioassay verwendeten H4IIE-Zellen. Getestet wurden alle bereits beschriebenen Emissionsproben und 2,3,7,8-TCDD (s. Kapitel 5.3). Keine der Zellen zeigte durch die Emissionsproben eine CYP1A1-Enzymaktivität (Daten nicht gezeigt). Die Vitalität der Zellen wurde mit der BCA-Methode untersucht und zeigte keine toxischen

Effekte. Eine vom Ah-Rezeptor unabhängige Induktion des CYP1A1-Systems durch Emissionsproben kann daher ausgeschlossen werden.

5.5.2 *Additives Verhalten*

Zur Untersuchung von additivem Verhalten im linearen Aktivitätsbereich von Einzelsubstanzen und Umweltproben wurde 2,3,7,8-TCDD als Einzelsubstanz verwendet. Als Umweltprobe diente die schon beschriebene Flugasche einer Abfallverwertungsanlage (FAMS).

Der Beginn des linearen Bereiches der sigmoiden Funktion lag bei 3,1 pM 2,3,7,8-TCDD. Zu diesen effektiven 0,1 pg pro Loch wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen der FAMS gegeben. Die FAMS-Konzentrationen wurden so gewählt, dass eine Addition von 2,3,7,8-TCDD und FAMS theoretisch im linearen Bereich liegen musste. Probe FA/16 befand sich im EC₅₀-Bereich und Probe FA/32, wie 3,1 pM 2,3,7,8-TCDD, am Beginn des linearen Abschnitts (25 % Deethylase-Aktivität). Die Berechnung des additiven Effektes erfolgte aufgrunddessen linear. In Abbildung 5.19 sind die Ergebnisse dargestellt.

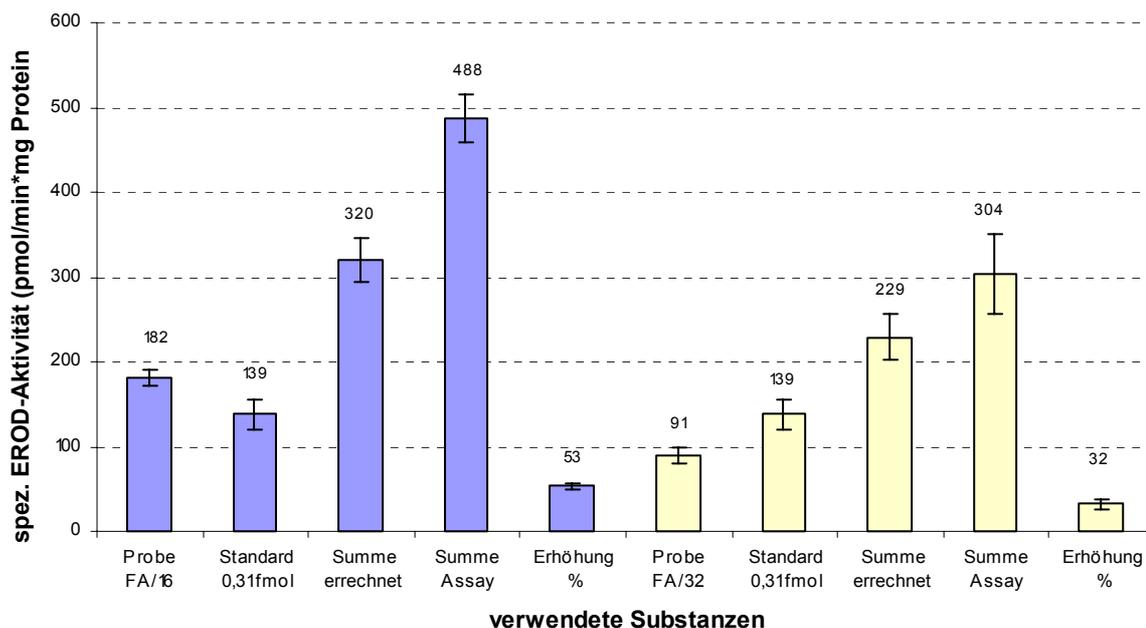


Abb. 5.19: Standardaddition der Flugasche FAMS und 2,3,7,8-TCDD (3,1 pM, n = 4)

Die gemessenen Werte der EROD-Aktivität sind bei Probe FA/16 um 49-57 % gegenüber den theoretischen Werten erhöht. Bei einer Inkubation der H4IIE-Zellen mit einer halb konzentrierten FAMS (FA/32) und 3,1 pM 2,3,7,8-TCDD findet eine tatsächliche Aktivitätserhöhung zwischen 27-37 % statt. Die hier gezeigten Ergebnisse zum additiven Verhalten von Einzelsubstanzen mit Umweltproben geben einen ersten Hinweis auf mögliche synergistische Effekte durch Umweltproben.

5.5.3 Inhibierung von CYP1A1-Induktionen

Die Wirkung von Emissionen auf den menschlichen Körper und die Umwelt können durch synergistisches, additives, inhibierendes oder durch das induzierende Potential große Auswirkungen haben. Um den Wirkungsmechanismus von Dioxinen oder dioxinähnlichen Verbindungen besser zu verstehen und gleichzeitig Hinweise auf mögliche Präventionen zu erhalten, wurden Inhibitionsversuche mit diversen Einzelsubstanzen für das CYP1A1-System durchgeführt.

Der klassische CYP1A1-Induktionsweg beginnt mit dem Ah-Rezeptor-Ligand-Komplex. Die Blockierung des Ah-Rezeptors bzw. die Ausschaltung konnte durch den Einsatz der Ah-Rezeptor defizienten 5L-Zellen erreicht und damit die Induktion der Emissionen über den Ah-Rezeptor geklärt werden (s. auch Abb. 4.9). Eine andere Möglichkeit der AhR-Blockierung ist zur Zeit nicht bekannt, denn der

potenteste Agonist des Rezeptors ist das 2,3,7,8-TCDD. Alle anderen bekannten Induktoren weisen schwächere Bindungsaffinitäten auf.

Die nachfolgend aufgeführten Inhibierungsversuche der CYP1A1-Induktion fanden mit 2,3,7,8-TCDD (6,2 pM, entsprechen 50 % Induktion) und unterschiedlichen Konzentrationen der Einzelsubstanzen statt. Die verwendeten Konzentrationen waren zum einen Teil löslichkeitsbedingt, zum anderen Teil den natürlichen Bedingungen entsprechend.

5.5.3.1 *Tocopherole*

Eine in der letzten Zeit immer häufiger in der Diskussion stehende Substanz im Bereich der Nahrungsergänzungsmittel ist das Vitamin E. Vitamin E ist ein Sammelbegriff für eine Reihe von Substanzen, den Tocopherolen. Das für den Menschen wichtigste und in der Natur vorkommende ist das RRR- α -Tocopherol, auch D- α -Tocopherol genannt. Eigenschaften des Vitamin E sind folgende: fettlöslich, wirkt antioxidativ, antiproliferativ und antiinflammatorisch. Als wichtigstes Antioxidanz schützt es vor allen Dingen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden der Zellmembranen vor Oxidation durch freie Sauerstoffradikale. Es hemmt die Entstehung von oxidiertem LDL im Plasma, das als wichtiger Risikofaktor für die Artherosklerose gilt. Synthetisch hergestelltes Vitamin E enthält 8 Stereoisomere, von denen nur das RRR- α -Tocopherol die beschriebenen Wirkungen erzielt. Alle anderen Stereoisomere sind stark vermindert oder gar nicht wirksam. Als biologischer Standard für die Vitamin-E-Bestimmung wird allerdings nicht das RRR- α -Tocopherol, sondern die razemische Substanz, das all-rac- α -Tocopherol (entspricht dem DL- α -Tocopherol), verwendet. Aus diesem Grund wurde in den beschriebenen Experimenten das razemische Gemisch verwendet. Zusätzlich fand ein Vergleich mit den Effekten durch das DL- α -Vitamin E-Acetat statt.

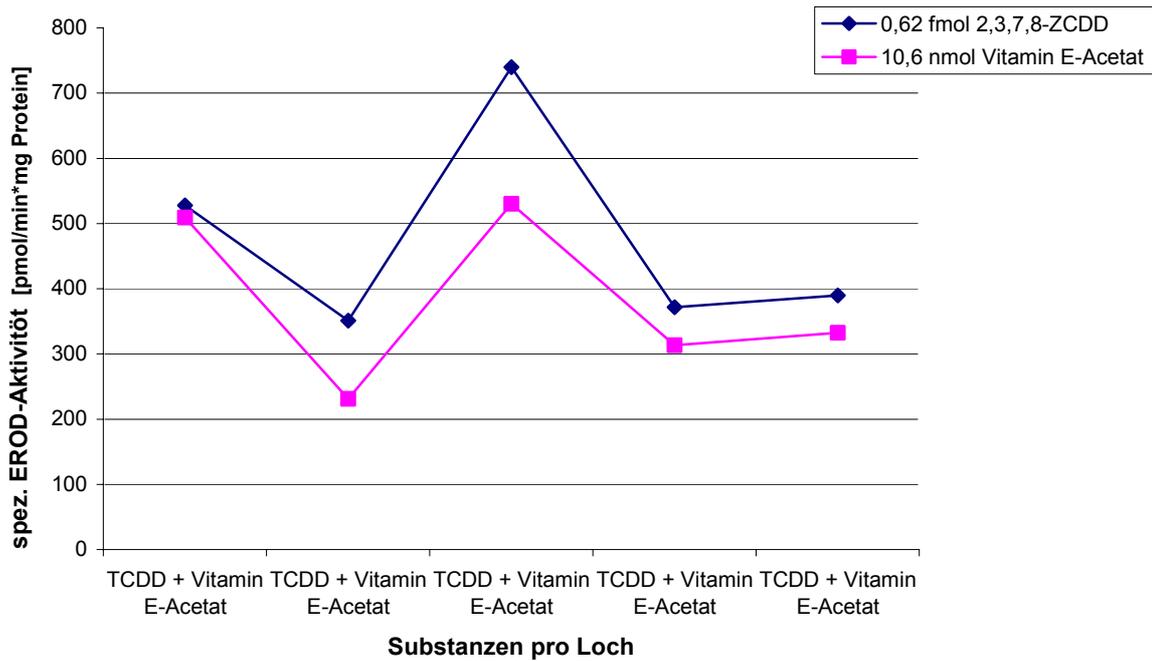


Abb. 5.21: Inhibierende Wirkung des DL- α -Tocopherol-Acetat auf 2,3,7,8-TCDD induziertes CYP1A1

Beim DL- α -Tocopherol (58 μ M, Inhibierungsmaximum) konnten schwache Inhibitionseffekte bis zu 10 % festgestellt werden. Aufgrund der auch in Kapitel 3.3.1 und 5.1 bereits erwähnten Schwankungen bis zu 20 % muss eine inhibierende Wirkung des DL- α -Tocopherols jedoch ausgeschlossen werden. Ausschliesslich DL- α -Tocopherol-Acetat könnte einen sehr schwachen Einfluss auf die CYP1A1-Induktion ausüben. Die Erklärung für das feststellbare unterschiedliche Verhalten kann in den lipophilen Eigenschaften der Substanzen liegen.

