

Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik der Fakultät für Landwirtschaft und
Gartenbau der Technischen Universität München

Toxikokinetische Betrachtungen zu 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

Diplom Chemiker

Johann Michael Wirsing

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Kettrup

2. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster

3. Priv.-Doz. Dr. K.-W. Schramm

Die Dissertation wurde am 20.12.1999 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau am 10.05.2000 angenommen.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation

Wirsing, J.M., Weber, L.W.D., Kettrup, A., Rozman, K.; Distribution of TCDD between plasma fractions and proteins in human plasma is independent of dose in the range of 75 pmol - 75 µmol/ml plasma; *Toxicologist*, **14**, 273 (1994)

Wirsing, J.M., Weber, L.W.D., Kettrup, A., Rozman, K.K.; Distribution of TCDD between blood components; *Toxicologist*, **15**, 42 (1995)

Wirsing, J.M., Weber, L.W.D., Schramm, K.-W., Kettrup, A.A., Rozman, K.K.; Distribution of TCDD between blood components of rats and humans; Vo-Dinh, T., Nießner, R. (Hrsg.); Environmental monitoring and hazardous waste site remediation; Proc. SPIE Vol. 2504, 160 (1995)

Wirsing, J.M., Schramm, K.-W., Kettrup, A., Weber, L.W.D., Rozman, K.; Half lives of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin after EROD-inducing and non-inducing doses; *Organohal. Comp.*, **29**, Ecotoxicol. Toxicol. Metabolism/Toxicokinetics, 400 (1996)

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zielte zum einen auf die Erarbeitung und Validierung von Methoden zur experimentellen Messung von Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizienten und Extraktionseffizienz-Koeffizienten zur Beschreibung der Verteilung von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). Diese Parameter finden Eingang in physiologisch orientierte pharmakokinetische Modelle (Physiologically based pharmacokinetic models, PBPK) und werden meist rechnerisch durch Kurvenanpassung ermittelt. Der verfolgte Ansatz zielte dabei auf die Simulation des Verhaltens der Gewebe als Summe des Verhaltens der Gewebekonstituenten mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Proteine, Lipide, wäßrige Kompartimente). Eingangs wurde die Verteilung von TCDD im Blut von Mensch und Ratte auf die Lipid-, Protein- und Zell-Fractionen untersucht, und eine lineare Abhängigkeit von der in der jeweiligen Fraktion vorhandenen Gesamtmenge an Cholesterin, Cholesterinestern und Fettsäureestern beobachtet. Diese Ergebnisse wurden jedoch nachträglich durch die Entdeckung in Frage gestellt, daß der verwendete ³H-markierte TCDD-Standard zu ca. 30 % mit Addukten aus der Reaktion des Zerfallsprodukts von ³H-TCDD mit dem Lösungsmittel verunreinigt war.

Zum anderen wurde die Ausscheidung unterschiedlicher Dosen von TCDD durch Ratten unter dem Einfluß der Beimischung von Cholestyramin und Hexadekan zum Futter untersucht. Cholestyramin ist in der Lage, die Resorption polarer Verbindungen zu verhindern, und kann damit u.a. die enterohepatische Zirkulation von Metabolismusprodukten unterbrechen. Hexadekan erhöht den lipophilen Charakter des Darminhalts, und kann so die Ausscheidung unpolarer Verbindungen erhöhen. Ratten wurde eine unterhalb der Schwelle für die Induktion von P4501A1-Aktivität in der Leber liegenden Dosis (8 ng TCDD/kg Körpergewicht) bzw. einer nicht-letalen, aber voll enzym-induzierenden Dosis (2 µg TCDD/kg Körpergewicht) oral verabreicht, und die Ausscheidung mit Urin und Fäzes über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet. Die Halbwertszeit der Ausscheidung zeigte sich dabei stark dosisabhängig, zunehmend mit abnehmender Dosis. Zusatz von 4 Gew.% Cholestyramin zum Futter hatte keinen Einfluß auf die Ausscheidung von TCDD. 5 Gew.% Hexadekan im Futter hingegen beschleunigten die Ausscheidung einer nicht enzym-induzierenden Dosis signifikant, blieb aber ohne Effekt bei der P4501A1-induzierenden Dosis. Daraus kann geschlossen werden, daß TCDD seinen Metabolismus selbst induziert, und daß die Ausscheidung bei Dosen unterhalb der Schwelle für die Autoinduktion des Metabolismus durch die Diffusion in das

IV

Darmlumen, oberhalb dieser Schwelle durch die Geschwindigkeit des Metabolismus limitiert ist.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde von April 1993 bis Juni 1999 am Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München erarbeitet. An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Kettrup für die aktuelle Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Schuster danke ich für die Übernahme des Ko-referats.

Die experimentellen Arbeiten wurden von April 1993 bis Juni 1999 am Institute of Pharmacology, Toxicology and Therapeutics des University of Kansas Medical Center, Kansas City (KUMC), KS, USA, und von Juni 1995 bis Mai 1996 am Institut für Ökologische Chemie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg, durchgeführt. Die auf biologischen Arbeitsmethoden basierenden Versuche wurden dabei in Kansas City in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Rozman realisiert, chemisch-analytische Experimente erfolgten am Institut für Ökologische Chemie in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. habil. K.-W. Schramm. Diesbezüglich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rozman und Herrn Dr. Schramm für die Zusammenarbeit bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie für die Bereitschaft zur Diskussion bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. L. Weber für die freundliche Unterstützung, das stets offene Ohr und das angenehme Arbeitsklima in Kansas City, sowie Prof. Dr. William Harris für seine Hilfsbereitschaft und die Überlassung der Labore und Gerätschaften des KUMC Lipid Laboratory. Bei den Profs. Alper, Bunag, Cheng, Doull, Gordon, Klaassen, Maguire, Parkinson, Pazdernik und Reed sowie den Drs. Bieniek, Kerecsen, Stahl und Viluksela möchte ich mich für die fruchtbaren Diskussionen zu Einzelproblemen bedanken.

Weiterhin danke ich:

Frau M. Lebofsky, die mir immer mit Rat und Tat bei Problemen mit Versuchstieren, Enzymassays, der Bürokratie oder der Suche nach (E-mail-) Adressen zur Seite stand.

Herrn Chem.-Ing. B. Henkelmann, Herrn Dr. C. Klimm, Frau L. Lattmann und Herrn T. Wottgen für die Unterstützung bei der Probenaufarbeitung, für die Durchführung der PCDD/F-Messungen an der GC-HRMS, die Hilfe beim Erarbeiten der HPLC-Methoden und das angenehme Arbeitsklima.

Für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre, die mich die Zeit als Doktorand in angenehmer Erinnerung behalten läßt, möchte ich mich bei allen meinen Mitstudenten/innen und Kollegen/innen bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei Fang, Xuelin, Greg, Christiane, Christian, H.P., Püüsen, Alfred, Sigi und Per.

Patrizia und Alison für ihre Unterstützung und Nachsicht.

Meiner Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Zu guter Letzt mein Dank an Andrea und Pu, deren charakterliche Stärke wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

Name:	Johann Michael Wirsing
Geburtsdatum und -ort:	23. Juli 1962 in München
Familienstand:	verheiratet
Schulbildung:	
1968 - 1972	Grundschule an der Herterichstraße in München-Solln
1972 - 1981	Gymnasium Pullach, Hans Keis Str. 64; abgeschlossen mit Abitur
Hochschulbildung:	
11/1983 - 12/1986	Studium der Chemie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
01/1987 - 09/1988	Studium der Chemie (Masters program) an der McGill University, Montreal/Canada. Arbeiten zur Steigerung der Kompatibilität organischer Polymere mit Cellulose durch Einführung ionischer Gruppen
02/1991	Hauptdiplom-Prüfung
04/1991 - 01/1992	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Quantenoptik, 8046 Garching: Neue Mantelmaterialien für flüssigkeits- und luftgefüllte Lichtleiter

München, den 05.09.00

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften von TCDD	3
1.2	Toxizität von TCDD	4
1.2.1	Mechanismus der Toxizität	4
1.2.2	Akute und chronische Aspekte der Toxizität	7
1.2.3	Auszehrungssyndrom (Wasting Syndrom)	7
1.2.4	Thymusatrophie	8
1.2.5	Chlorakne	8
1.2.6	Hepatotoxizität	8
1.2.7	Immuntoxizität	9
1.2.8	Schädigungen der Fortpflanzungsorgane	9
1.2.9	Teratogene Effekte und Einflüsse auf Wachstum und Entwicklung	10
1.2.10	Kanzerogene Wirkung	10
1.3	Toxikokinetik von TCDD	11
1.3.1	Resorption	11
1.3.2	Verteilung von TCDD auf Organe und Gewebe	11
1.3.3	Ausscheidung von TCDD	15
1.4	Experimentelle Bestimmung von Parametern für die Modellierung des toxikokinetischen Verhaltens von TCDD	16
1.4.1	Einführung in pharmakokinetische Modelle auf physiologischer Basis (physiologically based pharmacokinetic oder PBPK-Modelle)	16
1.4.2	Struktur eines Modells für die Verteilung von TCDD und Methoden zur Bestimmung der Konzentrationen von TCDD in Blut und Geweben	19

1.5	Stimulierung der Ausscheidung von TCDD durch Nahrungszusätze	25
1.6	Aufgabenstellung.....	26
2	Material und Methoden:	28
2.1	Vorbemerkung.....	28
2.2	Laborgeräte und Hilfsmittel.....	28
2.2.1	Geräte, welche bei in Kansas City, USA, durchgeführten Versuchen Verwendung fanden.....	28
2.2.2	Geräte, welche bei in Neuherberg durchgeführten Versuchen Verwendung fanden	30
2.3	Chemikalien.....	30
2.3.1	Chemikalien, welche bei in Kansas City, USA, durchgeführten Versuchen Verwendung fanden.....	30
2.3.2	Chemikalien, welche bei in Neuherberg durchgeführten Versuchen Verwendung fanden.....	31
2.4	Umgang mit TCDD-haltigen Lösungen	32
2.5	Bestimmung von Radioaktivitätsgehalten	32
2.5.1	Radioaktivitätsbestimmung in Kansas City, USA.....	32
2.5.1.1	Allgemeine Methoden	32
2.5.1.2	Messung der Radioaktivität in Proben von Vollblut oder isolierter Blutzellfraktionen.....	33
2.5.1.3	Messung der Radioaktivität in Agarosegelstücken	33
2.5.1.4	Bestimmung von Radioaktivitätsgehalten in Geweben.....	34
2.5.1.5	Abschätzung des Gehalts an Radioaktivität in Rattenfäzes im Szintillationszähler	34
2.5.2	Radioaktivitätsbestimmung in Neuherberg	35
2.6	Bestimmung der Proteinkonzentrationen in mikrosomalen Suspensionen und hochverdünnten wäßrigen Albuminlösungen.....	35

2.7	Untersuchungen zum Verteilungsverhalten von TCDD in Blut von Mensch und Ratten	36
2.7.1	Methodenentwicklung	36
2.7.1.1	Entnahme und Konservierung von Blut- bzw. Plasmaproben	36
2.7.1.2	Inkubation von Vollblut bzw. Plasma mit ungereinigtem ³ H-TCDD/TCDD.	36
2.7.1.3	Herstellung von NaCl/NaBr-Lösungen definierter Dichte für die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	37
2.7.1.4	Herstellung eines Dichtegradienten für die Fraktionierung von Plasma durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	38
2.7.1.5	Fraktionieren von Proben nach Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.....	38
2.7.1.6	Ermittlung der Volumina von mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation erhaltenen Lipoproteinfraktionen aus deren Massen zur Berechnung des Lipidgehalts aus der Konzentration	39
2.7.1.7	Überprüfung der Reinheit der isolierten Lipoproteinfraktionen	40
2.7.1.7.1	Lipoprotein-Elektrophorese mit Lipoprint LDL System	40
2.7.1.7.2	Lipoprotein-Elektrophorese mit Electrophoresis System Lipoprotein Kit	40
2.7.1.8	Trennung des Plasmas in Lipoproteinfraktionen	40
2.7.1.8.1	Trennung in einem Schritt	40
2.7.1.8.2	Trennung in zwei Schritten.....	41
2.7.1.9	Herstellung Lipoprotein-freien Plasmas	42
2.7.1.10	Elektrophoretische Trennung isolierter Plasmaproteine.....	42
2.7.1.11	Extraktion von ³ H-TCDD und Verunreinigungen aus Vollblut bzw. Plasma	44
2.7.1.11.1	Fest/Flüssig-Kaltextraktion mit CH ₂ Cl ₂ /Cyclohexan bzw. CH ₂ Cl ₂ /Cyclohexan/ Azeton.....	45
2.7.1.11.2	Heißextraktion von Plasma mit Toluol.....	45
2.7.1.11.3	Flüssig/Flüssig-Extraktion von Plasma mit Toluol nach Denaturierung des Plasmas	45

2.7.1.12	Chromatographie von Plasmaextrakten an der Sandwichsäule zur Vorbereitung der Proben für die HPLC.....	46
2.7.1.13	Untersuchung der radiochemischen Reinheit von ungereinigtem ³ H-TCDD in einer Standardlösung oder in Plasmaextrakten mittels HPLC	47
2.7.1.14	Isolierung von reinem ³ H-TCDD sowie der in ungereinigtem ³ H-TCDD enthaltenen Verunreinigungen.....	48
2.7.2	Experimenteller Ansatz	49
2.7.2.1	Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung von ³ H-TCDD/TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion	49
2.7.2.2	Untersuchung der Verteilung von ungereinigtem ³ H-TCDD zwischen Zellfraktion und Plasma	49
2.7.2.3	Untersuchung der Abhängigkeit der Verteilung von ungereinigtem ³ H-TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion von der Verteilung der Lipide .	50
2.7.2.4	Untersuchung der Bindung von ³ H-TCDD an Plasmaproteine.....	50
2.7.2.5	Validierung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Verteilung von TCDD in Blut von Mensch und Ratte.....	50
2.7.2.5.1	Extraktion von mit ³ H-TCDD inkubiertem Plasmafraktionen und Quantifizierung der Verunreinigungen mittels HPLC.....	50
2.7.2.5.2	Untersuchung der Verteilung von reinem ³ H-TCDD bzw. der isolierten Verunreinigungen in Plasmafraktionen, Vergleich mit der Verteilung des ungereinigten ³ H-TCDD-Standards.....	51
2.8	Einleitende Versuche zur Bestimmung von Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizienten: Bestimmung der Adsorptionskonstante von ³ H-TCDD an Albumin bzw. Bestätigung der Löslichkeit von ³ H-TCDD in Puffer.....	51
2.8.1	Herstellung der RS-Albuminlösungen	51
2.8.2	Inkubation von Proteinlösungen oder Puffer mit ³ H-TCDD als Bodenkörper	52
2.8.3	Inkubation von Proteinlösungen oder Puffer mit ³ H-TCDD unter Verwendung einer Dialysemembran.....	52
2.9	Untersuchung der Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihrer Beeinflussung durch Futterzusätze.....	53