Lipophile Verbindungen gelangen durch passive Diffusion in die Hepatomzelle. Das DL- α -Tocopherol wird aufgrund seiner langen Seitenkette in die Zellmembran eingebaut und verhindert in den Membranlipiden die Peroxidbildung höher ungesättigter Fettsäuren. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten erhöhten Inhibitionseffekt durch DL- α -Tocopherol-Acetat ist folgende: Die Einführung einer Acetat-Gruppe am DL- α -Tocopherol führt zur Abschwächung des lipophilen Charakters. Die Löslichkeit in wässrigen Medien erhöht sich, die Oxidationsempfindlichkeit wird reduziert und die Funktion als lipophiler Radikalfänger ist im Vergleich zum DL- α -Tocopherol-Acetat erhöht. Beide Substanzen verhindern mit unterschiedlicher Stärke die Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Radikale, die bei der Aktivierung des P450-Systems durch Schadstoffe (hier

2,3,7,8-TCDD bzw. Emissionsproben) entstehen. DL- α -Tocopherol und das -Acetat senken dadurch die Aktivität des P450-Systems und letztendlich die Deethylase-Aktivität herab.

Ein scheinbares Herabsetzen der Deethylase-Aktivität durch Absorption der verwendeten Wellenlänge (Anregung= 535 nm, Emission= 590 nm) ist für DL- α -Tocopherol und das -Acetat auszuschließen. Tirmenstein und Mitarbeiter (Tirmenstein et al., 1998) untersuchten diverse Anregungs- und Emissions-Wellenlängen, wobei der Wellenlängenbereich zwischen 210-300 nm der maximalen Sensitivität entsprach.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Einfluss des DL- α -Tocopherol-Acetats auf Rattenleberzellen gibt Hinweise, CYP1A1-Induktionen minimieren zu können. Die Hauptresorptionsorte von Fremdstoffen sind der Magen-Darm-Trakt, die Lunge und die Haut. Wegen der sehr großen Oberfläche ist der Dünndarm zumeist der Hauptresorptionsort. Dort findet z.B. über spezielle Carriersysteme die Aufnahme wichtiger Nahrungsbestandteile wie Vitamine und bestimmte Metallionen statt (Mutschler, 2001). Die absorbierte Menge im Gastrointestinaltrakt von DL- α -Tocopherol aus der Nahrung liegt bei 20-60 % (McEvoy, 1993). Nach Aufnahme der Vitamine in den Dünndarm erfolgt die Abgabe in das Lymphsystem und die Aufnahme durch die Leber. Bei einer geschätzten Aufnahme von DL- α -Tocopherol bzw. DL- α -Tocopherol-Acetat zwischen 20-60 % in die Leber, lässt sich zum Erreichen des beobachteten Inhibierungseffekt eine orale Menge im zweistelligen μg -Bereich/Tag (bezogen auf das Acetat, $M = 472,8 \text{ g/mol}$) berechnen. Unter Berücksichtigung, dass die Resorption von Nähr- und Fremdstoffe individuen- und ernährungsabhängig ist und es sich bei dem verwendeten Testsystem um In-vitro-Zellstudien an Rattenleberzellen handelt, ist die errechnete orale Menge bei der direkten Übertragung auf den Menschen kritisch zu betrachten. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung gibt den täglichen Bedarf von RRR- α -Tocopherol mit ungefähr 15 mg an. Er erhöht sich bei vermehrter Zufuhr ungesättigter Fettsäuren sowie bei stärkerer körperlicher oder geistiger Belastung. Orale Vitamin E-Gaben bis 100 mg/Tag gelten noch als physiologisch (Mutschler, 2001). Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte scheinen durch die täglichen DL- α -Tocopherol(-Acetat)-Aufnahme aus Lebensmitteln, die bei ungefähr 12 mg liegt, gewährleistet zu sein (DGE, 2000).

5.5.3.2 Flavonoide

Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe werden im allgemeinen in die zwei Hauptgruppen Flavonoide und Phenolcarbonsäuren unterteilt. Die größte Bedeutung kommt der Gruppe der Flavonoide zu. Die Flavonoide leiten sich vom Flavan, dem 2-Phenylbenzodihydropyran, ab. Die wichtigsten Untergruppen sind die farblosen Catechine, die rot bis blau gefärbten Anthocyanidine, die hellgelben Flavonole und Flavone sowie die farblosen Proanthocyanidine. In folgender Abbildung 5.22 ist das Grundgerüst der wichtigsten Flavone und Flavonole dargestellt.

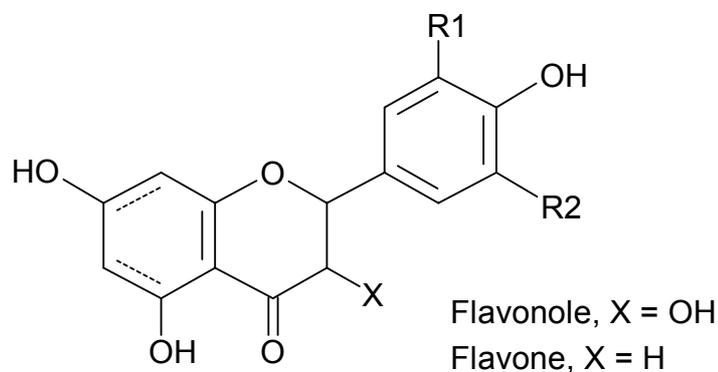


Abb. 5.22: Grundgerüst der Flavone und Flavonole. Eine auch in Äpfeln enthaltene und bekannte Verbindung ist das Flavonol Quercetin (R1= OH, R2= H).

Flavonoide bestehen grundsätzlich aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen und einem heterozyklischen Ring. Aufgrund von strukturellen Unterschieden am C-Ring können die Flavonoide in sechs Gruppen eingeteilt werden (Tab. 5.16).

Tab. 5.16: Verbindungsklassen der Flavonoide (Watzl und Rechkemmer, 2001)

Verbindung	Beispiel	Quelle
Flavonole	Quercetin	Zwiebeln
	Kämpferol	Endivie
Flavone	Flavon	Sellerie
	Luteolin	Paprika
Flavanone	Naringenin	Grapefruit
Flavanole	Catechin	Äpfel, Rotwein
Anthocyane	Cyanidin	Kirschen
Isoflavonoide	Genistein	Sojabohnen

Die antioxidative Wirkung vieler Pflanzenphenole ist höher als die der antioxidativen Substanzen Vitamin E und Vitamin C. Berechnungen der relativen totalen antioxidativen Aktivität von Flavonoiden und antioxidativen Vitaminen sowie zugehörige Lebensmittel wurden u.a. von C. Rice-Evans bestimmt (Rice-Evans et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden Inhibierungsversuche mit Flavon (2-Phenyl-4H-1-benzopyran-4-on), 3-Hydroxyflavon (4H-1-Benzopyran-4-on) und Apfel- und Tomatenextrakt durchgeführt. Für Flavon ist in Abbildung 5.23 die Bestimmung der effektivsten Inhibierungskonzentration dargestellt. Der EC_{50} -Wert für die Inhibierung von 6,2 pM 2,3,7,8-TCDD liegt bei 700 pM. Die maximal wirksame Konzentration liegt bei 146 pmol/Loch mit Inhibierungseffekten zwischen 75-96 %. Mit Flavon (200 pM) konnten Inhibierungseffekte um 15 % festgestellt werden. Die Inhibierung der Emissions-Induktionen lag 20 % unterhalb der Inhibierung der 2,3,7,8-TCDD-Induktionen. Ein scheinbares Herabsetzen der Deethylase-Aktivität durch Absorption der verwendeten Wellenlänge (Anregung= 535 nm, Emission= 590 nm) ist für Flavon auszuschließen. Mira und Mitarbeiter (Mira et al., 2002) zeigten in ihren Untersuchungen zur Antioxiationsfähigkeit von Flavonoiden bei 250 nm und 360 nm die beiden Absorptionsmaxima für das verwendete Flavon. Bei einer Anregungs-Wellenlänge von 535 nm zeigt das entsprechende Spektrum $E_{\lambda} \approx 0$.

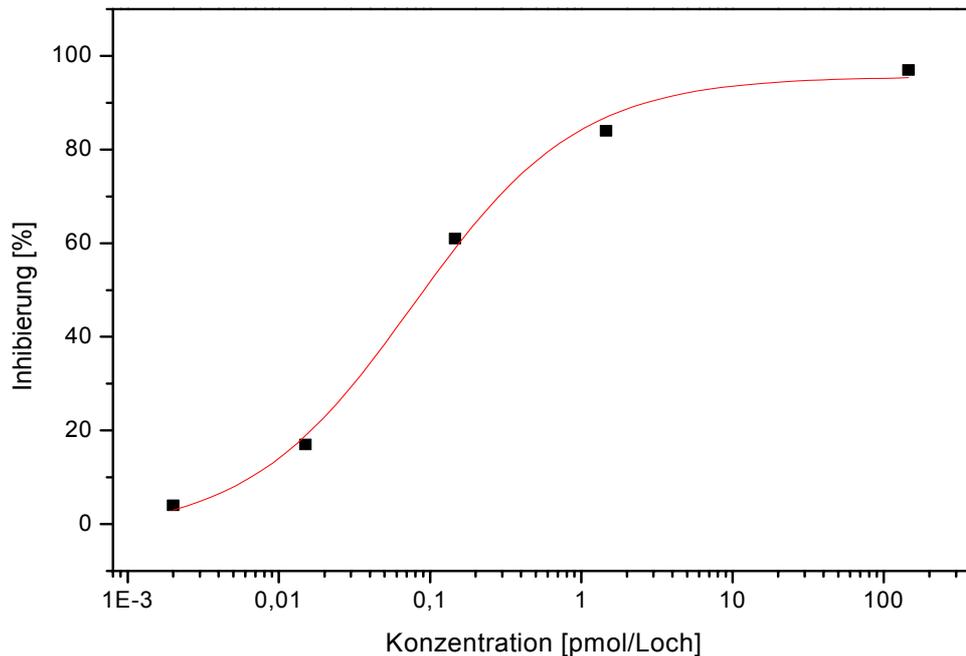


Abb. 5.23: Darstellung der verwendeten Flavon-Konzentrationen ($c = 0,002 - 146 \text{ pmol/Loch}$) zur Inhibierung der EROD-Induktion durch $0,62 \text{ fmol/Loch}$ 2,3,7,8-TCDD

Die maximale Inhibierung mit 3-Hydroxyflavon lag bei 42 % bei einer Konzentration von $31 \mu\text{mol}$ pro Loch. Die eingesetzten Mengen an Flavon und 3-Hydroxyflavon betragen $324 \mu\text{g}$ bzw. 7 mg im Rattenzellmedium pro Loch. Patientenstudien mit ^{14}C -markiertem Quercetin, einem Flavonol, zeigten 36-53 % Absorption bei einer oralen Einnahme von 100 mg (Watzl und Rechkemmer, 2001). Bezogen auf den in dieser Arbeit vorgestellten CYP1A1-Inhibierungseffekt und der Annahme, dass sich Flavon und 3-Hydroxyflavon entsprechend dem Quercetin verhalten, könnte eine orale Gabe von $611-900 \mu\text{g}$ bzw. $13-19 \text{ mg}$ die beschriebene Wirkung hervorrufen. Bei einer täglichen Flavonolaufnahme durch Nahrungsmittel von 12 mg , ermittelt in einer Verzehrstudie, könnte der beobachtete Effekt in den menschlichen Leberzellen ohne zusätzliche Gaben stattfinden (Linseisen et al., 1997).

Apfel- und Tomatenextrakte wurden mit 5 g/ml präpariert (Extraktionsmittel Essigsäureester/Aceton, $1/2 \text{ v/v}$). Beim Apfelextrakt ($0,1 \text{ g/Loch}$) konnte eine Inhibierung der 2,3,7,8-TCDD-Induktion ($6,2 \text{ pM}$) mit ungefähr 25 % festgestellt werden. Das Tomatenextrakt ($0,1 \text{ g/Loch}$) zeigte Inhibierungseffekte um 15 %. Flavonoide befinden sich überwiegend in den Randschichten der Pflanzen sowie in

den äußeren Blättern. Bei der Apfelsaftherstellung verbleiben daher über 80 % der Flavonoide in den Pressrückständen und nur 10 % gelangen in den Saft (Watzl und Rechkemmer, 2001). Tomaten, Äpfel, Trauben und Bohnen sind Pflanzen mit mittleren Flavonoidgehalt, d.h. < 50 mg/kg, > 10 mg/kg (Bitsch et al., 1996 und 2002). Die beschriebenen CYP1A1-Inhibierungseffekte könnten demnach mit 4-20 kg Äpfel und Tomaten erzielt werden. Dies unter der Voraussetzung das ungefähr 50 % der Flavonoide aus den Äpfeln bzw. Tomaten resorbiert werden können und die angewandten In-vitro-Rattenleberzellstudien auf die Physiologie des Menschen übertragbar sind. In Deutschland betragen in einem bayrischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrstudie die Aufnahme von Gesamtflavonoide 54 mg/Tag (Linseisen et al., 1997). Zur Erzielung des beobachteten CYP1A1-Inhibierungseffekt bedeutet das eine Steigerung der Flavonoidaufnahme um den Faktor 4.

5.5.3.3 *Cannabinoide*

Neben der psychoaktiven Wirkung von Cannabis sind auch schmerzlindernde Effekte bekannt. Schmerzprozesse und Entzündungsprozesse weisen erhöhte Konzentrationen an IL-6 auf. Dieser Entzündungsfaktor steht wiederum über die alkalische Phosphatase in Verbindung mit dem CYP1A1-System. Studien der Arbeitsgruppe Wiebel aus dem Institut für Toxikologie am GSF-Forschungszentrum konnten die Verbindung IL-6 – alkalische Phosphatase – CYP1A1 aufzeigen (GSF-Jahresbericht, 2001). Dieser Hintergrund führte u.a. zu Untersuchungen von Cannabisrauch und den in Cannabis enthaltenen Verbindungen Δ^9 -THC, CBD und CBN. Neben den Studien zur östrogenähnlichen Wirkung dieser Substanzen (s. Kapitel 5.4.4.2) wurde auch die Auswirkung auf das CYP1A1-System untersucht. Die geringe CYP1A1-Induktionsfähigkeit vom Cannabisrauch-Hauptstrom wurde in Kapitel 5.4.4.1 beschrieben. Die Inhibierungsfähigkeit der im Cannabis-Hauptstrom vorhandenen Substanzen ist konzentrationsabhängig. Inhibierungseffekte wurden in dem Konzentrationsbereich von 0,64 ng - 6,4 µg pro Loch festgestellt. Die Inhibierungseffekte lagen zwischen 18-99 %. Eine Induktionsminderung von 6,2 pM 2,3,7,8-TCDD um 50 % fand durch 2,58 mg Cannabisrauch-Hauptstrom/ml DMSO bzw. 0,64 µg/Loch statt (n = 5).

5.5.4 Mögliche Inhibierungsebenen

Um der Beantwortung der Frage näher zu kommen, auf welcher Ebene innerhalb der Zelle die Inhibitoren die Induktionseffekte herabsetzen, wurden Untersuchungen zum CYP1A1 m-RNA-Gehalt durchgeführt. Wie auch in Abb. 5.18 zu sehen, ist die m-RNA des CYP1A1 ein „Vorläufer“ des CYP1A1-Systems. Die Menge an m-RNA bestimmt in der Regel die Menge der CYP1A1-Deethylase-Aktivität.

Zur m-RNA-Konzentrationsbestimmung wurde mit den folgenden zwei Methoden gearbeitet: real time PCR (*polymerase chain reaction*) und Luciferase-Bioassay. Die bei dem Luciferase-Bioassay gemessene Luciferase-Aktivität ist proportional zur Induktion des CYP1A1-Systems und damit der Konzentration von dioxinähnlichen Substanzen. Nach Anlagerung des Ligand-AhR-Arnt-Komplexes an die hoch konservierten DRE (*dioxin responsive elements*) wird eine Luciferase exprimiert. Diese Luciferase setzt in einer quantitativen und sehr schnellen Lumineszenz-Reaktion Luciferin zu Oxyluciferin um (s. Abb. 3.3, Methoden und Materialien).

Die real time PCR- oder auch TaqMan[®]-PCR beruht auf dem bekannten PCR-Prinzip und ist erweitert durch spezielle, einen Fluoreszenzfarbstoff enthaltende Sonden und eine Polymerase, die die Detektion von gesuchten Gensequenzen ermöglichen. Durch den Vergleich von CYP1A1-mRNA und β -Actin sind Aussagen über den induzierenden, inhibierenden und toxischen Einfluss der Substanzen möglich.

Ein Vergleich von spezifischer EROD-Aktivität und spezifischer Luciferase-Aktivität ist in Abb. 5.24 dargestellt. Der Inhibierungseffekt durch Flavon ist, wie schon in Kapitel 5.5.3.1 beschrieben, wesentlich stärker als durch Vitamin E-Acetat. Der durch beide Methoden für Vitamin E-Acetat bestimmte prozentuale Inhibierungseffekt ist gleich und kann seine Ursache aufgrund der nicht im Emissionsbereich liegenden Extinktionskoeffizienten nur im komplexen Zellsystem haben (Vitamin-E^{Gemisch} abhängig vom = 210 - 300 nm).

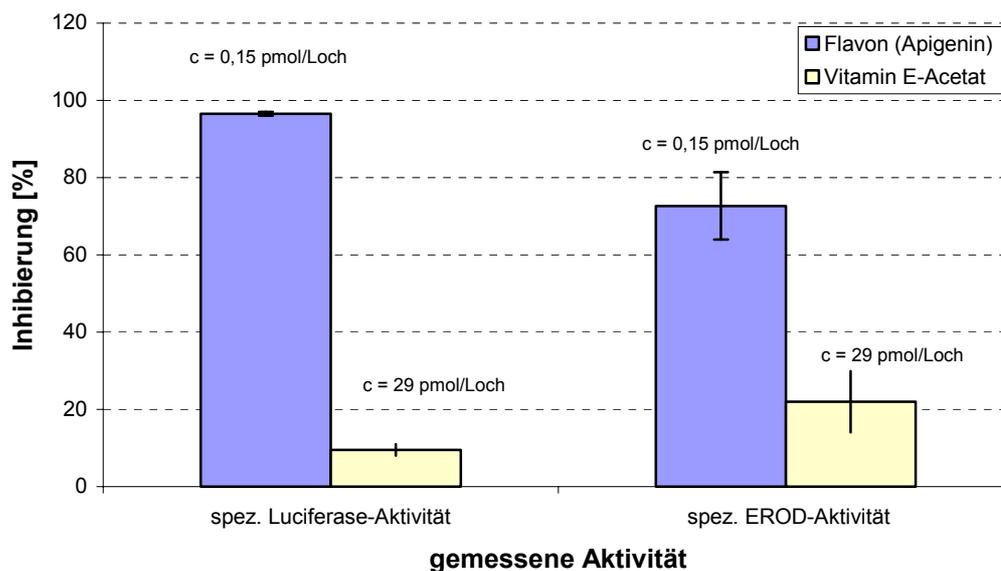


Abb. 5.24: Vergleich von spezifischen Enzym-Aktivitäten (EROD- und Luciferase-Bioassay). Die Inhibierungsversuche von 2,3,7,8-TCDD-Induktion (0,62 fmol/Loch) fanden ohne Vorinkubation statt. Die Luciferase-Aktivität wurde aus $n = 2$ für beide Inhibitoren, die spez. EROD-Aktivität aus $n = 3$ für Flavon und $n = 5$ für Vitamin E-Acetat bestimmt.

Bei dem Flavon-Inhibierungseffekt ist die Auswirkung mit 15 % höher im Luciferase-Assay, d.h. auf m-RNA-Ebene. Effekte auf Transkriptionsebene sind auch durch die TaqMan[®]-Methode festgestellt worden. In der folgenden Abb. 5.25 ist die relative Menge an CYP1A1 m-RNA erhalten durch 2,3,7,8-Induktion und den Inhibitoren Flavon und Vitamin E-Acetat dargestellt. Die m-RNA-Menge durch den Vitamin E-Acetat Inhibierungsprozesses ist gleich der ausschließlichen Induktion durch 2,3,7,8-TCDD (0,62 fmol/Loch). Bei der Inhibierung des Induktionssignals durch Flavon (1,5 pmol/Loch) steigt die m-RNA-Menge um den Faktor 20 an.

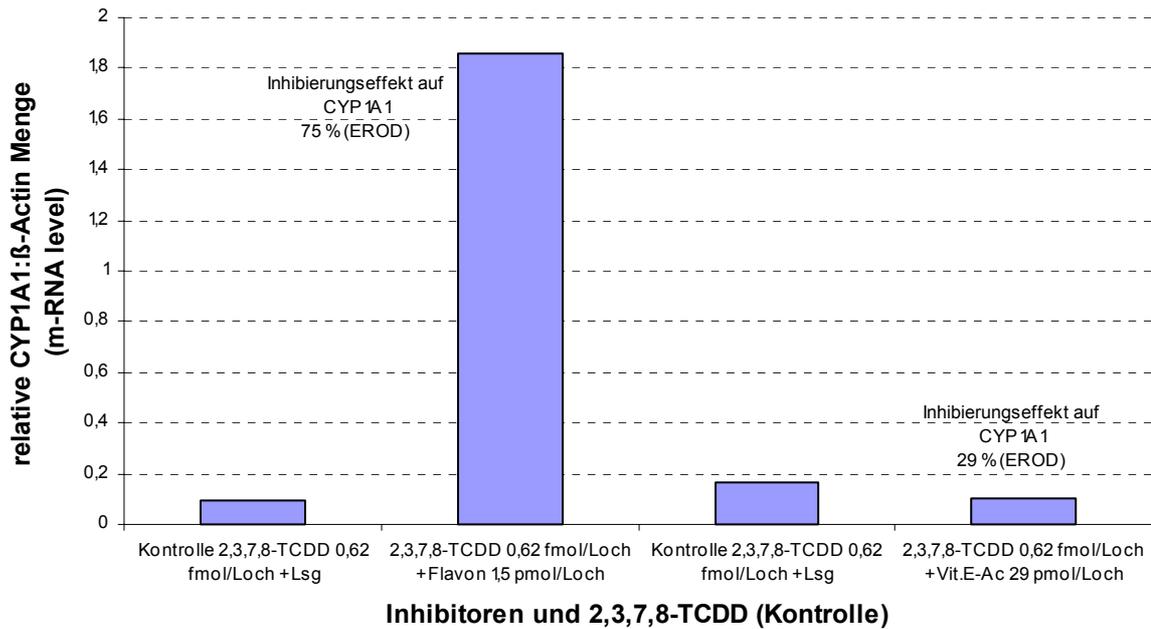


Abb. 5.25: Flavon-Probe: Darstellung des relativen CYP1A1 m-RNA-Levels (CYP1A1 m-RNA:β-Actin), gemessen mit der TaqMan[®]-Methode. Die Inhibierungsversuche fanden ohne Vorinkubation statt. Die Inhibierungseffekte auf das CYP1A1-System wurden durch den EROD-Bioassay bestimmt und sind neben den entsprechenden relativen m-RNA-Levels aufgeführt.