2.9.1	Versuchstierhaltung	53
2.9.2	Methoden	54
2.9.2.1	Zubereitung des Futters mit Futtermittelzusätzen.....	54
2.9.2.2	Herstellung der Dosierlösungen.....	54
2.9.2.3	Dosierung der Tiere	54
2.9.2.4	Urin- und Fäzesprobennahme	55
2.9.2.5	Tötung der Tiere und Entnahme von Gewebeproben	55
2.9.2.6	Isolierung mikrosomalen Proteins aus Lebergewebe.....	56
2.9.2.7	Bestimmung der EROD-Aktivitäten in mikrosomalen Suspensionen.....	56
2.9.3	Experimenteller Ansatz.....	57
2.9.3.1	Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Cholestyramin.....	57
2.9.3.2	Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Hexadekan	57
2.9.3.3	Validierung der Ergebnisse zu Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten	58
2.10	Statistische Auswertung.....	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Untersuchungen zum Verteilungsverhalten von TCDD in Blut von Mensch und Ratten	59
3.1.1	Methodenentwicklung	59
3.1.2	Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung von ³ H-TCDD/TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion	61
3.1.3	Verteilung von ungereinigtem ³ H-TCDD zwischen Zellfraktion und Plasma	61
3.1.4	Verteilung von ungereinigtem ³ H-TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion in Plasma in Abhängigkeit von Menge und Verteilung der Lipide..	63

3.1.5	Bindung von ^3H -TCDD an Plasmaproteine	66
3.1.6	Validierung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Verteilung von TCDD in Blut von Mensch und Ratte.....	69
3.1.6.1	Extraktion von mit ^3H -TCDD inkubiertem Plasmafraktionen und Quantifizierung der Verunreinigungen mittels HPLC.....	69
3.1.6.2	Vergleich der Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD-Standard, reinem ^3H -TCDD bzw. der isolierten Verunreinigungen in Plasmafraktionen	71
3.2	Versuche zur Bestimmung von Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizienten: Bestätigung der Wasserlöslichkeit von ^3H -TCDD und Bestimmung der Adsorptionskonstante von ^3H -TCDD an Albumin	72
3.2.1	Inkubation von Proteinlösungen oder Puffer mit ^3H -TCDD als Bodenkörper.....	72
3.2.2	Inkubation von Proteinlösungen oder Puffer mit ^3H -TCDD unter Verwendung einer schlauchförmigen Dialysemembran	74
3.3	Untersuchung der Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihrer Beeinflussung durch Futterzusätze.....	80
3.3.1	Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Cholestyramin	80
3.3.2	Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Hexadekan	83
3.3.3	Validierung der Ergebnisse zu Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten unter Gabe von Futterzusätzen.....	87
4	Diskussion	90
4.1	Vorbemerkung	90
4.2	Verteilung von TCDD im Blut von Mensch und Ratte.....	91
4.2.1	Methodenentwicklung	92

4.2.2	Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung von ^3H -TCDD/TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion	92
4.2.3	Die Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD zwischen Zellfraktion, Plasmaproteinen und Lipoproteinen, und ihre mathematische Beschreibung	93
4.2.4	Bindung von ^3H -TCDD an Plasmaproteine	94
4.2.5	Validierung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Verteilung von TCDD in Blut von Mensch und Ratte	95
4.3	Vorversuche zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten für TCDD zwischen Rattenblut und -geweben	97
4.4	Untersuchung der Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihrer Beeinflussung durch Futterzusätze	99
4.4.1	Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Cholestyramin	100
4.4.2	Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Hexadekan	102
4.4.3	Validierung der Ergebnisse zu Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten unter Gabe von Futterzusätzen	104
5	Zusammenfassung	107
6	Ausblick	111
7	Anhang	113
7.1	Abkürzungsverzeichnis	113
7.2	Ableitung der verwendeten physikalisch-chemischen Beziehungen: Verlauf der Konzentrationen bei Dialyse einer gesättigten Lösung, in der die Konzentration des gelösten Stoffes durch überschüssigen Bodenkörper des Stoffes konstant gehalten wird, gegen reines Lösungsmittel	115

Quellennachweis 116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Mengen NaBr zur Einstellung von Lösungen definierter Dichte ausgehend von 0,15 M NaCl	37
Tabelle 2-2: Flüssig/Flüssig-Extraktion von Plasma mit Toluol nach Denaturierung des Plasmas: Verwendete denaturierende Agens und Temperaturbehandlungen	46
Tabelle 3-1: Relative Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD in Fraktionen von menschlichem Plasma nach Inkubation von Plasma mit unterschiedlichen Mengen ^3H -TCDD/TCDD und Auftrennung durch Dichtegradientenzentrifugation	61
Tabelle 3-2: Vergleich von experimentell gefundenen mit nach Gleichung 11 berechneten Radioaktivitäts-Gehalten in der Plasmaproteinfraktion von Vollblutproben von Mensch und Ratte	63
Tabelle 3-3: Vergleich der Verteilung ^3H -assoziierter Radioaktivität aus ungereinigtem ^3H -TCDD in Lipoproteinfraktionen mit der gemessenen Verteilung der Lipide (Cholesterine + Triglyzeride) ohne und mit Korrektur für freies Glycerin	65
Tabelle 3-4: Verteilung von ^3H -TCDD-assoziierter Radioaktivität nach Elektrophorese von mit ^3H -TCDD inkubierten Plasmaproben bzw. Referenzlösungen	68
Tabelle 3-5: Verteilung von ^3H -TCDD und der in ungereinigtem ^3H -TCDD vorliegenden Verunreinigungen auf Plasmafraktionen in Blut von Mensch und Ratte	70
Tabelle 3-6: Verteilung von ^3H -TCDD, der in ungereinigtem ^3H -TCDD vorliegenden Verunreinigungen und des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards auf Plasmafraktionen in Humanblut, Vergleich mit der aus der Zusammensetzung des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards errechneten Verteilung	71
Tabelle 3-7: Aktivität in Albuminlösungen verschiedener Konzentration nach Inkubation von je 2 ml der Albuminlösung mit einem Überschuß an ungereinigtem ^3H -TCDD für 48 h	74
Tabelle 3-8: Verlauf der Aktivitätszunahme in der Dialyselösung (Phosphatpuffer) bei Dialyse gegen eine gesättigte wäßrige Lösung von ungereinigtem ^3H -TCDD, in der die Konzentration des ungereinigten ^3H -TCDD durch überschüssigen Bodenkörper der Substanz konstant gehalten wird; Grenze der Durchlässigkeit der Membran in Abhängigkeit vom Molekulargewicht: 1000D	76

Tabelle 3-9: Maximale Konzentrationen in der Dialyselösung bei der Dialyse von wäßrigen Lösungen von ungereinigtem ^3H -TCDD, deren Konzentration durch einen festen Bodenkörper konstant gehalten wird, gegen Phosphatpuffer bzw. wäßrige Lösungen von Albumin; Durchlässigkeit der Dialysemembran: bis 1000 D 77

Tabelle 3-10: Dialyse von wäßrigen Lösungen von ^3H -TCDD, deren Konzentration durch eine festen Bodenkörper konstant gehalten wird, gegen Phosphatpuffer bzw. wäßrige Lösungen von Albumin; Durchlässigkeit der Dialysemembran: bis 100,000 D 78

Tabelle 3-11: Durchschnittliche Gewichtszunahme, kumulative Futtermittelaufnahme und tägliche Futtermittelaufnahme pro kg Körpergewicht von Ratten (n = 5 Ratten pro Gruppe) innerhalb von 21 Tagen nach oraler Gabe von unterschiedlichen Mengen an ungereinigtem ^3H -TCDD bzw. isotonenverdünntem ungereinigtem ^3H -TCDD unter Fütterung mit normalem Futter oder mit Futter, dem 4 Gew.-% Cholestyramin beigemischt wurden 80

Tabelle 3-12: Ausscheidung von TCDD unter Verabreichung von Cholestyramin: Gewebekonzentrationen 21 Tage nach der Dosierung 82

Tabelle 3-13: Durchschnittliche Gewichtszunahme, kumulative Futtermittelaufnahme und tägliche Futtermittelaufnahme pro kg Körpergewicht von Ratten (n = 5 Ratten pro Gruppe) innerhalb von 21 Tagen nach oraler Gabe von unterschiedlichen Mengen an ungereinigtem ^3H -TCDD bzw. isotonenverdünntem ungereinigtem ^3H -TCDD unter Fütterung mit normalem Futter oder mit Futter, dem 5 Gew.-% Hexadecan beigemischt wurden 84

Tabelle 3-14: Ausscheidung von TCDD unter Verabreichung von Hexadecan: Gewebekonzentrationen 21 Tage nach der Dosierung, korrigiert für die Ausscheidung nicht resorbierten Materials in den ersten 48 h nach der Dosierung 86

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1: Struktur von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin 1
- Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Kompartimentstruktur a) eines klassischen pharmakokinetischen Modells, und b) eines Modells basierend auf physiologischen und anatomischen Gegebenheiten (PBPK-Modell) (c_i Konzentration eines Stoffes im i -ten Kompartiment, $c_{\text{art}}(t)$ Konzentration des Stoffes im arteriellen Blut, $c_{\text{ven},i}$ Konzentration des Stoffes im venösen Blut aus dem i -ten Kompartiment, Q_i Blutfluß in das i -te Kompartiment, k_{ij} Geschwindigkeitskonstante des Stofftransports von Kompartiment i in Kompartiment j , $f_{\text{in}}(t)$ Funktion, Dosierung beschreibend, $M(t)$ Metabolismustern; aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle in PBPK-Modellen verwendeten Parameter angegeben) 17
- Abbildung 2-1: Dichte von Lösungen von NaBr in 0,15 M NaCl dargestellt als Funktion des Brechungsindex der Lösung zur Bestimmung der Dichte aus dem Brechungsindex. Lineare Regression liefert: $d = -6,6367 + 5,728 \times n_{20}^D$ 40
- Abbildung 2-2: HPLC-Chromatogramm des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards. Chromatographische Bedingungen: $T = 25^\circ\text{C}$; 1 ml/min Methanol/Wasser (85/15 Vol./Vol.); Bakerbond PAH 16-PLUS, 250×3.0 (L \times i.D.); Der Hauptpeak bei 72 - 77 min wurde durch Vergleich mit der Retention nicht markierten TCDD (Detektion der UV-Absorption) als ^3H -TCDD identifiziert 48
- Abbildung 3-1: Elektrophorese auf Celluloseacetat und Anfärben der fetthaltigen Anteile mit Fettrot B von je einer Probe von humanem Plasma, Rattenplasma sowie den daraus isolierten Plasmaproteinfraktionen; mit Ausnahme einer geringen Verunreinigung der LDL aus Rattenplasma mit VLDL sind die isolierten Fraktionen rein 59
- Abbildung 3-2: Relativer Gehalt (in % des in Vollblut enthaltenen) an ungereinigtem ^3H -TCDD in Blutzellfraktion und Lipoproteinen von Mensch und Ratte als Funktion der Gesamtkonzentration an Cholesterinen und Triglyzeriden im Plasma isoliert aus der jeweiligen Vollblutprobe. Für die lineare Regressionsanalyse der Gehalte in Lipoproteinen wurde der Ursprung als Datenpunkt hinzugenommen (durchgezogene Linie: Ausgleichsgerade für Zellfraktion; gestrichelte Linie: Ausgleichsgerade für Plasma) 62
- Abbildung 3-3: Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD in Plasma: (a) Abhängigkeit des in den vereinigten Lipoproteinfraktionen isolierten Anteils der Radioaktivität von der inversen

Plasmakonzentration an (Chol. + Trigl.) gemessen in Plasma vor Fraktionierung; Ausgleichsgerade berechnet nur mit Daten aus menschlichem Plasma; (b) Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Lipoproteinfraktionen in Abhängigkeit vom relativen Gehalt an (Chol. + Trigl.) in den Fraktionen 64

Abbildung 3-4: Elektrophorese Lipoprotein-freier Plasmaproteine isoliert aus a) humanem Plasma, b) Rattenplasma auf Agarosegel; das Plasma in den gezeigten Kontrollbahnen wurde nicht mit ^3H -TCDD inkubiert und die Proteine im Gel mit Amido-Schwarz angefärbt; die parallel mitgelaufenen, mit ^3H -TCDD inkubiertem Plasma enthaltenden Bahnen wurden statt dessen in einzelne Bahnen aufgeteilt und die Bahnen entlang der eingezeichneten Linien zerschnitten, und abschließend der Radioaktivitätsgehalt in den so erhaltenen Stücken bestimmt 66

Abbildung 3-5: Vergleich der Verteilungen der Proteine (fett gezeichnet) und der Radioaktivität auf Agarosegelen nach Elektrophorese von mit ^3H -TCDD inkubierten Plasmaproteinen isoliert aus a) humanem Plasma, b) Rattenplasma 67

Abbildung 3-6: Ermittlung der Bindungskonstante von ^3H -TCDD an Albumin aus der Gleichgewichtskonzentration von ^3H -TCDD in Albuminlösungen unterschiedlicher Konzentration über einem Bodenkörper von ^3H -TCDD 73

Abbildung 3-7: Sigma minus Auftragung ($\ln(1 - \text{kumulative Ausscheidung in Bruchteilen der Dosis})$ gegen Zeit nach Dosierung) der Ausscheidung einer Dosis von $2 \mu\text{g}$ isotopenverdünntem ungereinigtem ^3H -TCDD mit den Fäzes (■ bzw. □) und dem Urin (◆ bzw. ◇) durch Ratten ohne (□ bzw. ◇) und mit (■ bzw. ◆) Futterzusatz Cholestyramin 81

Abbildung 3-8: Sigma minus Auftragung ($\ln(1 - \text{kumulative Ausscheidung in Bruchteilen der Dosis})$ gegen Zeit nach Dosierung) der Ausscheidung einer Dosis von $2 \mu\text{g}$ (■ bzw. □) oder 8 ng (◆ bzw. ◇) isotopenverdünntem ungereinigtem ^3H -TCDD durch Ratten ohne (□ bzw. ◇) und mit (■ bzw. ◆) Futterzusatz Hexadekan; a) Fäzes; b) Urin 85

Abbildung 3-9: Sigma minus Auftragung ($\ln(1 - \text{kumulative Ausscheidung in Bruchteilen der Dosis})$ gegen Zeit nach Dosierung) der Ausscheidung einer Dosis von 8 ng gereinigtem ^3H -TCDD (■) und äquivalenter Mengen bezogen auf ^3H -Aktivität von ungereinigtem ^3H -TCDD (◆) bzw. der isolierten Verunreinigungen (●) mit den Fäzes in Sprague-Dawley Ratten 88

1 Einführung

Polyhalogenierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und -furane (PCDF; in der Summe mit PCDD/F bezeichnet) besitzen selbst keine Anwendbarkeit und gehören doch zu den am intensivsten untersuchten Stoffklassen der letzten Jahrzehnte. In den Brennpunkt des öffentlichen Interesses gerieten sie nach einem Industrieunfall in der norditalienischen Stadt Seveso im Jahre 1976. In einer Anlage der Firma ICMESA für die Produktion des Herbizids 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) kam es zur Überhitzung des Reaktionsgemischs und nachfolgend zu einer Explosion. Dabei wurde eine Wolke von Gas und Partikeln freigesetzt, mit der geschätzte 300 – 2000 g der Substanz 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) auf einer Fläche von etwa 2,8 km² verteilt wurden¹. In der Folge starben Tausende von Haus- und Wildtieren, die Einwohner mußten evakuiert werden, und einige der am stärksten kontaminierten Areale sind weiterhin gesperrt². In den letzten 40 Jahren ereigneten sich weltweit mindestens zehn vergleichbare Unfälle³, doch erst der Unfall von Seveso gab den Anstoß für eine breit angelegte und systematische Beschäftigung mit diesen Substanzen in Politik und Wissenschaft.