Die Auswirkung von Cannabisrauch auf die CYP1A1-Induktion durch 2,3,7,8-TCDD zeigt sich auch auf m-RNA-Ebene (Abb. 5.26). Auffällig ist hierbei die konzentrationsabhängige Steigerung der relativen Menge an CYP1A1 m-RNA im Vergleich zum Inhibierungseffekt. Eine Konzentrationserhöhung um den Faktor zehn führt zu einer 15%igen Steigerung des Inhibierungseffektes und der dreifachen relativen Menge an CYP1A1 m-RNA.

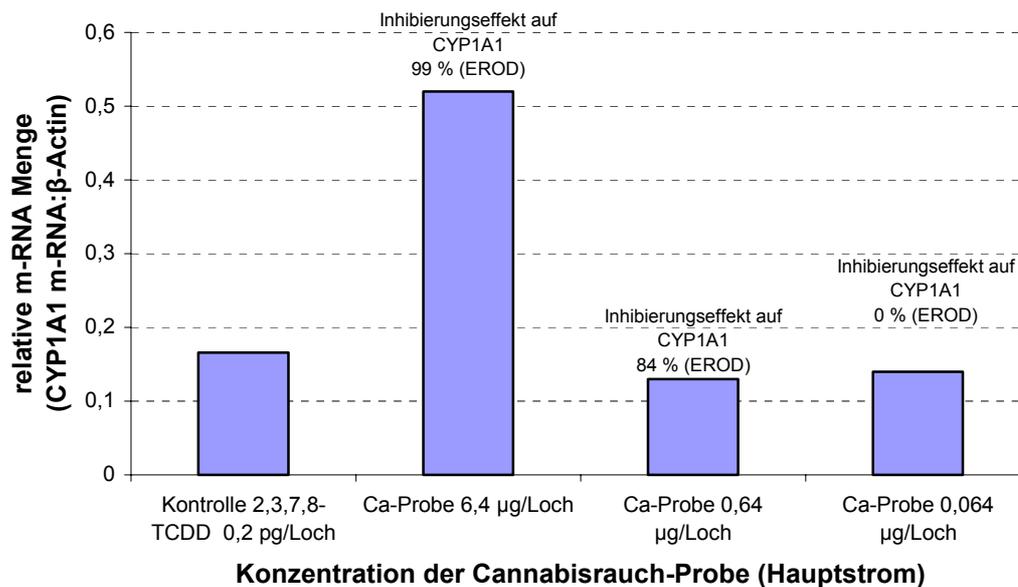


Abb. 5.26: Cannabisrauch-Probe: Darstellung des relativen CYP1A1 m-RNA-Levels (CYP1A1 m-RNA:β-Actin), gemessen mit der TaqMan®-Methode. Die Inhibierungsversuche fanden ohne Vorinkubation statt. Die Inhibierungseffekte auf das CYP1A1-System wurden durch den EROD-Bioassay bestimmt und sind neben den entsprechenden relativen m-RNA-Levels aufgeführt.

5.5.5 Diskussion

Die Beobachtung der CYP1A1-Inhibierung und die gleichzeitige Erhöhung des m-RNA-Gehaltes durch die Cannabis-Hauptstrom-Probe und durch Flavon könnte folgende Ursachen haben. Zum einen scheint für die Erhöhung des m-RNA-Gehaltes eine Interaktion vom Ah-Rezeptor mit Δ^9 -THC bzw. Flavon verantwortlich zu sein. Dafür sprechen die beobachtete, wenn auch nicht bestimmbare Induktion durch Δ^9 -THC und der Cannabis-Hauptstrom-Probe. Unterstrichen wird diese Erklärung durch radioaktivmarkierte Bindungsstudien zwischen Curmin, einer polyphenolischen Verbindung und dem Ah-Rezeptor (Ciolino und Yeh, 1998), die die Bindungsfähigkeit des Curmins mit dem Ah-Rezeptor bei gleichzeitiger Inhibierung des CYP1A1-Systems zeigen.

Die Inhibierung des CYP1A1-Systems durch Vitamin E-Acetat, Flavon und die Cannabis-Hauptstrom-Probe ist durch verschiedene Wirkmechanismen denkbar. Zum einen können Reaktionen vom Substrat bzw. dem Metaboliten mit dem aktiven Zentrum des P450-Enzyms auftreten. Die Nähe des Substrates bzw. der Metaboliten ermöglichen eine Interaktion, wie sie z.B. vom Ethenoxid bekannt ist. Ethenoxid

entsteht aus Ethen und greift mit dem elektrophilen C-Atom die N-Atome der Hämgruppen an. Eine andere Möglichkeit der Inhibierung durch Vitamin E wird mit der Funktion als Radikalfänger ermöglicht. Vitamin E bzw. die Chromanolgruppe ist in der Lage, mit Peroxyl- und Alkoxyradikalen (vor allem in peroxidierenden Membranphospholipiden) zu reagieren und somit Lipidoxidationsreaktionen zu unterbinden (Marquardt und Schäfer, 1994).

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Eigenschaften sind für Flavone Effekte auf die Untereinheit Reduktase möglich, denn diese können die FMN-Rolle in der Atmungskette „übernehmen“. Durch das „Abfangen“ von O₂-Radikalen in der Atmungskette wird scheinbar auch die P450-Enzymaktivität herabgesetzt. Welche und ob diese vorgestellten Inhibierungsmöglichkeiten existieren, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erklärbar. Erkennbar ist jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse und den aktuellen Stand der Literatur, dass der komplexe Vorgang der P450-Induktion auch in der Inhibierung ein vielschichtiges und stark vernetztes System aufweist. Unterstrichen wird dies auch bei dem Vergleich von EROD- und Luciferase-Bioassay. Der Inhibierungseffekt durch Flavon ist mit dem Luciferase-Bioassay um 15 % höher bestimmt worden. Eine Ursache könnte in der Konstruktion des Expressionsvektors liegen, der die vier DREs in einem 480 bp Fragment enthält. Durch die Fragmentierung des Promotors können für die Regulation des P450-Systems wichtige Informationen verloren gehen, wie z.B. die in der Nachbarschaft zu den DREs befindlichen AREs (*antioxidant responsive elements*).

6 Zusammenfassung

Die Erfassung von polyhalogenierten aromatischen Verbindungen, wie z.B. polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und Biphenyle (PCB), wird seit dem Seveso-Unglück und dem neuerlichen Futtermittelskandal in Belgien mit besonderem Interesse auch seitens der Öffentlichkeit verfolgt. Neben der instrumentellen Analytik, die durch HRGC/HRMS diverse Verbindungen detektieren kann, erlangte in den letzten Jahren die Erfassung von Xenobiotika mittels bioanalytischer Testsysteme eine immer größere Bedeutung. Bioanalytische Testsysteme ermöglichen, die biologische Wirksamkeit von Xenobiotika in ihrer Gesamtheit zu erfassen, d.h. additive, synergistische und auch inhibierende Effekte werden erfasst. Durch die Wahl bestimmter Endpunkte kann eine Umweltprobe hinsichtlich diverser Auswirkungen auf den Organismus charakterisiert werden. Die Verknüpfung der Endpunkte und die gegenseitigen Auswirkungen sind dabei von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden Emissionen und Materialien hinsichtlich ökotoxikologischer Auswirkungen untersucht. Als Endpunkte dienten hierbei Enzymaktivitätssteigerungen, die zum einen östrogenähnliche (Hefe-Östrogen-Bioassay) und zum anderen dioxinähnliche und damit auch persistente Verbindungen (EROD-Bioassay) anzeigen. Erstmals wurden Emissionen einer Abfallverwertungsanlage (MVA) in Deutschland hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das CYP1A1-System erfasst und mit den Daten der instrumentellen Analytik verglichen. Nach erfolgreicher Abtrennung von Störkomponenten konnte in sieben MVA-Emissionen kein Ausstoß an Dioxinen bzw. dioxinähnlichen Molekülen oberhalb des Grenzwertes von $0,1 \text{ ng/m}^3$ festgestellt werden (s. 5.2). Zwei Emissionsproben lagen oberhalb des Grenzwertes, deren Ursache provozierte CO-Spitzen waren. Östrogenartige Effekte wurde in keiner der analysierten Proben festgestellt.

Die Probenahme an industriellen Anlagen in Griechenland und die anschließende Analyse fand im Rahmen eines EU-Projektes statt und ermöglichte die erstmalige Erfassung von polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen, Dibenzofuranen und ähnlichen Molekülen aus diesem südlichen EU-Land (s. 5.3). Die landestypischen Anlagen (Krankenhausabfallverbrennungsanlage, sekundäre Eisenverwertungsanlage und Olivenölproduktionsanlage) zeigten ihrem Verbrennungs- bzw. Erhitzungsmaterial und ihrer Betriebsart entsprechend unterschiedliche Ausstöße. Die aus zweiter Pressung Olivenöl gewinnende Anlage wies eine in der EU geltende Überschreitung des Grenzwertes für Emissionen von $0,1 \text{ ng/m}^3$ mit der instrumentellen Analytik nicht

auf. Die Analyse mit dem EROD-Bioassay zeigte jedoch einen I-TEQ von $0,5 \text{ ng/m}^3$, was einem R_{ba} -Faktor von 35 entsprach und damit durch die instrumentelle Analytik nicht erfassbare Verbindungen aufzeigte. Die Emissionen der sekundären Eisenverwertungsanlage zeigten einen für diesen Industriezweig üblichen jährlichen PCDD/F-Gesamtausstoß von 2 – 5 g. Trotz der in dieser Arbeit festgestellten Grenzwertüberschreitung bedeutet dies ein relativ erfolgreiches Einsetzen von den vorhandenen Sekundärmaßnahmen. Einen besonders hohen Ausstoß zeigte die Krankenhausabfallverbrennungsanlage (KVA). Der unter Einbeziehung der Gesamtanzahl an Anlagen dieses Typs jährliche Ausstoß an PCDD/F kann auf 155 g I-TEQ berechnet werden. Im Vergleich dazu lag der PCDD/F-Gesamtausstoß für Deutschland im Jahr 1995 bei ca. 330 g I-TEQ (UNEP, 1999) und wurde für 1997 auf 70 g I-TEQ berechnet (UBA, 1997). Östrogenähnliche Wirkungen zeigte keine der analysierten Proben.

Sämtliche Emissionen wurden hinsichtlich ihres CYP1A1-Induzierungsweges untersucht. Ah-Rezeptor defiziente Rattenhepatomzellen zeigten, dass die Induktion ausschließlich über Bindung mit dem zytosolischen Rezeptor erfolgt (s. 5.5.1).

Der Vergleich zwischen EROD-TEQ und TEQ-Werten ermittelt mit der instrumentellen Analytik weist grundsätzlich höhere Bioassay-Werte auf. Die R_{ba} -Faktoren liegen zwischen 1,4 und 35. Auffällige Unterschiede in der TEQ-Wert Berechnung durch Verwendung der TE-Faktoren nach WHO oder NATO/CCMS waren nicht bzw. kaum festzustellen (Kapitel 5.2.1 und 5.2.2).