Abbildung 1-1 zeigt die chemische Struktur von TCDD, des Vertreters der PCDD/F mit der höchsten Toxizität und, seit dem Seveso-Unfall, auch dem höchsten Bekanntheitsgrad. Insgesamt gibt es 75 sich nur durch Anzahl und Stellung der Chloratome unterscheidende PCDD- und 135 PCDF-Kongenerne. Diese Substanzen werden nur in kleinen Mengen und ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke hergestellt, dennoch sind die im Vergleich zu diesem Produktionsvolumen großen in der Umwelt nachzuweisenden Mengen fast ausschließlich anthropogenen Ursprungs⁴. Sie entstehen u.a. als unerwünschte Nebenprodukte bei der Produktion vieler industriell verwendeter Chemikalien, insbesondere wenn chlorhaltige aromatische Verbindungen als Vorstufen, Zwischen- oder Endprodukte am Produktionsprozeß beteiligt sind. Außerdem entstehen diese Verbindungen unter geeigneten

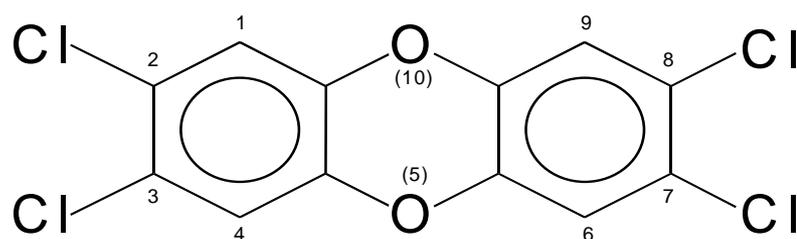


Abbildung 1-1: Struktur von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

Bedingungen bei nahezu allen Verbrennungsprozessen in Anwesenheit von anorganisch oder organisch gebundenem Chlor.

Die oben erwähnten Chemikalien, bei deren Produktion PCDD/F entstehen können, besitzen oder besaßen einen breiten Anwendungsbereich, der von Herbiziden und Fungiziden (z.B. chlorierte Phenole und Phenoxybenzole) und Antiseptika (Hexachlorophen) zu Wärmetauschermedien und Flammhemmern (halogenierte Biphenyle) reicht⁵. Mit dem großflächigen Einsatz dieser Chemikalien wurden lange Zeit auch die PCDD/F in die Umwelt eingetragen. So war 2,4,5,-T Bestandteil des im Vietnamkrieg im Kilotonnen-Maßstab eingesetzten Entlaubungsmittel „Agent Orange“. Wegen der langen Halbwertszeit für die Zersetzung von einigen der PCDD/F im Boden (ca. 10 Jahre für TCDD⁶) werden hohe Konzentrationen noch heute in den betroffenen Regionen nachgewiesen. Metallverarbeitende Betriebe (z.B. Eisenverhüttung, Aluminiumverhüttung), Müllverbrennungsanlagen und die Papierindustrie („Chlorbleiche“) haben weiter zu der ubiquitären Verteilung dieser Verbindungen beigetragen, die heute auch in so abgelegenen Regionen wie der Arktis nachgewiesen werden können^{3,7,8,9}. Nachdem bei vielen industriellen Verfahren in den letzten Jahren der Ausstoß an Dioxinen mit diversen Mitteln verringert wurde, rücken nun Kleinf Feuerungsanlagen, private Hausmüllverbrennung und Brände, z.B. auf Mülldeponien, als Dioxinquellen in den Vordergrund¹⁰.

Die toxikologischen Eigenschaften der PCDD/F sind qualitativ weitgehend identisch, es gibt jedoch große Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkungsstärke. Insbesondere 2,3,7,8-tetrachlor –substituierte Kongenere zeigen hohe Toxizität und werden nur sehr langsam metabolisiert. Da TCDD das Kongener mit der höchsten Toxizität ist, wurde es in vielen Untersuchungen als Modellverbindung für die Gruppe der PCDD/F verwendet. TCDD, dem teratogene, hepatotoxische, neuroendokrine, und immunotoxische Effekte sowie die Auslösung von Verhaltensstörungen und negative Einflüsse auf die Fortpflanzungsfähigkeit in Labor- und Wildtieren nachgewiesen werden konnten, zählt zu den am stärksten toxischen bekannten anthropogenen Substanzen¹¹. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigten diese Wirkungen sich stark spezies- und gewebeabhängig, und auch zwischen gleichen Endpunkten in verschiedenen Stämmen einer Spezies und zwischen verschiedenen Endpunkten eines bestimmten Stammes wurden große Unterschiede hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit gefunden¹. Insbesondere hinsichtlich der akuten Letalität stellt der Mensch eine vergleichsweise resistente Spezies dar, hier ist Chlorakne die einzige eindeutig auf PCDD/F-Exposition zurückzuführende akute gesundheitliche Folge. Epidemiologische Untersuchungen

zu Langzeitfolgen der PCDD/F-Exposition, z.B. in Vietnam-Veteranen, erbrachten teilweise widersprüchliche Resultate, ein eventueller Zusammenhang zwischen PCDD/F-Exposition und einer erhöhten relative Häufigkeit von Krebserkrankungen wird noch immer kontrovers diskutiert¹².

Die weite Verbreitung und hohe Toxizität der PCDD/F hat eine noch andauernde Diskussion in der Öffentlichkeit und bei den zuständigen Behörden über Möglichkeiten der Abschätzung und Minimierung des Risikos für Umwelt und Gesundheit in Gang gesetzt. Nach wie vor bestehen große Unterschiede zwischen den als „sicher“ eingestuften Expositionsszenarien in verschiedenen Ländern, basierend auf unterschiedlichen Modellen der Toxizität und ihrer Übertragung auf den Menschen¹³. Das noch mangelnde Verständnis für viele Aspekte der Wirkung der PCDD/F erlaubt bisher keine eindeutigen Antworten auf die Fragen einer um Gesundheit und Umwelt besorgten Öffentlichkeit. Den Anstoß zu der vorliegenden Arbeit gab der Wunsch, zu einer verbesserten Risikoabschätzung und –minimierung beizutragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde TCDD als Modellsubstanz für das Verhalten der PCDD untersucht, und sein Verhalten in Ratten wird als Modell für Säugetiere allgemein und den Menschen im besonderen herangezogen. Daher liegt das Hauptaugenmerk der folgenden Einführung auf dieser Substanz bzw. den Spezies Ratte und Mensch.

1.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften von TCDD

TCDD ist physikalisch-chemisch stabil und inert. Seine Wasserlöslichkeit ist extrem gering, und die hohe Neigung zur Adsorption an Oberflächen erschwert die Messung. Die zuverlässigsten Angaben liegen im Bereich von 8 – 19 ppt (ng/kg; im folgenden beziehen sich Angaben in ppt stets auf Gew./Gew.)^{14,15}. Die Ergebnisse von Messungen des Octanol:Wasser-Verteilungskoeffizienten liegen zwischen 9×10^5 und 4×10^6 ($\log K_{ow} = 5,95 - 6,64$)^{16,17}. Auch die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ist vergleichsweise gering. In Methanol, Azeton, Chloroform und Benzol fanden sich Löslichkeiten von jeweils 10, 110, 370 bzw. 570 mg/l¹⁸. TCDD ist mit einem Dampfdruck von $1 - 2 \times 10^{-7}$ Pa bei 25 °C extrem schwerflüchtig^{18,19}. TCDD beginnt bei etwa 305 °C zu schmelzen^{20,21}. Sein Siedepunkt konnte bisher nicht bestimmt werden; indirekte Abschätzungen liegen zwischen 421 und 447 °C^{22,23}. Die thermische Stabilität von TCDD ist beachtlich, erst bei Temperaturen oberhalb 800 °C findet vollständige Zersetzung statt^{24,25}.

1.2 Toxizität von TCDD

1.2.1 Mechanismus der Toxizität

Wie weiter unten ausgeführt, bewirkt TCDD eine Vielzahl mikro- und makroskopischer Veränderungen in Zellen, in Versuchstieren und im Menschen, wobei jedoch die für das Auftreten eines bestimmten Endpunktes der Toxizität nötigen Mengen je nach betrachtetem System um mehr als vier Größenordnungen differieren können (z.B. LD₅₀: 2 µg/kg in Meerschweinchen²⁶, >7200 µg/kg in Kuopio-Han-Wistar Ratten²⁷). Man ist noch weit davon entfernt die zugrundeliegenden Mechanismen der Wirkungen von TCDD im einzelnen für die Vielzahl der Endpunkte zu verstehen. Es wird jedoch immer wieder postuliert, daß TCDD seinen Einfluß auf zelluläre Vorgänge über die Wechselwirkung mit einem einzigen zytosolischen Rezeptorprotein und die von diesem Rezeptor vermittelten Prozesse ausübt²⁸.

Die Existenz dieses sogenannten aryl hydrocarbon oder Ah-Rezeptors wurde zuerst im Rahmen von Studien über halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK), wie die PCDD/F, und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), wie 3-Methylcholanthren, postuliert^{29,30}. Ah-Rezeptor-Orthologe wurden in unterschiedlichsten Spezies (z.B. Fisch, Ratte, Mensch) identifiziert, und der Rezeptor wird differentiell in vielen Geweben exprimiert^{31,32}. Der bzw. die endogenen oder natürlichen Liganden dieses Rezeptors sind nach wie vor nicht zweifelsfrei identifiziert. Diskutiert werden Tryptophan und seine Metaboliten³³, Bilirubin und Biliverdin³⁴ sowie aromatische Verbindungen, die mit der Nahrung aufgenommen werden³⁵. Weiterhin gibt es Anhaltspunkte für einen von der Zelle selbst produzierten Liganden, der Teil eines Regulationsmechanismus für die über den Ah-Rezeptor induzierte Monooxygenase Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) ist³⁶.

Alle bisher charakterisierten Liganden, die mit hoher Affinität an den Ah-Rezeptor binden, sind planare, hydrophobe Moleküle. Während die Affinität der PAK meist im hohen nanomolaren bis mikromolaren Bereich liegen, zeigen die HAK gewöhnlich deutlich höhere Affinitäten bis in den pikomolaren Bereich, und dieser Unterschied zeigt eine positive Korrelation mit den beobachteten Unterschieden in der toxischen und biologischen Potenz dieser Verbindungen. Lange Zeit wurde daher eine solche Struktur als Voraussetzung für die Ah-Rezeptor vermittelte Genaktivierung postuliert. Jedoch wurde eine solche Aktivität in letzter Zeit auch für eine große Zahl von Verbindungen ermittelt, die nicht eine dem „klassischen“ Ah-Rezeptor-Liganden entsprechende Struktur besitzen, und welche die Expression der Ah-Rezeptor assoziierten Gene aktivieren können ohne mit hoher Affinität an

den Rezeptor zu binden (keine kompetitive Verdrängung eines hochaffinen Liganden). Die verfügbaren Bindungsstudien legen nahe, daß die Bindungsstelle im Ah-Rezeptor in ihrer Struktur wandelbar ist und damit einer großen Anzahl von Verbindungen den Zutritt zu ermöglichen vermag³⁷.

Der Ah-Rezeptor liegt in der Zelle als Komplex mit zwei Molekülen HSP90 (Heat Shock Protein der Molekülmasse 90 kD) sowie einem Molekül eines bisher nicht identifizierten Proteins der Molekülmasse 43 kD vor. Der Bindung eines Liganden an diesen Komplex folgt die Dissoziation der HSP90 sowie des 43 kD Proteins und anschließend die Assoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes mit einem weiteren Molekül, dem ARNT-Protein (Ah receptor nuclear translocator protein). Dabei erfährt das ARNT-Protein eine Konformationsänderung, wodurch der gesamte Komplex stabilisiert wird. Der ternäre Komplex kann nun in den Zellkern gelangen, wo er spezifisch an bestimmte Nukleinsäuresequenzen (DRE bzw. XRE, dioxin bzw. xenobiotic response element) bindet und die Expression der mit den DRE korrelierten Gene beeinflusst³⁸.

Die Gesamtheit der Gene, in deren Regulation TCDD auf diese Weise eingreift, ist bis heute nicht bekannt. Die große Zahl der bekanntermaßen durch TCDD in ihrer Aktivität veränderten Genprodukte vermittelt jedoch bereits einen Eindruck von dem tiefen Eingriff in die Homöostase der Zelle, den TCDD zu bewirken vermag (für eine Zusammenstellung siehe ³⁷). Eine Reihe der von TCDD verstärkt aktivierten Gene kodiert Proteine, die für den Metabolismus endo- wie exogener Substanzen verantwortlich sind. Hierzu gehören die Monooxygenasen CYP1A1 und CYP1A2 wie auch Glutathion-S-Transferase, DT Diaphorase und UDP-Glucuronosyl-Transferase. Während die verstärkte Produktion dieser metabolisch aktiven Enzyme normalerweise dem Schutz der Zelle vor Fremdstoffen dient, indem sie deren Verstoffwechslung beschleunigt, greift dieser Mechanismus bei TCDD nicht. Obwohl TCDD hochaffin an CYP1A2 bindet, kann dieses Enzym die Verbindung nur sehr langsam metabolisieren³⁹. Bisher ist kein Enzym in Säugetierzellen isoliert worden, welches die Zersetzung des hochstabilen TCDD effektiv katalysieren konnte. Diese Stabilität gegenüber Biotransformation ist, wie oben erwähnt, in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße allen PCDD/F mit mindestens vier Chloratomen an den Positionen 2,3,7 und 8 gemein.

TCDD beschleunigt aber nicht nur den Abbau von Fremdstoffen, sondern auch körpereigene Substanzen können verstärkt metabolisiert werden. So wird beispielsweise das Thyroidhormon Thyroxin (T₄) von UDP-Glucuronosyl-Transferase konjugiert, wonach es

ausgeschieden wird. Die kontinuierliche Erhöhung der Produktion der UDP-Glucuronosyl-Transferase durch TCDD führt dabei zu einer Absenkung der Konzentration von T_4 im Blut von Versuchstieren, worauf deren Hypophyse mit erhöhter Ausschüttung des Thyroid stimulierenden Hormons (TSH) reagieren sollte. Die fortgesetzte Stimulierung der Schilddrüse mit diesem Hormon kann wiederum zur Tumorbildung führen, und stellt tatsächlich einen empfindlichen Endpunkt der Toxizität von TCDD in Osborn-Mendell-Ratten dar¹³.

Die Fähigkeit von TCDD zu einer breiten Aktivierung metabolisch wirksamer Enzyme bei seiner gleichzeitigen Resistenz gegenüber Abbau führt in der Summe zu einer lang anhaltenden Veränderung im Metabolismus der Zelle. Eine Reihe der für TCDD typischen Endpunkte der Toxizität lassen sich in ähnlicher Weise auch dadurch hervorrufen, daß man PAK mit hoher Affinität zum Ah-Rezeptor durch wiederholte Dosierung über lange Zeit kontinuierlich einwirken läßt⁴⁰. Dies verdeutlicht das Zusammenwirken der hohen Affinität von TCDD zum Ah-Rezeptor mit seiner hohen biologischen Persistenz zum Wirkungsspektrum dieser Verbindung.

Die Induktion von CYP1A1 und CYP1A2 ist die am besten untersuchte Folge der Wechselwirkung zwischen Ah-Rezeptor und TCDD. Neben den metabolisch aktiven Enzymen werden aber auch eine ganze Reihe anderer Vorgänge Ah-Rezeptor-abhängig beeinflusst. So wird beispielsweise die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche für Östrogen, Epidermal Growth Factor (EGF) und Glucocorticoide erniedrigt. Transforming Growth Factor (TGF) α und β_1 werden vermindert produziert, die Produktion von TGF β_2 wird erhöht³⁷.

Neben den wohl noch lange nicht in ihrer Gesamtheit charakterisierten Ah-Rezeptor-vermittelten Wirkungen von TCDD gibt es auch Hinweise auf weitere, Ah-Rezeptor-unabhängige Wirkmechanismen⁴¹. Die relative Bedeutung der Ah-Rezeptor-vermittelten und der davon unabhängigen Mechanismen wird seit langem kontrovers diskutiert⁴². Zusammenfassend läßt sich sagen, daß, auch wenn die Genese einzelner Endpunkte in ihren biochemischen Ursachen geklärt sein mag, das Zusammenwirken der vielen verschiedenen Wirkungen von TCDD noch zu wenig erforscht ist, um eine umfassende Beschreibung der zugrundeliegenden Mechanismen der Toxizität von TCDD zu erlauben.

1.2.2 Akute und chronische Aspekte der Toxizität

Die Toxikologie unterscheidet in der Regel zwischen akuten und chronischen Effekten, also Effekten unmittelbar folgend der Verabreichung einer oder weniger hoher Dosen gegenüber Effekten, die nach Verabreichung vieler geringerer Dosen über einen langen Zeitraum auftreten. Diese Unterscheidung ist bei TCDD, wie auch bei anderen Kongeneren, problematisch. In Versuchstieren ist das Auftreten toxischer Effekte, abgesehen von leichten Unterschieden hinsichtlich der Vollständigkeit der Resorption, unabhängig vom Wege der Exposition (orale, peritoneale, und subkutane Dosierung führen zu vergleichbarer Resorption von 50 – 85 % der Dosis; nur intramuskuläre und perkutane Gabe sowie die Resorption von an Partikeln gebundenem TCDD aus der Luft ergibt geringere Bioverfügbarkeit¹¹; siehe hierzu auch 1.3.1) und der Dosierungsrate (z.B. einfache Dosis gegenüber wiederholter täglicher Dosierung). Vielmehr zeigt sich ein direkter Zusammenhang mit der resorbierten Gesamtmenge⁴³. Die Halbwertszeit von TCDD in Ratten beträgt zwischen 12 und 31 Tagen^{11,44,45}. Die bei einer so langsamen Ausscheidung stattfindende Akkumulation der verabreichten Mengen zusammen mit der hohen Bioverfügbarkeit führt zu einer quasi-Unabhängigkeit vom Expositionsszenario. Daher konzentriert sich das Folgende auf Wirkungen, die bei akuter und chronischer Gabe in jeweils ausreichenden Mengen auftreten.

1.2.3 Auszehrungssyndrom (Wasting Syndrom)

Die am meisten beachtete, aber dennoch immer noch nicht ganz in ihrer Pathogenese verstandene toxische Wirkung von TCDD in Säugetieren, nicht aber beim Menschen, besteht in dem sog. Auszehrungssyndrom (engl. wasting syndrom). Charakteristisch ist dabei, daß die Tiere ihre Futtermittelaufnahme reduzieren und stark an Gewicht verlieren, bis nach 2 - 5 Wochen und einem Gewichtsverlust von ca. 40 % bei totaler Aufzehrung der Speicherfette der Tod eintritt. Die gastrointestinale Absorption von Nährstoffen wird durch TCDD nur geringfügig beeinflusst und kann als Auslöser ausgeschlossen werden¹. Vielmehr gibt es Hinweise darauf, daß TCDD diese Wirkung erreicht, indem es den „Sollwert“ des Körpergewichts reduziert, den die Tiere durch Regulierung ihrer Futtereinnahme zu halten bzw. zu erreichen suchen⁴⁶. Die hormonelle Steuerung der Futtermittelaufnahme ist ausgesprochen kompliziert, und der Einfluß von TCDD hierauf nicht im Detail geklärt.

Die für das Auslösen des Auszehrungssyndroms notwendige Dosis ist, wie oben erwähnt, stark speziesabhängig und wird darüber hinaus leicht vom Expositionsweg beeinflusst. In Sprague-Dawley Ratten beträgt die LD₅₀ beispielsweise 43 µg/kg nach oraler⁴⁷, 60 µg/kg nach

intraperitonealer⁴⁸ und 25 µg/kg nach intravenöser Administration⁴⁹. Diese Unterschiede beruhen vermutlich auf unvollständiger Resorption, und der nach intravenöser Administration ermittelte Wert sollte in allen Spezies als Referenz gesehen werden⁴⁹.

1.2.4 Thymusatrophie

Der Thymus besteht zum größten Teil aus lymphoidem Gewebe und ist der Ort der Reifung von T-Zellen. Nichtletale Dosen von TCDD rufen in allen untersuchten Tierarten Thymusatrophie hervor. Diese ist charakterisiert durch eine ausgeprägte Depletion an Lymphozyten im Cortex des Thymus⁵⁰. Der Thymus spielt eine untergeordnete Rolle im Immunsystem erwachsener Säuger, ist jedoch kritisch für die normale Entwicklung des Immunsystems nach der Geburt⁵¹. Tatsächlich gibt es keine Korrelation zwischen Thymusatrophie und Veränderungen des Immunstatus in TCDD-behandelten erwachsenen Mäusen oder Ratten^{52,53}. Dahingegen sind Neugeborene und Jungtiere sensitiver gegenüber Thymusatrophie nach TCDD-Exposition, und die Behandlung mit TCDD führt bei diesen Tieren zu einer dosisabhängigen Immunsuppression^{54,55}.

1.2.5 Chlorakne

Chlorakne ist eine schwere Form zystischer Akne, gekennzeichnet von hyperplastischen und hyperkeratotischen Veränderungen der Haut und Abweichungen der Pigmentierung, die soweit bekannt nur durch HAK-Exposition, sowohl systemisch als auch dermal, ausgelöst wird. Die Keratinisierung der Talg-produzierenden Zellen führt zur Bildung eines Keratinhaltigen, harten Talgs, der die ausführenden Gänge der Talgdrüsen verstopft. Es kommt zum Platzen der Drüsen und dem Auftreten von Mitessern und Pusteln, die sich entzünden und eitern können⁵⁶. Chlorakne wurde bei Menschen, Affen, haarlosen Mäusen und an Kaninchenohren beobachtet, wo sie nach Expositionen mit hohen Dosen der HAK auftritt. Die Diagnose ist insbesondere bei Heranwachsenden oft schwierig und muß unter Heranziehung aller bekannten Faktoren, wie Alter, Expositionsverlauf, etc., geschehen. Dennoch war sie in einigen Fällen ein nützlicher Indikator der Exposition mit TCDD⁴³.

1.2.6 Hepatotoxizität

Hepatotoxizität wird speziesübergreifend beobachtet, dennoch ist das Ausmaß der Symptome stark speziesabhängig. Veränderungen der Leber sind vermutlich ursächlich an der Letalität von TCDD in Ratten und Kaninchen beteiligt, wohingegen sie bei Meerschweinchen und Hamstern eine untergeordnete Rolle spielen. Hepatomegalie, hervorgerufen durch Hyperplasie

und Hypertrophie von parenchymalen Zellen, wird bei den meisten Spezies beobachtet. In Ratten werden außerdem degenerative und nekrotische Läsionen, begleitet von der Infiltration durch Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten, dem Auftreten von multinukleierten vergrößerten Hepatozyten und intrazytoplasmatischen Fetttröpfchen, sowie erhöhter Konzentrationen von Markern für mitotische Aktivität, beobachtet. Assoziiert mit mikrosomaler Enzyminduktion findet man eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums, und die Serumkonzentrationen einiger typischer Indikatoren für Leberschädigungen sind erhöht⁴³. Beim Menschen wurde eine Beeinträchtigung der Leberfunktion in einigen Fällen kurz nach der Aufnahme hoher Dosen beobachtet⁵⁷.

1.2.7 Immuntoxizität

TCDD zeigt eindeutig immuntoxische Wirkung in Versuchstieren, und diese ist in den letzten Jahren eingehend studiert worden. Ein klar umrissenes Bild in Form eines TCDD-induzierten Immuntoxizitätssyndroms hat sich dabei jedoch nicht ergeben. Die Spezies, deren Immunsystem am empfindlichsten auf TCDD-Exposition reagiert, ist dabei die Maus. Eine einzelne Dosis von 10 ng/kg Körpergewicht erhöhte die Mortalität in Mäusen nach Inokulation mit Influenza-Viren signifikant; dies entspricht der niedrigsten Dosis, bei der ein toxischer Effekt von TCDD beobachtet wurde⁵⁸. Auch gegen andere Pathogene zeigen TCDD-behandelte Mäuse eine konstant verminderte Resistenz (z.B. ^{53,55}). TCDD-exponierte Kinder aus Seveso (Italien), zeigten hingegen nur geringfügige und vorübergehende Änderungen nichtspezifischer immunologischer Parameter⁵⁹. In Sprague-Dawley Ratten konnte gezeigt werden, daß die zelluläre Immunantwort durch niedrige Dosen von TCDD zunächst aktiviert, mit weiter steigender Dosis dagegen zunehmend supprimiert wird⁶⁰. Insgesamt zeigten sich die immuntoxischen Effekte von TCDD stark abhängig von der betrachteten Spezies, Dosis, dem betrachteten Antigen sowie dem Expositionsszenario, und für den Menschen läßt sich zum gegebenen Zeitpunkt nicht eindeutig sagen, ob TCDD immunsuppressiv oder -aktivierend wirkt.

1.2.8 Schädigungen der Fortpflanzungsorgane

TCDD reduziert speziesübergreifend Fruchtbarkeit, Anzahl der Nachkommen pro Wurf, und Gewicht des Uterus, und führt zu erniedrigter Spermienzahl, Veränderungen der Morphologie der Hoden und Abnahme des Gewichts der Hoden^{61,62,63,64,65}. In männlichen Arbeitern aus einer Produktionsanlage für 2,4,5-T wurden erhöhte Serumwerte für gonadotrope Hormone (Follikel stimulierendes Hormon, FSH; Luteinisierendes Hormon, LH) sowie erniedrigte

Serum-Testosteronkonzentrationen gefunden, wobei die Erhöhung bzw. Erniedrigung dieser Parameter mit der Serumkonzentration von TCDD korrelierten⁶⁶. Ähnliche Befunde treten bei Versuchstieren erst ab einer Dosis, die bereits zum Einsetzen der Symptome des Auszehrungssyndroms führen, auf⁶⁷. Hier scheint der Mensch empfindlicher auf TCDD zu reagieren als viele andere Säugerspezies. Die Abnahme der Spermienzahl in Männern aller Gesellschaftsschichten von ca. 50 % über die letzten 30 Jahre ist mit der ubiquitären Belastung der Umwelt mit TCDD in Verbindung gebracht worden, diese Interpretation der Ergebnisse der zugrundeliegenden Studie sind aber seither verschiedentlich in Zweifel gezogen worden^{43,68,69}. Die Mechanismen hinter diesen Veränderungen sind bisher nicht im Detail bekannt, diskutiert werden jedoch sowohl eine erhöhte Metabolisierung der Hormone als auch die Reduzierung der Zahl der Rezeptoren für die Hormone⁴³.