Die Analyse ökologisch relevanter Materialien und Einzelsubstanzen (Elektronik- und Plastikschrutt, Flammschutzmittel enthaltende Kunststoffproben, Pestizide, Cannabis-Rauch, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, phenolische Verbindungen, Biphenyl und TCDQ), die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, zeigte neben der Erfassung des jeweiligen Endpunktes auch die Screening-Möglichkeit durch den EROD-Bioassay. Die Screening-Möglichkeit besteht in der schnellen Erfassung von Dioxinen und dioxinähnlichen Molekülen durch Arbeiten auf 96-Loch-Platten und der Durchführung von nur einem Cleanup-Schritt. Erst nach positivem Ergebnis durch den EROD-Bioassay sind weitere kostenintensive Cleanup-Schritte zur Identifizierung der einzelnen Verbindungen mittels instrumenteller Analytik nötig. Die Analyse von Pyrolyse- und Kondensationsproben aus gemischten Elektronik- und Plastikschrutt zeigte bei einer Probe ein besonders auffälliges CYP1A1-Induktionsverhalten. Aufgrund hoher Induktion bei niedrigen Konzentrationen und

niedrige Induktion bei hohen Konzentrationen, können supressive Eigenschaften von Substanzen, ein weiterer Rezeptor oder eine „Störung“ der AhR-Menge vermutet werden (s. 5.4.1.4). Verbindungen in Pflanzenschutzmitteln, die strukturell nicht die Voraussetzungen zur Bindung an den AhR erfüllten, führten zu keiner Steigerung der Deethylase-Aktivität des P4501A1-Systems. Beobachtungen von Delecluse et al. (2000) konnten daher nicht bestätigt werden.

Desweiteren konnten Hinweise zum additiven oder sehr schwach synergistischen Verhalten von Umweltproben durch den EROD-Bioassay erhalten werden. Die Inkubation von auf 25-50 % Deethylase-Aktivität eingestellten H4IIE-Zellen mit einer MVA-Flugasche führte zu Aktivitätssteigerungen, die mit 27-57 % von den theoretisch errechneten Werten abwichen. Signifikantes synergistisches Verhalten tritt jedoch nicht auf (ab Faktor 10).

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit sind die Untersuchungen zu CYP1A1-Inhibierungseffekten, hervorgerufen von Tocopherolen, Flavonoiden und Cannabis-Rauch. Hierbei zeigten sich im Vergleich zu den Tocopherolen hohe Inhibierungseffekte durch Flavonoide. Die durch 2,3,7,8-TCDD hervorgerufene Deethylase-Aktivität konnte fast vollständig herabgesetzt werden, wobei z.B. ein Inhibierungseffekt von 75 % mit 1,5 pmol/Loch Flavon und 0,62 fmol/Loch 2,3,7,8-TCDD erreicht wurde. Mit Cannabis-Rauch konnten ähnliche CYP1A1-Inhibierungseffekte erzielt werden (Abb. 5.23). Die festgestellte Wirkung dieser Inhibierungssubstanzen auf m-RNA-Ebene ist folgende: Tocopherole zeigen keinen Einfluß auf m-RNA-Menge; Flavon und Cannabis-Rauch erhöhten die m-RNA-Menge um Faktor 20 bzw. 3 bei einem Inhibierungseffekt des CYP1A1-Systems von 75 % bzw. 99 %. Eine vierfache Erhöhung der Flavonoidgesamtmenge aus Nahrungsmitteln könnte z.B. den beobachteten Effekt erzielen. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die angewandten In-vitro-Rattenleberzellstudien auf die Physiologie des Menschen übertragbar sind. Aufgrund dieser Ergebnisse und unter Einbeziehung des aktuellen Stands der Literatur kann von verschiedenen Ursachen für diese Effekte ausgegangen werden, die eine direkte Verbindung zwischen dem CYP1A1-System, der O₂-Radikal-Bildung und auch dem Immunsystem nahe legen (s. 5.5.4 und 5.5.5).

7 Ausblick

Zur Erfassung des globalen Eintrags von PCDD/F und ähnlichen Verbindungen sind Probenahmen in noch nicht untersuchten Ländern erforderlich. Diese Analyse sollte neben der instrumentellen Analytik auch mit bioanalytischen Testsystemen durchgeführt werden, um eine vollständige Erfassung der biologischen Wirksamkeit von Emissionen zu erhalten. Hierbei sind auch kinetische Studien zur CYP1A1-Induktion auf m-RNA-Ebene von Interesse.

Um die vollständige Erfassung von östrogenem Potential durch den nicht metabolismusfähigen Hefe-Östrogen-Assay zu erhalten, sollten Einzelsubstanzen und diverse Umweltmatrizes durch einen vorgeschalteten Bioaktivierungsschritt auch hinsichtlich ihrer Metaboliten erfasst werden. Dies wäre durch eine Inkubation auf H4IIE-Zellen, anschließenden Zellaufschluss und Einsetzen im Hefe-Östrogen-Assay denkbar.

8 Anhang

8.1 Material

8.1.1 Geräte

Gerät

Dioxin-Laboratorium:

Rotationsverdampfer

Säulen

GPC-Säule 13 mm x 95 cm Gelbetthöhe

Sandwich-Säule

Alox-Säule

Olsen-Säule

Tropftrichter

Soxhlett

ASE

Turbo Varp

Waage

N₂-Thermoblock

Hepatomzellkultur-Bereich:

Gerät

Typ

Autoklav

Varioklav 50050; H+P Labortechnik

Begasungsbrutschrank

B 5061 EC/CO₂, BB 6060; Kendro

Lumineszenzmessgerät

Lumicount; Packard

Fluoreszenzmessgerät

Fluorspektra; Kendro

pH-Messgerät

pH 5,3-7; WTW

Pipetten

Gilson, Pipetman P; Abimed

Wasserbad

Köttermann; Ing.-büro Braun

Sterilbank

HeraSafe

Zentrifuge

Biofuge 22R, Kendro

Zentrifugenrotoren

3747, 3743

Vortexer

Axiovert 25; Bender + Hobein

Pipetten

Eppendorf

Plattenschüttler

Titmax 100; Heidolph

Lichtmikroskop

Zeiss

Hefezellkultur-Bereich:

Gerät	Typ
Autoklav	Webeko; Schembera
Reinstwasseranlage	Super Q; Millipore
Ultraschallgerät	Branson
Sterilbank	Kendro
Schüttelwasserbad	Köttermann; Ing.-büro Braun
Vortexer	VF2; Ika-Labortechnik
Heizrührer	Ikamag; Ika-Labortechnik
Platten-Photometer	SLT-Spectra; SLT-Labinstruments
Küvetten-Photometer	Unicam 5675; Unicam Limited
Vortexer	VF2; Ika-Labortechnik
Schüttelinkubator	Infors

8.1.2 Geräte- und Programmeinstellungen

Tab. 8.1: Geräte und Programmeinstellungen zur instrumentellen PCDD/F-Analyse

PCDD/F			
Geräte			
HRGC	Hewlett Packard 6890 (jetzt: Agilent)		
HRMS	Finnigan MAT 95S		
Kapillarsäule	Restek Rtx-2330		
	Länge: 60 m	Ionisationsmode	EI
	Innendurchmesser: 0,25 mm	Ionisationsenergie	70 eV
	Filmdicke: 0,1 µm	Quellentemperatur	260 °C
Trägergas	Helium, 1,2ml/min constant flow	Interfacetemperatur	260 °C
Injektion	Gerstel KAS 4	Auflösung	10000
	splitlos		
	120°C, 12°C/sec 280 °C		
Temperaturprogramm	90 °C; 1,5 min, 25 °C/min 180 °C, 2 °C/min 260 °C; 15 min		

Tab. 8.2: Geräte und Programmeinstellungen zur instrumentellen PCB-Analyse

PCB			
Geräte			
HRGC	Hewlett Packard 5890 Series II (jetzt: Agilent)		
HRMS	Finnigan MAT 95		
Kapillarsäule	J&W DB-5ms		
	Länge: 60 m	Ionisationsmode	EI
	Innendurchmesser: 0,25 mm	Ionisationsenergie	70 eV
	Filmdicke: 0,1 µm	Quellentemperatur	260 °C
Trägergas	Helium, 2 bar Säulenvordruck		
Injektion	Gerstel KAS 3	Interfacetemperatur	280 °C
	Splitlos		
Temperaturprogramm	60 °C, 12 °C/sec 280 °C	Auflösung	8500
	90 °C; 1,5 min, 20 °C/min 170 °C; 7,5 min, 3 °C/min 280 °C; 10 min		

8.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Vertreiber
Einwegspritzen	Becton Dickinson
Reaktionsgefäße Standard 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße PCR 0,5 ml	Biozym
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm	Millipore
Zellkulturflaschen 25, 75 cm ²	Nunc
Zentrifugenröhrchen 14 ml	Becton Dickinson
96-Loch-Platten, Ft, transparent	Greiner
96-Loch-Platten, Ft, weiß	Packard
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon
Vials 1,2 ml mit Schraubverschluss	neolab
Kieselgel 60 (70-230 mesh), p.a.	Promochem
Florisil (60-100 mesh), p.a.	Promochem
Bio-Bed SX 8	Bio Rad
Aluminiumoxid B Super1	ICN
XAD-2 (Supelpak 2)	Supelco

8.1.4 Chemikalien

Alle Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und wurden nicht weiter gereinigt. Das verwendete Wasser wurde durch eine Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore mittels Vorfilter, Ionenaustauscher und Ultrafilter entsalzt und filtriert.

Reagenz	Hersteller / Vertreiber	Sitz
Agar	Gibco-BRL	Freiburg
Agarose	Gibco-BRL	Freiburg
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka	Neu-Ulm
Ampicillin	Amersham-Buchler Inc.	Braunschweig
L-Argininhydrochlorid	ICN	Eschwege
Benz(a)pyren	Fluka	Neu-Ulm
BSA	Uptima	Montlucon Cedex (F)
Cycloheximid	Merck	Darmstadt
Dicumarol	Boehringer	Mannheim
Dihydroxynaphthalin	Sigma	Deisenhofen
Dimethylsulfoxid, DMSO	Fluka	Neu-Ulm
Ethanol	Merck	Darmstadt
Ethinylöstradiol	Sigma	Deisenhofen
7-Ethoxyresorufin	Merck	Darmstadt
3-Hydroxy-Fluoranthren	Sigma	Deisenhofen
Fluorescein-Natriumsalz	Merck	Darmstadt
Fötales Kälberserum FKS	Gibco	Karlsruhe

Reagenz	Hersteller / Vertreiber	Sitz
Glutaraldehydlösung, 1,2 %	Fluka	Neu-Ulm
Hefeextrakt	Gibco-BRL	Freiburg
n-Hexan	Riedel-de-Haen	Deisenhofen
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	Merck	Darmstadt
Kieselgel 60	Merck	Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka	Neu-Ulm
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka	Neu-Ulm
α -Mercaptoethanol	Sigma	Deisenhofen
trans-Zimtsäure	Fluka	Neu-Ulm
Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Fluka	Neu-Ulm
PBS	Biochrom	Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin
Resazurin	Sigma	Deisenhofen
SDS molecular biology grade	Sigma	Deisenhofen
Tris ultra pure	ICN	Eschwege
Trypsin	Biochrom	Berlin
Vitamin B1 Hydrochlorid	Fluka	Neu-Ulm
Salze	Merck	Darmstadt
Säuren	Merck	Darmstadt
TRIS, 50 mM	ICN	Eschwege

Inhibitoren, CannabinoideVertreiber/Kat.-Nr.Sitz

Vitamin E	Fluka, 95240	Neu-Ulm
Vitamin E-Acetat	Fluka, 95250	Neu-Ulm
Δ^9 -THC	Sigma, T-2386	Deisenhofen
Cannabidiol, CBD	Sigma, C-7515	Deisenhofen
Cannabinol, CBN	Sigma, C-6888	Deisenhofen
Flavon	Fluka, F-2003	Neu-Ulm
3-Hydroxyflavon	Fluka, H-4280	Neu-Ulm

PAKVertreiber/Kat.-Nr.Sitz

Anthracen	Merck, 1454	Darmstadt
Chrysen	Fluka, 27220	Neu-Ulm
Fluoranthren	Sigma, F-4418	Deisenhofen

Phenolische Vbdg.Vertreiber/Kat.-Nr.Sitz

Kaffeesäure	Fluka, 60018	Neu-Ulm
Ferulasäure	Fluka, 46278	Neu-Ulm
trans-Zimtsäure	Fluka, 96340	Neu-Ulm
p-Cumarsäure	Fluka, 28200	Neu-Ulm
(S)-(+)-Mandelsäure	Suchardt, 806925	Hohenbrunn
Resveratrol	Sigma, R5010	Deisenhofen

8.1.5 Bakterienstämme / Zelllinien

Stamm / Zelllinie	Literatur / Herkunft
H4IIE	Reuber, 1961; Pitot, 1964
HL	Garrison, 1996
BP8	Moore und Weiss, 1982
D1	Moore und Weiss, 1982
Hefe SU	Routledge, 1996

8.1.6 Kits

Kit	Hersteller / Vertreiber	Sitz
BCA-Micro Assay Kit	Uptima/KMF, UP75860A	Montlucon Cedex (F) /Siegburg
Luciferase Assay System	Promega E1500	Madison (USA)

8.2 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser (18 M Ω /cm) angesetzt und je nach Reagenz autoklaviert oder mit Hilfe von Spritzenvorsatzfiltern bzw. Flaschenfilteraufsätzen (Membranporosität 0,22 μ m) steril filtriert.

8.2.1 Medien

Tab. 8.3: Zusammensetzung der verwendeten Medien

DMEM-Medium	Flüssigmedium <i>Biochrom</i>	
	Glucose	1,0 g/L
	N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	2 mM
	FKS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
SU Minimal-Medium für 96-Loch-Platten	KH ₂ PO ₄	13,61 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
	KOH-Pellets	4,2 g
	MgSO ₄	0,2 g
	Fe ₂ (SO ₄) ₃ -Lösung	1,0 ml
	L-Leucin	50 mg
	L-Histidin	50 mg
	Adenin	50 mg
	L-Arginin-HCL	20 mg
	L-Methionin	20 mg
	L-Tyrosin	30 mg
	L-Isoleucin	30 mg
	L-Lysin-HCL	30 mg
	L-Phenylalanin	25 mg
	L-Glutaminsäure	100 mg
	L-Valin	150 mg
	L-Serin	375 mg
H ₂ O	ad 1 L	
SU Medium für Lagerung bei -20° C	Glukose-Lösung	5,0 ml
	L-Asparaginsäure-Lösung	1,25 ml
	Vitamin-Lösung	0,5 ml
	L-Threonin-Lösung	0,4 ml
	Kupfer-II-Lösung	125 µl
	Minimal-Medium	45 ml
SU Medium für Lagerung bei -80° C	Glukose-Lösung	10 ml
	L-Asparagin-Lösung	2,5 ml
	Vitamin-Lösung	1,0 ml
	L-Threonin-Lösung	0,8 ml
	Kupfer-II-Sulfat-Lösung	250 µl

SU Wachstums-Medium für 96-Loch-Platten	Glukose-Lösung	5,0 ml
	L-Asparaginsäure-Lösung	1,25 ml
	Vitamin-Lösung	0,5 ml
	L-Threonin-Lösung	0,4 ml
	Kupfer-II-Sulfat-Lösung	125 µl
SU Ergänzungsstoff-Mischung für Erlenmeyer-Flaschen-Test	KH_2PO_4	13,61 g/L
	KOH	4,2 g/L
	MgSO_4	0,2 g/L
	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,0008 g/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0119 g/L
	$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	1,98 g/L
	Glukose	18,95 g/L
	Adenin	0,05 g/L
	Arginin	0,02 g/L
	Asparaginsäure	0,0947 g/L
	Glutaminsäure	0,1 g/L
	Histidin	0,05 g/L
	Isoleucin	0,03 g/L
	Leucin	0,05 g/L
	Lysin	0,03 g/L
	Methionin	0,02 g/L
	Phenylalanin	0,025 g/L
	Serin	0,375 g/L
	Threonine	0,182 g/L
	Tyrosin	0,03 g/L
	Valin	0,15 g/L
	Biotin	0,000021 g/L
	Pantothenate	0,00042 g/L
	Inositol	0,002 g/L
Pyridoxin	0,00042 g/L	
Thiamin	0,00042 g/L	
SU Basis- Medium	SU Ergänzungsstoff-Mischung	2,02 g
	H_2O	700 ml
	$\text{YNB}/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung	100 ml
	Glucose-Lösung, 20 % (w/v)	100 ml
	Leucin-Lösung	20 ml
	Histidin-Lösung	10 ml
	H_2O	70 ml

Die entsprechenden Agarnährböden wurden durch Zusatz von 1,5 % Agar hergestellt. Bei den Schrägagarrohren mit einem Zusatz von 1,0 % Agar.

8.2.2 Lösungen und Puffer

Tab. 8.4: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer beim EROD-Bioassay

PBS	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1,44 g
	KH ₂ PO ₄	2,2 g
	H ₂ O	ad 1 L
7-Ethoxyresorufin-Lösung, 400 µM	7-Ethoxyresorufin	5 mg
	Methanol	51 ml
Dicumarol, 1 mM	Dicumarol	16,5 mg
	NaOH-Lösung, 0,1 M	klare Lösung
	TRIS-Puffer, 50 mM	48 ml
Resazurin-Lösung	Resazurin	100 mg
	PBS	10 ml

8.3 Analytische Methoden

8.3.1 Belegungsplan Bioassays

Tab. 8.5: Belegungsplan EROD-Bioassay, verwendete Standardsubstanz 2,3,7,8-TCDD, V = 100 μ l (aus 20 μ l Standard + 3980 μ l Medium).

	1 Standard	2 Standard	3 Standard	4 Standard	5 Probe	6 Probe	7 Probe	8 Probe	9 Probe	10 Probe	11 Probe	12 Probe
A	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL
B	30 pg/ml	= 0,004 fmol	= 0,015 pg	= 0,04 pM								
C	40 pg/ml	= 0,06 fmol	= 0,02 pg	= 0,6 pM								
D	120 pg/ml	= 0,19 fmol	= 0,06 pg	= 1,9 pM								
E	200 pg/ml	= 0,31 fmol	= 0,10 pg	= 3,1 pM								
F	300 pg/ml	= 0,47 fmol	= 0,15 pg	= 4,7 pM								
G	400 pg/ml	= 0,62 fmol	= 0,2 pg	= 6,2 pM								
H	800 pg/ml	= 1,24 fmol	= 0,4 pg	= 12,4 pM	LW	LW	LW	LW	LW	LW	LW	LW

Tab. 8.6: Belegungsplan Hefe-Östrogen-Bioassay, verwendete Standardsubstanz 17- β -Östradiol, V= 2 μ l Standard bzw. Probe + 198 μ l Medium.

	1 ^{Standard}	2 ^{Standard}	3 ^{Standard}	4 ^{Standard}	5 ^{Probe}	6 ^{Probe}	7 ^{Probe}	8 ^{Probe}	9 ^{Probe}	10 ^{Probe}	11 ^{Probe}	12 ^{Probe}
A	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL
B	= 4,88 pM	= 265,22 fg	= 0,97 pmol	= 4,88 pM								
C	= 9,77 pM	= 531,16 fg	= 1,95 pmol	= 9,77 pM								
D	= 39,07 pM	= 2,15 pg	= 7,81 pmol	= 39,07 pM								
E	= 156 pM	= 8,51 pg	= 31,23 pmol	= 156 pM								
F	= 625 pM	= 34,03 pg	= 124,93 pmol	= 625 pM								
G	= 2,5 nM	= 136,1 pg	= 499,71 pmol	= 2,5 nM								
H	= 10 nM	= 542,1 pg	= 1,99 nmol	= 10 nM	LW	LW	LW	LW	LW	LW	LW	LW

8.3.2 Standardsubstanzen

Tab. 8.7: Verwendete Standardsubstanzen

PCDD/F	c (pg/µl)	PCDF	c (pg/µl)	PCB	c (pg/µl)
<i>Probenahmestandard</i>		<i>Aufarbeitungsstandard</i>		<i>Wiederfindungsstandard</i>	
¹³ C ₆ -1,2,3,4-TCDD	500	¹³ C ₁₂ -2,8-DiCDF	100	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4-TCDD	500
¹³ C ₁₂ 1,2,3,7,8,9-HxCDD	500	¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TCDF	100	4-MCB	800
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDF	400	4,4'-DiCB	800
<i>Wiederfindungsstandard</i>		¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeCDF	200	2,4,4'-TriCB	800
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4-TCDD	100	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxDF	300	2,2',5,5'-TeCB	700
		¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxDF	300	3,3',4,4'-TeCB	1000
<i>Aufarbeitungsstandard</i>		¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxDF	300	2,2',4,5,5'-PeCB	1000
¹³ C ₁₂ -2,7-DiCDD	100	¹³ C ₁₂ -2,3,4,6,7,8-HxDF	300	2,3,3',4,4'-PeCB	1000
¹³ C ₁₂ -2,3,7-TriCDD	100	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpDF	400	3,3',4,4',5-PeCB	700
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TCDD	100	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8,9-HpDF	400	2,2',4,4',5,5'-HxCB	1200
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDD	250	OCDF	900	2,2',3,4,4',5'-HxCB	700
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxDD	200			3,3',4,4',5,5'-HxCB	900
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxDD	200			2,2',3,4,4',5,5'-HpCB	1000
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxDD	200			2,2',3,3',4,4',5,5'-OCB	700
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpDD	300			2,2',3,3',4,4',5,5',6-NCB	1000
OCDD	900			2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DCB	800

9 Literatur

Die im Literaturverzeichnis aufgeführten Dissertationen der Technischen Universität München sind auch unter folgender online-Adresse erhältlich:

<http://www.iwi-iuk.org/dienste/TheO/>

- Aarts, J. M. M. J. G.; Denison, S.; De Haan, L. H. J.; Schalk, J. A. C.; Cox, M. A. und Brouwer, A. (1993). "Ah receptor-mediated luciferase expression: a tool for monitoring dioxin-like toxicity." Organohalogen Compounds **13**: 361-364.
- Aarts, J. M. M. J. G.; Cenijn, P. H.; Blankvoort, B. M. G.; Murk, A. J.; Brouwer, A.; Bovee, W. A.; Traag, W. A.; Hoogenboom, L. A. P.; Patandin, S.; Weisglas-Kuperus, N.; Sauer, P. J. J. und Denison, M. S. (1996). "Application of the CALUX bioassay for quantification of dioxin-like compounds in small amounts of human milk and blood plasma." Organohalogen Compounds **27**: 285-9.
- Ashby, J.; Tinwell, H.; Pennie, W.; Brooks, A. N.; Lefevre, P. A.; Bereford, N. und Sumpter, J. P. (1999). "Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects." J. Appl. Toxicol. **19**: 39-45.
- Ausubel, F. M.; Brent, R. (Editor); Kingston, R. E. (Editor) und Moore, D. D. (Editor) (1999). "Short Protocols in Molecular Biology." 4th Edition, John Wiley & Sons; ISBN: 047132938X.
- Ballschmitter, K.; Bacher, R.; Mennel, A.; Fischer, U.; Riehle, U. und Swerev, M. (1992). "The determination of chlorinated biphenyls, chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans by GC-MS." J. High Resolut. Chrom. **15**: 260-270.
- Ballschmitter, K. und Bacher, R. (Editoren) (1996). "Dioxine: Chemie, Analytik, Vorkommen, Umweltverhalten und Toxikologie der halogenierten Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane." Editoren: K. Ballschmitter; R. Bacher, VCH-Verlag, Weilheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, ISBN 3-527-28768-x.
- Behnisch, P. A. (2001). "Biodetectors in environmental chemistry. Are we at a turning point?" Environ. Int. **27**: 441-442.
- Behnisch, P. A.; Hosoe K. und Sakai, S.-i. (2001 a). "Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds - a review of bioassay/biomarker technology." Environ Int. **27**: 413 - 439.