1.2.9 Teratogene Effekte und Einflüsse auf Wachstum und Entwicklung

TCDD wirkt in vielen Spezies teratogen und schädigend auf Wachstum und Entwicklung⁷⁰. Bereits bei einer Dosis, die zu keinen meßbaren Effekten bei der Mutter führten, kam es zur Entwicklung von Gaumenspalten und Hydronephrosen in Mäusen sowie signifikanten Veränderungen der Sexualorgane und des Sexualverhaltens bei den männlichen Nachkommen in Ratten und Hamstern^{71,72,73}. Bei den Kindern der einer Mischung aus HAK ausgesetzten Müttern aus Yusho, Japan, trat eine Gruppe von Symptomen, in ihrer Gesamtheit mit Ektodermaler Dysplasie bezeichnet, auf, die zumindest teilweise auf die Wirkung des in der Mischung enthaltenen TCDD zurückgeführt wurden^{74,43}. Aufgrund vorläufiger Untersuchungen kam die WHO zu dem Schluß, daß die Schädigungen durch plazentalen Transfer, nicht jedoch durch postnatale Übertragung mit der Muttermilch, in der TCDD angereichert vorliegt, ausgelöst werden. Dies veranlaßte die WHO zu ihrer Empfehlung an Mütter, trotz der erhöhten TCDD-Konzentration in der Muttermilch ihre Kinder zu stillen, die sie im Zusammenhang mit der kürzlich erfolgten Neufestsetzung der tolerierbaren täglichen Dosis aussprach⁵⁹.

1.2.10 Kanzerogene Wirkung

TCDD ist ein potentes Karzinogen in Versuchstieren: 19 Studien in vier verschiedenen Spezies, in denen TCDD Krebs in mehreren Organen/Geweben in beiden Geschlechtern auslöste, belegen dies eindrucksvoll⁷⁵. Seine Wirkungsstärke im Menschen scheint dabei geringer zu sein, das relative Risiko für alle Tumorarten bei den am höchsten exponierten Subkohorten lag bei etwa 1,4⁵⁹. TCDD ist nicht mutagen und bildet keine DNA-Addukte^{76,77},

zeigt aber stark tumorpromovierende Wirkung⁷⁸. Ob man für diese Wirkung einen unteren Schwellenwert ansetzen kann, und wo dieser anzusetzen wäre, wird immer noch diskutiert^{43,59}.

1.3 Toxikokinetik von TCDD

1.3.1 Resorption

Die Resorption von TCDD und verwandten Kongeneren aus dem gastrointestinalen Trakt ist variabel, unvollständig, abhängig vom Vehikel und Kongener-spezifisch. Spezies-spezifische Unterschiede in der Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt wurden bisher nicht gefunden. Die verfügbaren Daten deuten auf die Molekülgröße und die Löslichkeit als begrenzende Faktoren für die Aufnahme aus dem Darmlumen, insbesondere der höher chlorierten Kongeneren, hin. Dies manifestiert sich in einer signifikant niedrigeren Aufnahme von Hepta- und Octa-CDD. Über die Mechanismen der Aufnahme sind nur unzureichend erforscht¹¹. Wegen der extremen Schwerlöslichkeit in Wasser sind Resorption und Transport jedoch nur in Assoziation mit Proteinen und/oder Lipiden denkbar⁷⁹.

Bei oraler Gabe von in Speiseöl gelöstem TCDD an die Ratte, die Maus, den Hamster und, in einem Selbstversuch an einem Individuum, den Menschen wurden dosisunabhängig hohe Aufnahmeraten von 70 – 90 % festgestellt^{45,80,81,82,83,84}. Diese ließen sich in Mäusen durch Vorbehandlung mit TCDD noch weiter steigern⁸². Geringere Aufnahmeraten, die in einigen Studien berichtet wurden, lassen sich in der Mehrzahl auf das experimentelle Design zurückführen¹¹. Intraperitoneale und intravenöse Verabreichung ergaben im Wesentlichen ähnliche Verteilungen wie die orale Gabe in Experimenten mit TCDD alleine. Signifikante Unterschiede waren jedoch bei der Verabreichung von Kongeneren-Gemischen zu beobachten. Die Aufnahme nach subkutaner Injektion ist stark vom Lösungsmittel abhängig. Bei der Verwendung einer Mischung von DMSO und Toluol im Verhältnis 1:2 ist die Resorption jedoch der bei oraler Gabe vergleichbar⁸⁵. Intramuskulärer und perkutaner Eintrag hingegen resultierten in sehr geringen Aufnahmeraten. Für eine umfassende Diskussion sei auf die Literatur verwiesen¹¹.

1.3.2 Verteilung von TCDD auf Organe und Gewebe

Unabhängig vom Expositionsweg geschieht die Verteilung von in den Körper aufgenommenen Substanzen größtenteils über das Blut. Sehr lipophile Verbindungen wie die PCDD oder polychlorierten Biphenyle (PCB) werden im Blut größtenteils in Assoziation mit

Proteinen oder Lipoproteinen gefunden^{86,87,88,89}. Die Bindung körperfremder, hochlipophiler Substanzen an diese Proteine ist dabei in den meisten Fällen nicht-spezifisch. Ein in menschlichen Leukozyten aufgefundenenes, TCDD spezifisch bindendes Protein ist im Mengenvergleich nicht signifikant. Dieses Protein wurde von den Autoren als im Blut befindliche Form des Ah-Rezeptors identifiziert⁹⁰. Weiter wurde eine spezifische Bindung zwischen TCDD und Präalbumin postuliert, welches im Blut jedoch ebenfalls nur in sehr geringen Mengen vorkommt⁹¹.

Bei der Untersuchung der Verteilung von TCDD in menschlichem Blut wurden 80 % mit Lipoproteinen, 15 % mit Proteinen und 5 % mit den zellulären Bestandteilen des Blutes assoziiert gefunden⁸⁸. Diese Studie ging jedoch nicht näher auf die Zusammensetzung der Blutfraktionen oder die Bindungseigenschaften von TCDD an Lipoproteinen und Proteinen ein. Allgemein ist wenig über die nicht-spezifische Bindung von TCDD an die Komponenten des Blutes bekannt. Eine strukturelle Selektivität wie im Fall der P450-Enzyme ist für die Bindung an Albumin oder Lipoproteine nicht zu erwarten. Ausgehend von seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie z.B. der denen der PCB ($\log(K_{OW}) = 6,7 - 7,7^{93}$) vergleichbare Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, kann jedoch angenommen werden, daß es sich hinsichtlich seiner Bindungs- und Transporteigenschaften in Blut ähnlich wie diese besser untersuchten hochlipophilen Substanzen verhält. Beispielsweise wurden die Dissoziationskonstanten für die Bindung von 2,4,5,2',4',5'-Hexachlorbiphenyl an Albumin und Lipoprotein niedriger Dichte (LDL) zu $1,9 \times 10^{-6}$ bzw. $7,2 \times 10^{-6}$ für 1 bzw. 30 Bindungsstellen/mol Substanz bestimmt⁹². Die relative Verfügbarkeit dieser Bindungsstellen im Plasma beträgt ca. 10:1. Damit wird die Verschiebung der adsorbierten Konzentration von der Lipidphase zur Albuminfraktion verständlich, die nach einer Injektion von PCB in Emulphor auftrat⁸⁷. Andere, im Körper häufiger vertretene Proteine besitzen vermutlich geringere Bindungsaffinitäten als Albumin, dessen physiologische Funktion in dem Transport lipophiler Substanzen (Fettsäuren, Bilirubin) besteht.

Ließe sich die Bindungsaffinität von LDL auf die Bindung im Fettgewebe übertragen, stünde dieses mit seiner wesentlich höheren Masse in alleiniger Konkurrenz um die Bindung der PCB. Tatsächlich finden sich jedoch nach intravenöser Injektion von PCB in Ratten zunächst 50% der Dosis in der Leber. Dies kann vermutlich auf die schnelle Aufnahme von Abbauprodukten von Chylomikronen und LDL in der Leber zurückgeführt werden. Im Verlauf von 6 Wochen findet aber ein Umverteilungsprozeß statt, an dessen Ende 75 % der Dosis im Körperfett gefunden werden. Dieser Anteil verändert sich im weiteren Verlauf nicht

mehr, die Substanz erreicht im Fettgewebe eine ihrer Löslichkeit entsprechende Gleichgewichtskonzentration welche einer irreversiblen Bindung an Protein gleichkommt. In Ratten, in denen die absolute Masse an Fettgewebe durch Diät konstant gehalten wird, fällt dieser Anteil nach 280 Tagen von anfänglich ebenfalls 70 % auf 38 % ab. Die Autoren dieser Untersuchung folgerten daraus, daß die scheinbare irreversible Bindung im Fettgewebe auf der fehlenden Mobilisierung des einmal angesammelten Fettes aufgrund stets ausreichender Versorgung mit Triglyzeriden aus der Nahrung beruht⁹³.

Ebenso wie bei PCB lassen sich 8 h nach intravenöser Injektion von TCDD in Emulsion zunächst ca. 50 % in der Leber von Ratten nachweisen. 15 % der Dosis scheinen sich dabei anfangs auf Lunge und Milz zu verteilen. Dieser Anteil wird jedoch innerhalb 24 h auf die Leber und das Fettgewebe verteilt. Die Fetttropfchen der Emulsion sind vermutlich kurz nach der Dosierung zu groß, um die feinen Kapillarsysteme dieser Organe passieren zu können⁴⁹.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme von TCDD nach oraler Dosierung unter Umgehung der Leber durch den Transport mit den Chylomikronen im Lymphsystem erfolgt⁷⁹. Die anschließende Abnahme der Konzentration im Blut wird charakterisiert durch zwei Halbwertszeiten (0,81 min, 30 min) die in etwa den Halbwertszeiten der Aufnahme von Chylomikronen im peripheren Gewebe und der ihrer Abbauprodukte in der Leber entsprechen^{49,94}. Chylomikronen können die Kapillargefäße in Lunge und Milz ungehindert passieren, eine anfängliche Stauung in diesen Geweben trat nicht auf. Dies erlaubte die Beobachtung, daß die Konzentration im Fettgewebe zwar ebenfalls innerhalb der ersten 24 h zunahm, die Leber jedoch schon nach 2 h, entsprechend vier Halbwertszeiten der langsameren Komponente der Abnahme im Blut, die maximale Konzentration erreicht hatte und bereits wieder mit der Ausscheidung begann. Dies könnte durch Verstoffwechslung und Ausscheidung in den Darm oder durch Ausscheidung in den in der Leber synthetisierten Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) zusammen mit Triglyzeriden erklärt werden. Diese werden anschließend von Muskeln und Fettgeweben aufgenommen, wobei in den Muskeln im Gegensatz zum Fett kein geeignetes Milieu für die Lagerung vorhanden ist. Der beobachtete zeitliche Verlauf der Aufnahme von TCDD im Fettgewebe (0-2 h: Zunahme; 2-8 h: Abnahme; 8-24 h: Zunahme) findet in der primären Aufnahme aus Chylomikronen und späteren sekundären Aufnahme aus von der Leber ausgeschiedenen VLDL eine mögliche Erklärung⁷⁹.

In den ersten 24–48 h nach der Exposition zeigt die Verteilung von TCDD soweit Ähnlichkeit mit der von PCB. Im Unterschied zu den PCB ist der weitere Verlauf der Verteilung jedoch unmittelbar von der Dosis abhängig. Bei der Untersuchung der Verteilung verschiedener subkutaner Dosen von TCDD (3 – 3000 ng/kg Körpergewicht) in Wistar Ratten zeigte sich ein klarer Anstieg des Verhältnisses der TCDD-Konzentrationen im Fettgewebe und in der Leber einhergehend mit der zunehmenden Induktion von CYP1A2⁸⁵. Die hohe Affinität von CYP1A2 sowie die Zunahme des in der Leber befindlichen Fettes (viele Versuchstierspezies entwickeln dosisabhängig eine Fettleber) sind angeführt worden um dieses Phänomen zu erklären. Die verfügbaren Informationen ergeben jedoch kein eindeutiges Bild¹¹. Jedenfalls tritt diese Umverteilung nur auf, wenn die Veränderungen in der Leber einsetzen, bevor die Verteilung des TCDD auf die lipophilen Kompartimente abgeschlossen ist. Eine spätere Umverteilung von TCDD vom Fettgewebe zur Leber findet nur als Folge einer Abnahme des Fettgewebes statt⁴⁹.

Das Auszehrungssyndrom ist, wie oben erwähnt, mit einem vollständigen Verlust der Speicherfette verbunden, was sich in einem veränderten Verteilungsverhalten der Substanz nach einer letalen gegenüber einer nicht-letalen Dosis bemerkbar macht. Durch Mobilisierung von anfangs im Fettgewebe abgelagerten TCDD beginnt 4-5 Tage nach der Dosierung die Konzentration in allen Geweben anzusteigen. Die Ausscheidung mit den Fäzes erhöht sich dabei jedoch nur unmerklich. Dies steht im Einklang mit der von anderen Autoren postulierten Kontrolle der Ausscheidung mit der Verstoffwechslung der PCDD⁹⁵. Dies ließe sich jedoch auch mit der Abnahme des Fäzes-Flusses erklären⁴⁹.

Im Vergleich zur Gesamtdosis geringe Mengen, aber dennoch relativ hohe Konzentrationen finden sich noch in einigen anderen Organen, in denen eine toxische Wirkung von TCDD beobachtet werden kann. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang Braunfett, Nebenniere, Schilddrüse und Pankreas. Geringe Konzentrationen, aber aufgrund des hohen Anteils am Körpergewicht merkliche Anteile der Dosis, binden in den Muskeln und der Haut. Dies ist insbesondere deswegen überraschend, da die Haut mit der Entwicklung von Chlorakne das primäre Ziel der akuten Toxizität von TCDD im Menschen darstellt. Wahrscheinlich ist dieses Symptom ein Sekundäreffekt zur systemischen Wirkung von TCDD⁴⁹. Trotz des hohen Lipidgehalts im Gehirn finden sich in diesem Organ nur vernachlässigbare Mengen. Mit einem Molekulargewicht von 322 ist TCDD noch nicht in seiner Diffusion durch die Blut-Gehirn-Schranke gehindert, wie auch durch Injektion einer Lösung von TCDD direkt ins Gehirn und dem anschließenden Nachweis einer Konzentrationszunahme in der Leber gezeigt

werden konnte⁹⁶. Dieser Umstand wird daher vielmehr der höheren Polarität der im Gehirn dominierenden Phospholipide im Vergleich zu den Neutralfetten der Fettgewebe zugeschrieben⁴⁹.