- Behnisch, P. A.; Hosoe K. und Sakai, S.-i. (2001 b). "Combinatorial bio/chemical analysis of dioxin and dioxin-like compounds in waste recycling, feed/food, humans/wildlife and environment." Environ Int. **27**: 495 - 519.
- Behnisch, P. A.; Hosoe K.; Shiozaki, K.; Kiryu, T.; Komatsu, K.; Schramm, K.-W. und Sakai, S.-i. (2002). "Melting and Incineration Plants of Municipal Waste." Environ Sci & Pollut Res. **9** (5): 337-344.
- Benet, L. Z.; Kroetz D. L. und Sheiner, L. B. (1996). "Pharmacokinetics, the dynamics of drug absorption, distribution and elimination." in: Hardman, J. G. and Limbird, L. E. (Ed.): Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw-Hill, New York): 3-27.
- Beresford, N.; Routledge, E. J.; Harris, C. A. und Sumpter, J. P. (2000). "Issues Arising When Interpreting Results from an in Vitro Assay for Estrogenic Activity." Toxicol. Appl. Pharmacol. **162**: 22-33.
- Berndt, J. (1995). "Umweltbiochemie". Gustav Fischer Verlag; ISBN: 3-8252-1238-4.
- Bitsch, R. (1996). "Pflanzenphenole und ihre gesundheitliche Wirkung." Naturw. Rdsch. **49**: 47-51.
- Bitsch, I.; Netzel, M.; Straß, G.; Carlé, E. und Bitsch, R. (2002). "Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Fruchtsäften, gemessen als integrale plasmatische antioxidative Aktivität." Proc. Germ. Nutr. Soc. **4**: 27.
- Blumenstock, M. (2002). "Identifikation von Indikatorverbindungen für die on-line Überwachung der industriellen Altholz- und Abfallverbrennung mittels REMPI-Lasermassenspektrometrie sowie Untersuchungen zur Bildung von chloraromatischen Verbindungen." Dissertation, Technische Universität München.
- Bockhorn, H.; Hornung, A. und Hornung, U. (1998). "Stepwise Pyrolysis for Recycling of Plastic Mixtures." Macromol. Symp. **135**: 35.
- Bosveld, A. T. C.; de Bie, P. A. F.; van den Brink, N. W.; Jongepier, H. und Klomp, A. V. (2002). "In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands." Chemosphere **49** (1): 75-83.
- Bowers, J. L.; Tyulmenkov, V. V.; Jernigan, S. C. und Klinge, C. M. (2000). "Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptor alpha and beta." Endocrinology **141**: 3657-3667.
- Burelson, G. R.; Lebec, H.; Yang, Y. G.; Ibanes, J. D. und Pennington, K. N. (1993). "Effect of 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 5288-5292.

- Chakravarty, I. und Naik, V. K. (1983). "Action of delta-9-tetrahydrocannabinol on the binding of estradiol to uterine and other tissues in rat." Biochem. Pharmacol. **32**: 253-256.
- Chan, W. K. und Delucchi, A. D. (2000). "Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A4." Life Science **67**: 3103-3112.
- Chun, Y. J.; Kim, M. Y. und Guengerich, F. P. (1999). "Resveratrol Is a Selective Human Cytochrome P450 1A1 Inhibitor." Biochem. Biophys. Res. Commun. **262** (1): 20-24.
- Ciolino, H. P.; Yeh G. C. (1999). "Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity." Mol. Pharmacol. **56**: 784-790.
- Ciolino, H. P.; Wang T. T. und Yeh, G. C. (1998). "Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity." Cancer Res. **58**: 2754-2760.
- Coelhan, M.; Fingerling, G.; Angerhöfer, D. und Parlar, H. (1998). "Toxaphen in der Umwelt Teil I: Verhalten und Verbleib des Insektizids in der Umwelt." UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. **1**(10): 37-59.
- Delescluse, C.; Lemaire, G.; de Sousa, G. und Rahmani, R. (2000). "Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?" Toxicology **153**: 73-82.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (2000). "Ernährungsbericht 2000." Druckerein Heinrich GmbH, Frankfurt/Main: 46-47.
- DIN EN ISO/IEC 17025 (2000). "Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien." Dreisprachige Fassung (Deutsch, English, Französisch), CEN/CENELEC, Brüssel, Belgien, 2000.
- Donato, M. T.; Castell, J. V. und Gómez-Lechón, M. J. (1993 a). "A rapid and sensitive method for measuring monooxygenase activities in hepatocytes cultured in 96-well plates." Tissue Culture Association **14**: 153-158.
- Donato, M. T.; Gómez-Lechón, M. J. und Castell, J. V. (1993 b). "Amicroassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates." Anal. Biochem. **213**: 29-33.
- El Attar, T. und Virji, A. (1999). "The effects of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells." Anticancer Res. **19**: 5407-5414.

- EPA, Method 8290A. (1998). "Polychlorinated Dibenzodioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) by high resolution gas chromatographie/high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS)." 1-67.
- Fent, K. und Jung, D. K. J. (2000). "Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and azaarenes induce cytochrome P4501A in a fish hepatoma cell line." Marine Environmental Research **50** (1-5): 545.
- Fiedler, H.; Schramm, K.-W. und Hutzinger, O (1990). "Dioxin emissions to the air: mass balance for Germany today and the year 2000." Organohalogen Compounds **4**: 395-400.
- Fiedler, H. (2001). "Existierende Dioxininventare weltweit und neue Methodik zur Erstellung von vergleichbaren und vollständigen Emissionsinventaren." UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. **13** (2): 88-94.
- Funk, W.; Dammann, V.; Vonderheid, C. und Oehlmann, G. (1985). "Statistische Methoden in der Wasserchemie." Hrsg. W. Funk, VCH Verlag, Weinheim; ISBN-3-527-26307-1.
- Garrison, P. M.; Tullis, K.; Aarts, J. M. M. J. G.; Brouwer, A.; Giesy, J. P. und Denison, M. S. (1996). "Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin-like chemicals." Fundam. Appl. Toxicol. **30**: 194-203.
- Gehm, B. D.; McAndrews, J. M.; Chein, P. Y. und Jameson, Y. L. (1997). "Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 14138-14143.
- Grabic, R.; Marklund, S.; Pekarek, V.; Pun, M.; Puncocha, M. und Ullrich, J. (1999). "Effects of oxygen, sulphur dioxide, sulphuric acid and peroxides on the formation of polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) on the MWI fly ash." Organohalogen Compounds **41**: 251-254.
- GSF (2001). "Jahresbericht 2000." ISSN 0941-3847: 164-165.
- Guillette, L. J.; Cox, M. C. und Crain, D. A. (1996). "Plasma Insulin-like Growth Factor-I Concentration during the Reproductive Cycle of the American Alligator (*Alligator mississippiensis*)." General and Comparative Endocrinology **104**: 116-122.
- Hanberg, A.; Waern, F.; Asplund, L.; Haglund, E. und Safe, S. (1990). "Swedish dioxin survey: Determination of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors for some polychlorinated biphenyls and naphthalenes using biological tests." Chemosphere **20** (7-9): 1161-1164.

- Hinsdill, R. D.; Couch, D. L. und Speirs, R. S. (1980). "Immunosuppression in mice induced by dioxin (TCDD) in feed." J. Environ. Pathol. Toxicol. **4**: 401-412.
- Hofmaier, A. (1999). "Evaluierung eines Testsystems auf zellulärer Basis zur Detektion von Dioxinen und verwandten Verbindungen in Matrices der metallrecycelnden Industrie sowie die Bestimmung der genotoxischen Wirkung dieser Proben." Dissertation, Technische Universität München.
- Hofmaier, A. M.; Schwirzer, S. M. G.; Wiebel, F. J.; Schramm, K.-W.; Wegenke, M.; Kettrup, A. A. F. (1999 b). "Bioassay zur Bestimmung von TCDD-Toxizitätsäquivalenten (TEQ) von Umweltproben und Reststoffen." UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. **1**: 2-8.
- Hutzinger, O. (1990). "Untersuchung der möglichen Freisetzung von bromierten Dibenzophenylen und Dibenzofuranen beim Brand flammgeschützter Kunststoffe." Forschungsbericht 10403362, Universität Bayreuth, im Auftrag des Bundesumweltministeriums.
- Kaune, A.; Lenoir, D.; Nikolai, U.; Schramm, K.-W. und Kettrup, A. (1995). "Seven-year decreasing trend of PCDD/F emissions from a waste incinerator showing importance of primary measures." Organohalogen Compounds **23**: 477-480.
- Keim, T.; Fancke, W.; Schmidt, S. und Fortnagel, P. (1999). "Catabolism of 2,7-dichloro 2,4,8-trichlorodibenzofuran by *Sphingomonas sp.* Strain RW1." J. Industr. Microbiol. + Biotechnol. **23**: 369-363
- Koch, O. G. und Koch-Dedic, G. A. (1974). "Handbuch der Spurenanalyse." Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1. Teil.
- Korte, F.; Scheunert, I. und Parlar, H. (1979). "Toxaphene (Camphechlor). A special report." Pure & Appl. Chem. **51**: 1583.
- Lehnardt, R.; Kaune, A.; Schramm, K.-W. und Kettrup, A. (1998). "Sampling exhaust gases of thermal processes with continuous, automatic adjustment to isokinetic conditions." Organohalogen Compounds **36**: 77-80.
- Lineisen, J.; Radtke, J. und Wolfram, G. (1997). "Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayrischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrstudie." Z. Ernährungswiss. **36**: 403-412.
- Luthardt, P.; Mayer, J. und Fuchs, J. (2002). "Total TEQ emissions (PCDD/F and PCB) from industrial sources." Chemosphere **46**: 1303-1308.
- Ma, Q. und Baldwin, K. T. (2002). "A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor." Chemosphere **46**: 1491-1500.

- Machala, M.; Vondráček, J.; Bláha, L.; Ciganek, M. und Neca, J. (2001). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **497**(1-2): 49-62.
- Marquardt, H. und Schäfer, S. G. (Editoren) (1994). "Lehrbuch der Toxikologie." BI-Wiss.-Verl., Mannheim: 105. ISBN: 0124732704.
- McKinney, J.; Fannin, R.; Chae, K.; Rickenbach, U. und Peddersen, L. (1987). J. Med. Chem. **30**: 79-86.
- Milanov, N. (in Vorbereitung). "Comparative investigations on the thermal degradation of common polymers protected with different halogenated and organophosphorus flame retardants." Dissertation, Technische Universität München.
- Mira, L.; Fernandez, M. T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M. H. und Jennings, K. R. (2002). "Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity." Free Radical Research Vol.: noch nicht bekannt: 1-10.
- Moore, E. E. und Weiss, M. C. (1982). "Selective isolation of stable and unstable dedifferentiated variants from rat hepatoma cell line." J. Cell. Physiol. **111**: 1-8.
- Naderi Kalali, B.; Allameh, A.; Rassae M. J.; Bach H.-J.; Behechti A.; Doods K.; Kettrup A. und Schramm K.-W. (2003). "Suppressive effects of caraway extracts on 2, 3, 7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent-Gene expression of cytochrom P450 1A1 in the rat H4 II E cells." Molecular Pharmacology: eingereicht.
- NATO/CCMS (1988): "Committee on the challenges of modern society. Scientific basis for the development of the international toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Pilot study on instrumental information exchange on dioxins and related compounds." North Atlantik Treaty Organisation (NATO), Committee on the challenges of modern society (CCMS), Brussels, Report Nr. 176: 1-56.
- Nebert, D. W.; Adesnik, M.; Coe, M. J.; Estabrook, R. W.; Gonsalus, I. C.; Guengerich, F. J.; Gunsalus, I. C.; Johnson, E. F.; Kemper, B. und Lewin, W. (1987). "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." DNA **6**: 1-11.

- Nelson, D. R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J. J.; Feyereisen, R.; Waxman, D. J.; Waterman, M. R.; Gotoh, O.; Coo, M. J.; Estabroo, R. W.; Gunsalus, I. C. und Nebert, D. W. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics **6**: 1-42.
- Nickel, W. (1995). "Kunststoffe in der Elektro- und Elektronikindustrie und ihre Recyclingchancen.in: Brandrup, J.; Bittner, M.; Michaeli, W. und Menges, G. (Hrsg.): Die Wiederverwertung in Kunststoffen." Carl Hanser Verlag, München: 578-590. ISBN: 0121822605.
- OECD (1996). "Summary report of the 1996 OECD questionnaire on endocrine disrupting substances.": 4.
- OECD (1996). "Summary report of the 1996 OECD questionnaire on endocrine disrupting substances.": 12.
- Otto, F.; Leupold, G. und Parlar, H. (1998). "Chlorinated diphenoquinones: a new class of dioxin isomeric compounds discovered in fly ashes, slags, and pyrolysis oil samples by using HPLC/ELCD and HRGC/MS." Anal. Chem. **70**: 2831-2838.
- Pantiru, M.-E. (in Vorbereitung). "Entwicklung und Anwendung einer LC/MS-MS-Methode zur Analytik polarer Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe und ihrer Metaboliten." Dissertation, Technische Universität München.
- Philpot, R. M. (1991). "Characterisation of cytochrom P450 in extrahepatic tissues." Cytochrom P450 (Waterman, M. R. + Johnson, E. F.); Academic Press Inc., San Diego: 623-631.
- Pitot, H. C.; Peraino, C.; Marse, P. A. und Potter, V. R. (1964). "Hepatoma in tissue culture compared with adapting liver in vivo." Natl. Cancer Inst. Monogr. **13**: 229-245.
- Quaß, U.; Fermann, M. und Bröker, G. (2000). "The European Dioxin Inventory, Stage II." Volume I (a): 1-55 und Volume III (b): 1-140.
- Rawitch, A. B.; Schultz, G. S.; Ebner, K. E. und Vardaris, R. M. (1977). "Competition of Δ^9 -tetrahydrocannabinol with estrogen in rat uterine estrogen receptor binding." Science **197**: 1189-1191.
- Rehmann, K.; Schramm, K.-W. und Kettrup, A. (1999). "Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples." Chemosphere **38**: 3303-3312.
- Reuber, M. D. (1961). "A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat." J. Natl. Cancer Inst. **26**: 891-897.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. und Paganga, G. (1997). "Antioxidant properties of phenolic compounds." Trends in Plant Science **2**: 152-159.

- Rieß, M. (1999). "Entwicklung chromatographisch-spektroskopischer Methoden zur Bewertung flammgeschützter Kunststoffe." Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg.
- Roth, M. D.; Marques-Magallanes, J. A.; Yuan, M.; Sun, W. und Tashkin, D. P. (2001). "Induction and Regulation of the Carcinogen-Metabolizing Enzyme CYP1A1 by Marijuana Smoke and delta-9-Tetrahydrocannabinol." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **24**: 339-344.
- Routledge, E. J. und Sumpter, J. P. (1996). "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen." Environ. Toxicol. Chem. **15**: 241-248.
- Ruh, M. F.; Taylor, J. A.; Howlett, A. C. und Welshons, W. V. (1997). "Failure of cannabinoid compounds to stimulate estrogen receptors." Biochemical Pharmacology **53**: 35-41.
- Safe, S. (1990). "Polychlorinated Biphenyls (PCBs), di-benzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalent factors." Critical Reviews in Toxicology **15**: 241-248.
- Safe, S.; Harris, M. und Zacharewski, T. (1991). "Development and validation of bioassays for polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans." (International Agency for Research on Cancer) IARC Sci Publ. **108**: 147-159 (chapter 6).
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase." Science **239**: 487-491.
- Sakai, S.-S.; Hayakawa, K.; Takatsuke, H.; Kwakami, I. (2001). "Dioxin-like PCBs released from waste incineration and their deposition flux." Environ. Sci. Technol. **35**: 3601-3607.
- Sanderson, J. T.; Aarts, J. M. M. J. G.; Brouwer, A.; Froesse, K. L.; Denison, M. S. und Giesy, J. P. (1996). "Comparison of Ah receptor mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction in H4IIE cells: implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons." Toxicol. Appl. Pharmacol. **137**: 316-325.
- Sauer, M. A.; Rifka, S. M.; Hawks, R. L.; Cutler, G. B. jr. and Loriaux, D. L. (1983). "Marijuana: Interaction with the estrogen receptor." J. Pharmacol. Exp. Ther. **224**: 404-407.
- Schenkman, J. B. (1993). "Historical background and description of the cytochrom P450 monooxygenase system." Cytochrome P450 (J. B. Schenkman + H. Greim), Springer Verlag, Berlin: 3-13.

- Scheinost, A.; Sinowski, W. und Auerswald, K. (1997). "Regionalization of soil water retention curves in a high variable soilscape, I. Developing a new pedotransfer function." Geoderma **78**: 129-143.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal. Biochem. **150**: 76-85.
- Schmitz, H.J.; Hagenmaier, A.; Hagenmaier, H.; Bock, K.W. und Schrenk, D. (1995)." Potency of mixtures of polychlorinated biphenyls as inducers of dioxin receptorregulated CYP1A-activity in rat hepatocytes and H4IIE cells." Toxicology **99**: 47-54.
- Schmitz, H.J.; Behnisch, P.; Hagenmaier, A.; Hagenmaier, H.; Bock, K.W. und Schrenk, D. (1995)." CYP1A1-inducing potency in H4IIE cells and chemical composition of technical mixtures of polychlorinated biphenyls." Environ. Toxicol. Pharmacol. **1**: 73-79.
- Schramm, K.-W.; Hofmaier, A.; Klobasa, O.; Kaune, A. und Kettrup, A. (1999). "Biological in vitro emission control." Journal of Analytical and Applied Pyrolysis **49**: 199-210.
- Schramm, K.-W.; Klimm, C.; Hofmaier, A. und Kettrup, A. (2001). "Comparison of dioxin-like-response in vitro and chemical analysis of emissions and materials." Chemosphere **42**: 551-557.
- Schwirzer, S. (1998). "Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Bestimmung von 2,3,7,8-TCDD Äquivalenzwerten in umweltrelevanten Matrices unter Einbeziehung chemischer Cleanup Schritte." Dissertation, Technische Universität München.
- Sharpe, R. M. und Skakkebaek, N. E. (1993). "Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?" Lancet **341**: 1392-1395.
- Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Inui, Y. und Guengerich, P. F. (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrom P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 japanese and 30 caucasians." J. Pharmacol. exp. Ther. **270**: 414-423.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal. Biochem. **150**: 76-85.

- Tirmenstein, M. A.; Watson, B. W.; Haar, N. C. und Fariss, M. W. (1998). "Sensitive method for measuring tissue α -tocopherol and α -tocopheryloxybutyric acid by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection." J. of Chromatographie B **707**: 308-311.
- UBA (1997). "The european atmospheric emission inventory of heavy metals and persistent organic pollutants for 1990. TNO institute of environmental science, energy and process innovation." Forschungsbericht 104 02 672/03 im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin.
- UNEP (1999). "Dioxin and furan inventories; National and regioanl emissions of PCDD/PCDF." UNEP Chemicals, May 1999.
- VDI (1975). "Messen von Partikeln; Staubmessungen in strömenden Gasen; Gravimetrische Bestimmung der Staubbeladung.": Blatt 1-8.
- VDI (2001). "Messen von Emissionen - Messen von polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen (PCDD) und Dibenzofuranen (PCDF); Verdünnungsmethode; Ausführungsbeispiel zur DIN EN 1948 im Konzentarionsbereich 0,1 pg/m³ I-TEQ und Ergänzung zur DIN EN 1948.": 1-3.
- Viluksela, M.; Bager, Y.; Tuomisto, J. T.; Scheu, G.; Unkila, M.; Pohjanvirta, R.; Flodström, S.; Kosma, V.-M.; Mäki-Paakkanen, J.; Vartiainen, T.; Klimm, C.; Schramm, K.-W.; Wärngard, L. und Tuomisto, J. (2000). "Liver tumaor-promoting activity of 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TCDD-resistant rat strains." Cancer Res. **60**: 6911-6920.
- Vogg, H.; Metzger, M. und Stieglitz, L. (1987). "Recent findings on the formation and decomposition of PCDD/PCDF in municipal solid waste incineration." Waste Management and Research **5**: 285-294.
- Watkins, P. B.; Wrighton, S. A.; Schuetz, E. G.; Molowa, D. T. und Guzelian, P. S. (1987). "Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man." J. Clin. Invest. **80**: 1029-1036.
- Watzl, B. und Rechkemmer, G. (2001). "Flavonoide" Ernährungs-Umschau **48** (12): 498-502.
- Wehrmeier, A.; Lenoir, D.; Schramm, K.-W.; Zimmermann, R.; Hahn, K.; Henkelmann, B. und Kettrup, A. (1998). Patterns of isomers of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins as tool for elucidation of thermal formation mechanism." Chemosphere **36**: 2775-2801.

- WHO (1998). "Experts re-evaluate health risks from dioxins." Daten veröffentlicht in:
Van den Berg, M.; Birnbaum, L.; Bosveld, A. T. C.; Björn Brunström, B.;
Cook, P.; Feeley, M.; Giesy, J. P.; Hanberg, A.; Ryuichi Hasegawa, R.;
Kennedy, S. W.; Kubiak, T.; Larsen, J. C.; van Leeuwen, F. X. R. Liem, A.
K. D.; Nolt, C.; Peterson, R. E.; Poellinger, L.; Safe, S.; Schrenk, D.;
Donald Tillitt, D.; Tysklind, M.; Younes, M.; Fredrik Wærn, F. und
Zacharewski, T. (1998). " Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs,
PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife." Environ Health Perspect **106**:
775-792
- Wiebel, F. J.; Wegenke, M. und Kiefer, F. (1996). "Bioassay for determining 2,3,7,8-
terachlordibenzo-p-dioxin equivalents (TEs) in human hepatoma HepG2
cells." Toxicol. Lett. **88**: 335-338.
- Wood, K. V. (1990). "Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists." Promega
Notes **28**: 1.
- ZVEI (1998). "Kunststoffe in der Elektrotechnik - Aspekte des Brandschutzes."
Zentralverband Elektrotechnik- und Elektronikindustrie e.V., Frankfurt am
Main, Abt. Umweltschutzpolitik, Umwelt-Info: 1-9.