1.3.3 Ausscheidung von TCDD

Die Ausscheidung von TCDD erfolgt zum größten Teil mit den Fäzes, das Mengenverhältnis von TCDD in Fäzes zu TCDD in Urin (einschließlich Metaboliten) ist in den meisten Spezies >3 , >10 in Ratten und Meerschweinchen¹¹. Im Urin finden sich nahezu ausschließlich Metaboliten, in den Fäzes hingegen vergleichsweise hohe Anteile an nicht-metabolisiertem TCDD (10 – 80 %) ¹¹. Daß enterohepatische Zirkulation für die Ausscheidung der Metaboliten von TCDD keine Rolle spielt, wurde für Ratten anhand eines Vergleichs der biliären und fäkalen Konzentrationen dieser Metabolite gezeigt⁹⁷.

Die experimentell bestimmten Halbwertszeiten für die Elimination von TCDD in Ratten lagen im Bereich zwischen 11 und 31 Tagen, die einzige kontrollierte Studie in Menschen ergab eine Halbwertszeit von 5,8 Jahren¹¹. Dieser Studie konnte jedoch notwendigerweise die Ausscheidung nur über einen Bruchteil einer Halbwertszeit verfolgen, neuere Erkenntnisse deuten auf eine noch deutlich längere terminale Halbwertszeit der Ausscheidung hin (7 - 10 Jahre⁹⁸).

Es wurde vorgeschlagen, daß der Metabolismus von TCDD in der Leber den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Ausscheidung mit den Fäzes darstellt⁹⁹. Eine weitere Studie kam zu dem Schluß, daß dies nur bei niedrigeren Dosen der Fall ist, während bei höheren, nicht-letalen Dosen größere Mengen unmetabolisiertes TCDD direkt durch die Darmwand ausgeschieden werden, und bei letalen Dosen durch die abnehmende Nahrungsaufnahme die ausgeschiedene Menge Fäzes limitierend wirkt⁴⁹.

In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls diskutiert, ob TCDD in der Lage ist, seinen eigenen Metabolismus zu induzieren. Die in der Literatur wiedergegebenen Ergebnisse hierzu sind widersprüchlich^{1,11}. Isolierte Hepatozyten aus mit TCDD vorbehandelten Ratten und Hamstern waren in der Lage, TCDD schneller zu metabolisieren als solche aus nicht-vorbehandelten Tieren. Dies gelang jedoch nur bei Substratkonzentrationen $>0,1 \mu\text{M}$. Dies entspricht einem Vielfachen der nach Gabe einer letalen Dosis in der Leber von Ratten gefundenen Konzentration^{100,101}. In zwei weiteren Studien wurde einmal innerhalb von 8 h nach Administration von TCDD kein Unterschied, andererseits innerhalb von 72 h ein kleiner

aber signifikanter Unterschied in der biliären Elimination von TCDD durch mit TCDD vorbehandelten gegenüber nicht vorbehandelten Ratten festgestellt^{95,102}.

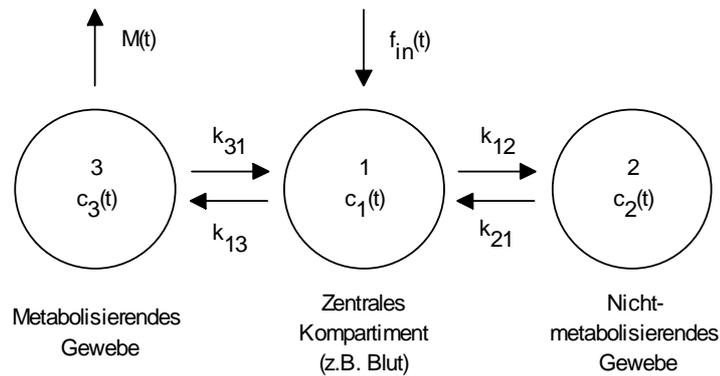
1.4 Experimentelle Bestimmung von Parametern für die Modellierung des toxikokinetischen Verhaltens von TCDD

1.4.1 Einführung in pharmakokinetische Modelle auf physiologischer Basis (physiologically based pharmacokinetic oder PBPK-Modelle)

Allgemein wird deutlich, daß trotz der intensiven Forschung in den letzten Jahrzehnten der Wissenstand über die Wirkmechanismen, aber auch über Transport und Verteilung von TCDD und seinen Kongeneren, noch lückenhaft ist. Die großen Speziesunterschiede in der Dosisabhängigkeit der meisten Endpunkte der Toxizität zusammen mit der mangelnden Kenntnis der für Transport und Verteilung ausschlag gebenden Parameter erschweren die Übertragung der Ergebnisse zwischen den Spezies, insbesondere auf den Menschen¹³⁶. Toxikologische Untersuchungen in Versuchstieren sind zeitaufwendig, kostspielig und zudem in der breiten Öffentlichkeit unpopulär. Letzteres um so mehr, je näher die Versuchstierspezies dem Menschen phylogenetisch steht. Dennoch verlangt gerade diese breite Öffentlichkeit eine wissenschaftlich fundierte Aussage über die gesundheitlichen Risiken, die mit einer gegebenen Exposition verbunden sind, und die Festlegung entsprechender Grenzwerte. Dem gegenüber stehen die Interessen und Bedürfnisse der Industrie, für welche die Vermeidung oder Reduzierung von Emissionen prohibitiv teuer sein kann. Es wurden auch von den verschiedenen behördlichen Stellen der industrialisierten Nationen Grenzwerte oder Grenzwertempfehlungen auf der Basis der verfügbaren Erkenntnisse erlassen. Diese betonen jedoch immer wieder die Vorläufigkeit dieser Grenzwerte, und daß eine stetige Überprüfung anhand der neuesten Erkenntnisse vonnöten sei^{10,13,59}.

Physiologisch orientierte pharmakokinetische Modelle sind heute ein anerkanntes Werkzeug in der Ermittlung von Risikofaktoren im Zusammenhang mit umweltrelevanten Substanzen. Ihre Eignung zur Vorhersage der Verteilung von Fremdstoffen im Körper von Säugetieren und die nutzbringende Anwendung dieser Eigenschaft konnte für verschiedene Chemikalien gezeigt werden^{103,104,105}. Außerdem können diese Modelle verwendet werden, um Hypothesen zu Wirkungsmechanismen und/oder zu möglichen Verteilungswegen sowohl pharmakologisch aktiver wie auch gesundheitsschädlicher Verbindungen zu prüfen^{133,134,106}.

a)



b)

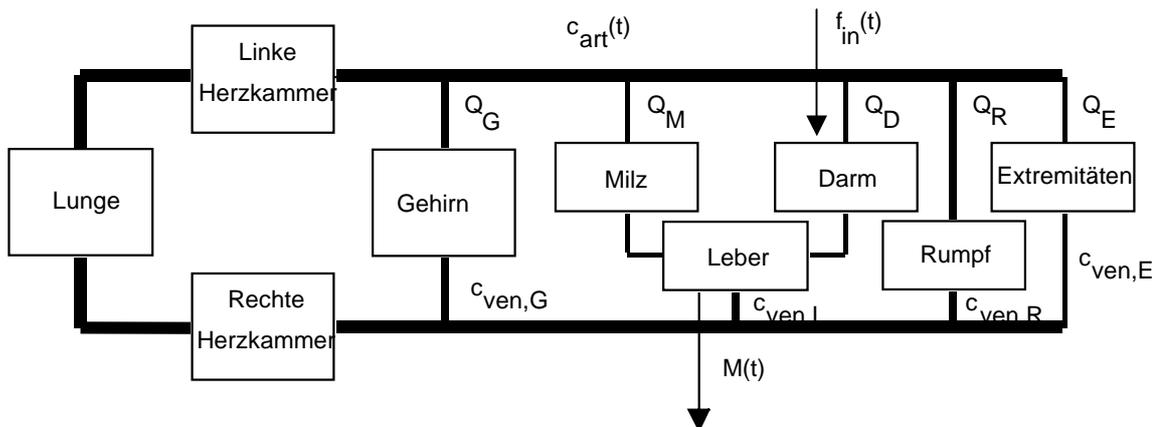


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Kompartimentstruktur a) eines klassischen pharmakokinetischen Modells, und b) eines Modells basierend auf physiologischen und anatomischen Gegebenheiten (PBPK-Modell) (c_i Konzentration eines Stoffes im i -ten Kompartiment, $c_{art}(t)$ Konzentration des Stoffes im arteriellen Blut, $c_{ven,i}$ Konzentration des Stoffes im venösen Blut aus dem i -ten Kompartiment, Q_i Blutfluß in das i -te Kompartiment, k_{ij} Geschwindigkeitskonstante des Stofftransports von Kompartiment i in Kompartiment j , $f_{in}(t)$ Funktion, Dosierung beschreibend, $M(t)$ Metabolismusterm; aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle in PBPK-Modellen verwendeten Parameter angegeben)

Die frühesten pharmakokinetischen Modelle wurden zur Dosisoptimierung für pharmazeutische Produkte angewendet und waren wenig mehr als Kurvenanpassungen an im Blut von Versuchstieren gemessenen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Dosis. Dies entspricht der Behandlung des Körpers als ein Reservoir oder Kompartiment mit je einem Zufluß und einem Abfluß. Diese Betrachtungsweise erbringt jedoch nur in solchen Fällen sinnvolle Ergebnisse, wo die Einstellung der Konzentrationsgleichgewichte zwischen Blut und den Geweben sehr viel schneller ist als der Transport mit dem Blut und die an Metabolismus und Elimination beteiligten Prozesse. Um die Behandlung von Substanzen zu ermöglichen, für welche diese Voraussetzung nicht erfüllt ist, wurden weitere Kompartimente je nach Notwendigkeit hinzugefügt („Klassisches pharmakokinetisches Modell“). Diese

besaßen zunächst keine physiologische Entsprechung, doch bereits 1937 wurde von Teorell vorgeschlagen, die Dimensionierung der Kompartimente und den Transport zwischen Kompartimenten den anatomischen und physiologischen Gegebenheiten anzupassen¹⁰⁷.

Die Lösung der großen Zahl von Differentialgleichungen, die ein solches System mit sich bringt, wurde jedoch erst mit der Einführung entsprechend schneller Computer möglich, und so datieren die ersten echten Anwendungen dieses Prinzips aus den 60er Jahren dieses Jahrhunderts¹⁰⁸. Abbildung 1-2 zeigt je ein Beispiel für die Kompartimentstruktur in einem klassischen Modell und einem PBPK-Modell für die orale Dosierung einer lipophilen Substanz, die nur durch Metabolismus in der Leber eliminiert wird.

Ein PBPK-Modell besteht aus einer Reihe von Differentialgleichungen, welche die Massenbilanz der betrachteten Substanz beim Transport mit dem Blut durch die Gewebe als Funktion der Konzentrationen der Substanz in den Kompartimenten beschreiben. Diese erhalten die allgemeine Form¹⁰⁹

$$V_i \frac{d[c_i(t)]}{d[t]} = Q_i [c_{\text{art}}(t) - c_{\text{ven},i}(t)] - M_i(t) \quad \text{Gleichung 1}$$

wobei V_i für das Volumen des i -ten Organs, Q_i für den Blutfluß zum i -ten Gewebe, $c_i(t)$ für die Konzentration des betrachteten Stoffes im i -ten Gewebe, $c_{\text{art}}(t)$ für die Konzentration des Stoffes im arteriellen Blut, $c_{\text{ven},i}(t)$ für die Konzentration des Stoffes im venösen Blut des i -ten Gewebes und $M_i(t)$ für die vom i -ten Gewebe metabolisierte bzw. eliminierte Menge stehen. Streng genommen ist auch $c_{\text{art}}(t)$ für einzelne Organe spezifisch, jedoch kann der Verlust von gelöster Substanz auf den unterschiedlich langen Wegen vom Herzen zu den Organen meist vernachlässigt werden. Ebenso werden Unterschiede zwischen ein- und ausgehendem Blutfluß $Q_{i,\text{art}}$ bzw. $Q_{i,\text{ven}}$, z.B. durch Verdunstung an der Hautoberfläche, in diesem Ansatz vernachlässigt.

V_i und Q_i für Ratten, Mäuse und Menschen finden sich in der Literatur tabellarisiert¹¹⁰. $c_{\text{art}}(t)$ und $c_i(t)$ werden meist für einige Zeitpunkte t experimentell bestimmt. $c_{\text{ven},i}(t)$ ist jedoch in der Regel nur schwierig zu messen. Daher wird der Term $(c_{\text{art}}(t) - c_{\text{ven},i}(t))$ oft durch einen Ausdruck ersetzt, welcher die Aufnahme der Substanz in das i -te Gewebe physikalisch beschreibt. Der am häufigsten verwendete Formalismus besteht in der Einführung von Verteilungskoeffizienten zwischen Blut und dem i -ten Gewebe $R_{\text{Blut},i}$, für die gilt $c_{i,\text{GG}}(t) = R_{\text{Blut},i} c_{\text{ven},i,\text{GG}}(t)$, oder

$$R_{\text{Blut},i} = \frac{c_{i,\text{GG}}(t)}{c_{\text{ven},i,\text{GG}}(t)} \quad \text{Gleichung 2}$$

wobei $c_{i,\text{GG}}(t)$ und $c_{\text{ven},i,\text{GG}}(t)$ für die Konzentration im i -ten Gewebe bzw. im venösen Blut des i -ten Gewebes zur Zeit t im thermodynamischen Gleichgewicht stehen. Die Anwendung dieses Formalismus setzt die Annahme voraus, daß die Einstellung des Konzentrationsgleichgewichts zwischen Gewebe und Blut sehr viel schneller ist als der Blutfluß, und sich damit das Gewebe stets im Gleichgewicht mit dem venösen Blut befindet (Blutfluß-limitiert). Es gilt dann $c_{\text{art}}(t) - c_{\text{ven},i}(t) = c_{\text{art}}(t) - (c_i(t)/R_{\text{Blut},i})$.

Um auch Fälle modellieren zu können, in denen diese Voraussetzung nicht gilt, können Extraktionskoeffizienten ε_i eingeführt werden¹¹¹. Diese geben den Bruchteil der im Blut enthaltenen Konzentration an, der bei der einfachen Passage eines Organs für den Stofftransport in das i -te Gewebe zur Verfügung steht. Während Verteilungskoeffizienten das Konzentrationsverhalten einer Substanz zwischen Organen und Blut im Gleichgewicht darstellen, können Extraktionskoeffizienten zur Beschreibung der Dynamik des Austauschprozesses dienen. Sowohl unvollkommene Gleichgewichtseinstellung aufgrund zu kurzer Verweilzeiten des Blutes im Gewebe wie auch Sequestrierung durch aktive Transportvorgänge lassen sich durch die Einführung dieses Parameters modellieren. Dies kann insbesondere für stark proteingebundene Substanzen, die nur langsam von ihrem Träger dissoziieren, und solche mit geringer Löslichkeit in der wäßrigen Matrix gelten.

Damit erhält man

$$V_i \frac{d[c_i(t)]}{d[t]} = \varepsilon_i Q_i \left[c_{\text{art}}(t) - \frac{c_i(t)}{R_{\text{Blut},i}} \right] - M_i(t) \quad \text{Gleichung 3}$$

Um ein PBPK-Modell zu berechnen, werden für alle Gewebe i eine Gleichung entsprechend Gleichung 3 aufgestellt. Dabei wird man Gewebe, die sich gegenüber der betrachteten Substanz ähnlich verhalten, zur Vereinfachung gruppieren (z.B. „Rumpf“ oder „Extremitäten“ in Abbildung 1-2b).

1.4.2 Struktur eines Modells für die Verteilung von TCDD und Methoden zur Bestimmung der Konzentrationen von TCDD in Blut und Geweben

Eine Voraussetzung für die Aufstellung eines solchen Gleichungssystems ist die Kenntnis der einfließenden Parameter, wie die $R_{\text{Blut},i}$ und ε_i für alle i sowie die in $M_i(t)$ eingehenden Prozesse bzw. deren mathematische Beschreibung. In der Literatur zu PBPK-Modellen findet

sich mehrfach der Versuch, Daten aus *in vitro* Experimenten in diese Modelle mit einzubeziehen. Meist wurden dabei Geschwindigkeitskonstanten von Stoffwechselreaktionen zur Beschreibung der Eliminierung aus Organkompartimenten oder Bindungsaffinitäten an Plasma- und Gewebeproteine ermittelt und in Modelle inkorporiert^{112,113}. Hierbei wird zumeist die Annahme zugrunde gelegt, daß der an Plasmaproteine gebundene Teil einer Chemikalie nicht an der Einstellung von Verteilungsgleichgewichten beteiligt ist. Es finden sich jedoch immer mehr Hinweise dafür, daß in manchen Fällen die Substanz in ihrer gebundenen Form eine wesentliche Rolle bei der Aufnahme in z.B. Leber, Herz oder Gehirn spielen kann. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht geklärt und kann sehr wohl unterschiedlich für verschiedene Materialien und Organe sein^{114,115}. Zudem kann oft die Bindung in Geweben nicht allein anhand einfacher hydrophober Wechselwirkungen, die aus dem Verteilungsverhalten in organischen Lösungsmitteln ermittelt werden können, erklärt werden.

Über die Festlegung der $R_{\text{Blut},i}$ für eine gegebene Substanz existiert bisher keine Übereinstimmung in der Literatur¹⁰⁶. Eine Vielzahl von Methoden und Formalismen sind beschrieben worden, um Werte für $R_{\text{Blut},i}$ zu errechnen^{106,116,117}. Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizienten können rechnerisch aus pharmakokinetischen Daten *in vivo* oder durch experimentelle Messung in Modellsystemen *in vitro* abgeschätzt werden. Beide Ansätze sind erfolgreich in verschiedenen Systemen angewendet worden^{137,112,118}. Mathematische Modelle für die Berechnung von Verteilungskoeffizienten sind für verschiedene Versuchsbedingungen erarbeitet worden: Konstante Infusion und intravenöse Injektion in das lebende Tier¹¹⁹, Perfusion der isolierten Leber¹²⁰ und Gleichgewichtsdialyse¹¹². Der Vergleich von in perfundierten Lebern gemessenen Verteilungskoeffizienten mit Werten, die mittels Gleichgewichtsdialyse erhalten wurden, zeigt gute Übereinstimmung¹¹⁷. Die Autoren verwenden dabei das Ergebnis der Leberperfusionen als "wahren" Referenzwert.

Extraktionskoeffizienten wurden bisher nur rechnerisch durch Kurvenanpassung parametrisierter Funktionen an experimentelle Daten erhalten. Eine mögliche Alternative, bei der die zugrundeliegenden Vorgänge modelliert werden könnten, stellen Zellkulturen dar. Die Geschwindigkeit der Diffusion wie auch aktive Transportprozesse lassen sich in diesem Modell beobachten. Frisch isolierte Zellen sind zu diesem Zweck Permanent-Zelllinien vorzuziehen¹²¹. In einem Organ wie der Leber, bei dem Blutzufuß und -abfluß nur über je ein Blutgefäß stattfinden, ließen sich die errechneten Werte durch Vergleich der Aufnahme des perfundierten Organs mit aus Gleichgewichtsdialyse erhaltenen Daten verifizieren.

Eine Reihe von PBPK-Modellen ist vorgeschlagen worden, um die Konzentrationsverläufe im Körper von Säugetieren nach TCDD-Exposition zu simulieren¹²². Bei dem Versuch, das Verhalten von TCDD zu modellieren, müssen insbesondere die Veränderungen, welche die TCDD-Exposition im Körper des exponierten Säugetiers auslöst, berücksichtigt werden. Die Hepatomegalie, die in Ratten ein typisches Zeichen der Toxizität von TCDD ist, führt dazu, daß V_{Leber} in der Folge einer Exposition mit TCDD nicht konstant ist. Die Vergrößerung des Lebervolumens ist dabei größtenteils auf eine Zunahme des Volumens der Fetttropfchen in den Leberzellen zurückzuführen. Dies bedingt gleichzeitig eine Zunahme des lipophilen Charakters dieses Gewebes, und damit eine Veränderung des Verteilungsverhaltens für TCDD zwischen Blut und Leber. Weiterhin nimmt bei der Gabe einer letalen Dosis mit dem Fortschreiten des Auszehrungssyndroms das Speicherfett ab, was eine Veränderung des Verteilungsverhaltens zwischen Blut und Fettgewebe bedingt. Für die Simulation in einem PBPK bedeutet dies, daß die Parameter V_i und R_i für einige Gewebe nicht wie sonst üblich als Konstanten behandelt werden können.

Ein Modell für die Verteilung von TCDD in Ratten, welches diese Veränderungen zu berücksichtigen versucht, wurde von Prof. Dr. Rozman und Mitarbeitern am Medical Center der University of Kansas ausgearbeitet und in Teilen publiziert¹³⁴. Dieses Modell enthält ein komplettes Untermodell des Transport- und Depot-Verhaltens der Neutralfette, welches entwickelt wurde, um den Veränderungen im Fettstoffwechsel von mit TCDD behandelten Tieren Rechnung zu tragen¹³⁵. In letzterem Modell wird das Kompartiment Blut unterteilt in mehrere Unterkompartimente, die den Lipoproteinspezies Chylomikronen, deren Reste nach Einwirkung der Lipoprotein-Lipase, VLDL, LDL und HDL entsprechen. Diese werden teils aktiv von verschiedenen Gewebearten aufgenommen, diesem Umstand konnte im Modell aber nicht Rechnung getragen werden, da die Verteilung von TCDD auf die verschiedenen Plasmakomponenten nur unzureichend bekannt ist⁸⁸. Zudem benutzte das Modell im wesentlichen Werte für die TCDD-spezifischen Parameter $R_{\text{Blut},i}$ und ϵ_i , die mittels Kurvenanpassung erhalten wurden. Die Aussagekraft dieses Modells würde wesentlich erhöht, wenn eine mathematische Beschreibung des Verteilungsverhaltens zur Verfügung stünde, sowie durch die experimentelle Bestimmung der in das Modell eingehenden Parameter.

Um das Verteilungsverhalten von TCDD zwischen Blut und Geweben mittels experimentell zu bestimmender Größen zu beschreiben, kann ein neuer Ansatz verwendet werden, welcher im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Die Konzentration von TCDD in einem

beliebigen Gewebe oder in Blut läßt sich als Summe der Konzentrationen der an Blut- bzw. Gewebebestandteilen gebundenen und der freien Substanz schreiben.

$$c_i(t) = \sum_j [S_j - \text{TCDD}] + [\text{TCDD}]_i \quad \text{Gleichung 4}$$

Dabei steht $[\text{TCDD}]_i$ für die Konzentration des freien TCDD im i-ten Gewebe oder in Blut und $[S_j - \text{TCDD}]$ für die Konzentration des Komplexes von TCDD mit dem j-ten Substrat im i-ten Gewebe oder im Blut. Die Bindung von TCDD an die verschiedenen Komponenten in Blut oder Geweben läßt sich im Sinn einer Langmuir-Isothermen als die Summe von Termen schreiben, die der Bindung an je eine Komponente entsprechen:

$$\sum_j [S_j - \text{TCDD}] = \sum_j \frac{n_j K_j [S_j] [\text{TCDD}]}{1 + K_j [\text{TCDD}]} \quad \text{Gleichung 5}$$

wobei n_j und K_j für die Anzahl der Bindungsstellen und die Dissoziationskonstante am j-ten Substrat stehen. Können n_j und K_j für die unterschiedlichen Komponenten bestimmt werden, so kann das Bindungsverhalten in einem Kompartiment vollständig beschrieben werden. Die Verteilung zwischen zwei in Wechselwirkung stehenden Kompartimenten i und k ergibt sich dann durch Gleichsetzung der Konzentrationen des freien Liganden $[\text{TCDD}]_{i,k}$. Bei diesem Formalismus muß jedoch zusätzlich der Austausch gebundener Substanz, z.B. die Aufnahme von an LDL gebundenes TCDD durch Endozytose der LDL, zwischen Blut und Gewebe berücksichtigt werden. Dies bedeutet, daß die Berechnung der Verteilung zwischen Blut und Geweben in zwei Schritten erfolgen muß. Zunächst wird der Austausch der Plasmabestandteile bzw. der vom Gewebe sekretierten Komponenten zwischen Blut und Gewebe mit evtl. daran gebundener Substanz simuliert. In einem zweiten Schritt werden die Konzentrationen der freien Substanz in Gewebe und Blut gleichgesetzt, unter Berücksichtigung der Konzentrationen spezifischer und unspezifischer Bindungspartner in den beiden Kompartimenten nach dem Stoffaustausch im ersten Schritt. Es erübrigt sich damit eine Bestimmung von Verteilungskoeffizienten für jedes einzelne Organ in verschiedenen Stadien der Toxizität von TCDD.

Es gibt nur wenige spezifische Bindungspartner für TCDD im Körper von Säugetieren, namentlich der Ah-Rezeptor und CYP1A2. Es sollte angenommen werden, daß sich mit diesen Ausnahmen die Bindung an Gewebebestandteile in zwei Substrattypen, Proteine und Lipide, unterteilen läßt, für welche die Konstanten n_j und K_j sich vermutlich nur wenig zwischen verschiedenen Geweben unterscheiden dürften. Diese Annahme wird unterstützt

durch den Tatsache, daß eine starke Korrelation der Bindung an Muskelgewebe von verschiedenen Tierarten und der Bindung an verschiedene Gewebe (Niere, Lunge, Muskel) einer Tierart gefunden wurde (d.h. wenn sich die Bindung im Muskelgewebe der Ratte und des Menschen verhielten wie 1:2, und die Bindung im Muskelgewebe und der Lunge der Ratte verhielt wie 1:4, so verhielt sich die Bindung im Muskelgewebe und der Lunge des Menschen wie 2:8)¹²³. Liesse sich dieser Befund weiter erhärten, eröffnete sich ein bedeutendes Potential für die Übertragung von Modellergebnissen basierend auf dieser Methode zwischen Tieren und dem Menschen¹¹⁶.

Die Bestimmung der Konstanten n_i und K_i erfolgt gemeinhin durch Dialyse einer Lösung des Liganden gegen Lösungen, die das Substrat in verschiedenen Konzentrationen enthalten. Die äußerst geringe Wasserlöslichkeit von TCDD und seine starke Tendenz, an Apparateilen zu haften, machen dieses Verfahren im vorliegenden Fall nahezu unmöglich. Es wurde daher eine Alternative erarbeitet. Werden die Lösungen zweier makromolekularer Substrate S_1 und S_2 , deren eine den Liganden L enthält, gegeneinander dialysiert, so verhalten sich nach Einstellung des Gleichgewichts die Gesamtkonzentrationen des Liganden $[L_g]$ auf beiden Seiten in erster Näherung wie:

$$n_2[S_2]K_2 - [L_{g,2}]K_2 = \frac{[L_{g,2}](1 + n_1[S_1]K_1 - [L_{g,1}]K_1)}{[L_{g,1}]} \quad \text{Gleichung 6}$$

Sind die Bindungskonstanten n_1 und K_1 für S_1 bekannt, so lassen sich n_2 und K_2 nach dieser Gleichung durch Variation der Substratkonzentration $[S_2]$ und Messung der resultierenden $[L_{g,1}]$ und $[L_{g,2}]$ ermitteln. Dies bietet den Vorteil, daß durch Wahl eines geeigneten Substrats S_1 auf beiden Seiten der Dialysemembran meßbare Konzentrationen auch von im reinen Lösungsmittel sehr schwerlöslichen Liganden erreicht werden können.

Rinderserum-Albumin bietet sich hier als Referenzsubstrat an. Daher muß zunächst die Dissoziationskonstante von TCDD an Albumin, K_D , für die es in der Literatur keine Angaben gibt, bestimmt werden. Unter der Annahme, daß wie bei PCB (siehe oben) nur ein Molekül TCDD pro Molekül Albumin adsorbiert wird (d.h. $n_A = 1$), läßt sich K_D durch Inkubation von Lösungen verschiedener Albuminkonzentration $[A]$ in Gegenwart eines Überschusses von TCDD (d.h. es muß ein ungelöster Bodenkörper verbleiben) erhalten. Unter diesen Umständen wird in Gleichung 5 die Konzentration des freien Liganden $[TCDD]$ gleich der Löslichkeit des Liganden im reinen Lösungsmittel, L_{TCDD} . Die Gesamtkonzentration des

Liganden, $[TCDD_g]$, ergibt sich dabei aus der Summe über die Konzentration des Albumin-TCDD Komplexes, $[A-TCDD]$, und der Löslichkeit L_{TCDD} . Damit ist

$$[L_g] = [A - TCDD] + L_{TCDD} = \frac{K_D L_{TCDD} [A]}{1 + K_D L_{TCDD}} + L_{TCDD} \quad \text{Gleichung 7}$$

Mit zunehmender Substratkonzentration nimmt die durch Bindung ans Substrat in Lösung gebrachte Menge des Liganden zu. Ableitung der Gleichung 7 nach der Albuminkonzentration ergibt

$$\frac{d([L_g])}{d([A])} = \frac{K_D L_{TCDD}}{1 + K_D L_{TCDD}} \frac{d([A])}{d([A])} + \frac{dL_{TCDD}}{d([A])} = \frac{K_D L_{TCDD}}{1 + K_D L_{TCDD}} \quad \text{Gleichung 8}$$

Durch Auflösen von Gleichung 8 nach K_D erhält man mit $d([L_g])/d([A]) = \Delta$

$$K_D = \frac{\Delta}{L_{TCDD} (1 - \Delta)} \quad \text{Gleichung 9}$$

Aus der Steigung Δ einer Auftragung der gemessenen Konzentration $[L_g]$ gegen die eingesetzten Albuminkonzentrationen $[A]$ ergibt damit sich die Bindungskonstante nach Gleichung 9. Der Achsenabschnitt dieser Auftragung entspricht dabei der Löslichkeit von TCDD im verwendeten Puffer, L_{TCDD} . Diese kann jedoch auch aus unabhängigen Messungen bestimmt und durch Vergleich mit Literaturwerten für die Löslichkeit in Wasser überprüft werden. Sie sollte sich von der Löslichkeit in reinem Wasser nicht stark unterscheiden.

Zur Validierung des Ansatzes sollten Verteilungen zwischen Lösungen von Rinderalbumin und Homogenaten einiger sich in ihrer Zusammensetzung stark unterscheidender Organe untersucht werden. Ein Vergleich von Leber-, Weißfett- und Muskelgewebe würde diesem Anspruch gerecht. Ließe sich das Verteilungsverhalten von TCDD unter diesen Bedingungen durch den oben beschriebenen Ansatz hinreichend genau beschreiben, so ließe sich annehmen, daß auch alle anderen Gewebe analog repräsentiert werden können.

Der hier aufgezeigte, neuartige Ansatz für die Modellierung des toxikokinetischen Verhaltens von TCDD, der auch auf andere Substanzen übertragbar wäre, könnte eine deutliche Vereinfachung bei der Entwicklung von PBPK-Modellen mit sich bringen. Insbesondere könnte er die Ermittlung gewebespezifischer Parameter für solche Modelle vereinheitlichen, und die Übertragung der Ergebnisse einer solchen Modellierung zwischen verschiedenen Spezies erleichtern.

1.5 Stimulierung der Ausscheidung von TCDD durch Nahrungszusätze

Aufgrund ihrer hohen Lipophilie, geringen Wasserlöslichkeit, und hohen chemischen Beständigkeit weisen die Polychlordibenzo-p-dioxine (PCDD) und -furane (PCDF) extrem lange Halbwertszeiten der Ausscheidung im Körper von Säugetieren, besonders aber im menschlichen Körper (5 - 10 Jahre), auf. Das breite Spektrum von Veränderungen, das diese Substanzen in beinahe allen molekularbiologischen Testsystemen hervorzurufen im Stande sind, lassen eine Minimierung der menschlichen Exposition auf jeden Fall wünschenswert erscheinen. Für Individuen, die in der Vergangenheit hohen Dosen ausgesetzt waren, ist eine Reduktion der Exposition aufgrund der langen Halbwertszeiten jedoch nicht ausreichend um eine potentielle Schädigung abzuwenden. In solchen Fällen muß die Erhöhung der Ausscheidung erreicht werden.

Eine Stimulierung der Ausscheidung hochlipophiler Xenobiotika im Körper von Säugetieren kann durch geeignete Futtermittelzusätze erzielt werden. So konnten die Halbwertszeiten der Ausscheidung von Hexachlorbenzol, Hexabrombiphenyl und der Insektizide DDT und Mirex in mehreren Versuchstierspezies durch Zusatz von Hexadekan zum Futter signifikant reduziert werden^{124,125,126,127,128}. Ähnlich wirkt der Zusatz des Harzes Cholestyramin auf die Ausscheidung von Hexabrombiphenyl in Rhesusaffen, und eine Kombination von Cholestyramin mit Reisspelzen erhöhte die Ausscheidung von PCDF und polychlorierten Biphenylen (PCB) in einigen, aber nicht allen untersuchten Yusho- und Yu-Cheng-Patienten^{128,129,130}.

Unter Umständen besteht die Möglichkeit, eine hohe Belastung mit PCDD evtl. auch in Menschen durch entsprechende Nahrungszusätze zu reduzieren. Um diese Möglichkeit zu prüfen, kann die Stimulation der Ausscheidung einer nicht-letalen Dosis von TCDD in Ratten durch Zusatz von Hexadekan oder Cholestyramin modellhaft untersucht werden. Eine solche Untersuchung wurde bereits durchgeführt, wobei eine Erhöhung der Ausscheidung von 14 % auf 39 % innerhalb von 10 Tagen durch die Gabe von Hexadekan beobachtet wurde. Jedoch waren die verwendeten Dosen (60 µg TCDD/kg Körpergewicht) so hoch, daß sie zu einer 60 – 100 %igen Letalität in den eingesetzten Rattengruppen während der 50tägigen Versuchsdauer führte. Die Gabe von Hexadekan erhöhte dabei die Letalität von 60 % auf 100 %¹³¹.

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu gewährleisten, muß aber den Unterschieden zwischen Mensch und Ratte Rechnung getragen werden. Bisher wurden alle Untersuchungen zur Ausscheidung von TCDD in Ratten bei Dosen durchgeführt, die zu deutlicher Induktion der Enzymaktivität in hepatischen Mikrosomen führen. Eine leichte Induktion (30 %) wird bereits bei Dosen über 3 ng/kg Körpergewicht beobachtet, und die Induktion erreicht ihr Maximum (5500 %) bei ca. 1 µg/kg Körpergewicht in weiblichen Wistar Ratten⁸⁵. Wie oben erwähnt ist nicht einwandfrei geklärt, ob diese erhöhte enzymatische Aktivität effektiv einer Auto-Induktion des Metabolismus von TCDD in Ratten entspricht, und ob und bei welchen Dosen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ausscheidung der Metabolismus von TCDD oder die Ausscheidung durch die Darmwand ist. Jedenfalls wurde eine der in Ratten festzustellenden Enzyminduktion vergleichbare Erhöhung der metabolischen Aktivität im Menschen bisher nicht beobachtet. In diesem Punkt, wie auch hinsichtlich der Verteilung von TCDD zwischen Leber und Fettgewebe, verhält sich TCDD im Menschen so wie in einer mit einer nicht-enzyminduzierenden Dosis behandelten Ratte.

1.6 Aufgabenstellung

Eine Voraussetzung für eine wissenschaftlich fundierte Abschätzung des Gesundheitsrisikos für den Menschen ist die Verfügbarkeit eines geeigneten Modells. Während sich Modelle finden lassen, die bezüglich einzelner Endpunkte der Toxizität ein ähnliches Verhalten zeigen wie das im Menschen beobachtete, wurde doch noch kein System identifiziert, welches die vielen Aspekte der Toxizität der PCDD/F im Menschen umfassend zu modellieren vermocht hätte. Die großen und in vielen Aspekten noch unzureichend aufgeklärten Unterschiede zwischen den Spezies in den Konzentrationsabhängigkeiten vieler Endpunkte haben alle bisher vorgeschlagenen Tiermodelle als unzureichend erscheinen lassen¹³².

Die Prozesse, die bei der Ausbildung der toxischen Effekte der PCDD/F eine Rolle spielen, sind vielschichtig. Unterschiedliche enzymatische Aktivitäten, Transportprozesse, Ernährungsgewohnheiten und andere Gegebenheiten erschweren den speziesübergreifenden Vergleich der Vorgänge in belasteten Individuen. Die große Anzahl der zu berücksichtigenden Parameter ist im Laborversuch kaum noch erfaßbar, und so sind einige Versuche unternommen worden, *in silico* Modelle zu konstruieren, mit deren Hilfe Hypothesen getestet und Speziesunterschiede geklärt werden können^{133,134,135}. Diese Computermodelle berücksichtigten notwendigerweise physiologische Details, um Speziesvergleiche zu ermöglichen. Bedingung für die Erstellung von solchen physiologisch basierenden

pharmakokinetischen oder PBPK-Modellen ist die Verfügbarkeit von numerischen Werten für die den physiologischen Prozessen zugrundeliegenden physikalischen Konstanten. Hierzu gehören zuverlässig dokumentierte Größen, wie der durchschnittliche Anteil des Fettgewebes am Gesamtgewicht in verschiedenen Spezies¹³⁶. Eine Vielzahl anderer Größen muß jedoch meist abgeleitet, abgeschätzt oder auf andere Weise ermittelt werden. Besondere Bedeutung erlangen hierbei Verteilungskoeffizienten und Extraktionskoeffizienten, die den Transport zwischen verschiedenen Kompartimenten eines Modells beschreiben. Verschiedene, theoretische wie experimentelle, Methoden für eine Abschätzung dieser Parameter sind in der Literatur beschrieben^{137,138}. Diese eignen sich jedoch nur begrenzt oder nicht für Substanzen mit einem physikalischen Eigenschaftsprofil vergleichbar dem der PCDD/F, da insbesondere deren geringe Wasserlöslichkeit, hohe Lipophilie und die Tendenz, an Oberflächen zu haften, mit den beschriebenen Methoden nicht zu handhaben sind. Es war daher eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit, Methoden für eine solche Bestimmung zu erarbeiten, um diese Größen für TCDD als Stellvertreter für die PCDD/F in Ratten, wiederum stellvertretend für Säugetiere, zu bestimmen. Vorbereitend sollte es unternommen werden, für ein bereits bestehendes PBPK-Modell, in dem mehrere Unterkompartimente in Blut berücksichtigt werden, eine auf experimentellen Daten beruhende mathematische Beschreibung der Verteilung von TCDD auf diese Unterkompartimente zu finden.

Ein weiterer Aspekt der Aufgabenstellung bestand in der Untersuchung der limitierenden Faktoren für die Eliminierung der PCDD/F aus dem Körper von Säugetieren und deren mögliche Beeinflussung. Die Halbwertszeiten für die Eliminierung der PCDD/F in Säugetieren sind extrem hoch, entsprechend hoch ihre Tendenz zur Bioakkumulation¹¹. Individuen, die z.B. bei Unfällen großen Mengen dieser Substanzen ausgesetzt wurden, können diese so gut wie nicht mehr eliminieren, da die Ausscheidung auch hoher Dosen nur wenig über der täglichen Aufnahme mit der Nahrung liegt. Es sollte daher untersucht werden, welche Faktoren die Eliminierungsrate bestimmen und ob diese durch entsprechende Maßnahmen erhöht werden könnte. Auch hier sollte die Untersuchung anhand des Verhaltens von TCDD in Ratten modellhaft für Säugetiere durchgeführt und die Ergebnisse in ihrer Übertragbarkeit auf andere Spezies diskutiert werden.

2 Material und Methoden:

2.1 Vorbemerkung

Nach ersten Verdachtsmomenten zu Beginn der Arbeit (die scheinbare Löslichkeit des Standards in reinem Wasser lag über den Angaben für die Löslichkeit von TCDD in wäßrigem Milieu in der Literatur) wurde der ^3H -TCDD-Standard, mit dem die Mehrzahl der beschriebenen Experimente durchgeführt wurden, mittels GC/MS auf seine Reinheit überprüft. Aufgrund eines Kommunikationsfehlers wurde der Standard dabei jedoch nur auf das Vorliegen von Tetra- und höherchlorierten Dibenzodioxinen untersucht und für rein befunden. Erst nach zweijähriger Arbeit mit der benutzten Charge des ^3H -TCDD-Standards wurde festgestellt, daß dieser, vermutlich durch radiolytische Zersetzung, eine radiochemische Reinheit von nur 70 % besaß. Aus diesem Grund wird bei den mit diesem ungereinigten Standard durchgeführten Versuchen die Bezeichnung „ungereinigtes ^3H -TCDD“ verwendet.

Auf Mengenangaben in g bzw. mol wird verzichtet und ausschließlich die verarbeitete Menge an Radioaktivität in μCi angeführt. Wo es zu Vergleichszwecken sinnvoll ist, wird jedoch der Zusatz „ca. X g bezogen auf die reine Substanz“ in Klammern beigefügt. Bei mit TCDD oder ^{14}C -TCDD isotopenverdünntem ungereinigtem ^3H -TCDD werden diese Angaben genannt, da durch die Verdünnung der Verunreinigungsgrad jeweils $\leq 2\%$ betrug.

Falls nicht anders vermerkt, wurden bei allen beschriebenen Messungen Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2 Laborgeräte und Hilfsmittel

Die experimentellen Arbeiten wurden teils am The University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, USA, teils am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, durchgeführt. Die etwas unterschiedliche Ausstattung der jeweiligen Laboratorien machte in einigen Fällen den Einsatz unterschiedlicher Methoden für die Messung desselben Parameters unumgänglich. Die folgenden Methodenbeschreibungen sind daher, wo angebracht, nach dem Ort ihrer Durchführung gegliedert.

2.2.1 Geräte, welche bei in Kansas City, USA, durchgeführten Versuchen Verwendung fanden

Szintillationszähler: 1900 CA, Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA

Zentrifugen	Tischzentrifuge TJ-6 (bis 5000 $x g$), Ultrazentrifugen L-65 (5000 – 288.000 $x g$), TL100 (288.000 – 412.000 $x g$), , alle Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Rotoren:	SW41.TI (288.000 $x g$), 50.2 TI (10.000 $x g$, 100.000 $x g$) für Einsatz in L7-65, TLA100.3 (412.000 $x g$) für Einsatz in TL100, alle Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Zentrifugenbehälter:	13 x 89 mm Polyallomer-Zentrifugenröhrchen in SW41.TI, 13 x 64 mm Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen in 50.2 TI; 13 x 51 mm Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen in TLA100.3, alle Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Vorrichtung zur Blutfraktionierung:	Hoefer Scientific FS101 Gradient Tube Fractionator, Hoefer Scientific, San Francisco, CA, USA, verbunden mit FC80 Fraktionssammler über Minipuls 2 Peristaltic Pump, beide Gilson Medical Instruments, Middleton, WI, USA
Analyseroboter:	CobasMira Automatical Analyzer, Roche Analytical Instruments Inc., Nutley, NJ, USA
Gel-Elektrophorese-Gerät:	Model H5 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, submarine Konfiguration, Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
Densitometrie:	CS9000 Flying Spot Scanner, Shimadzu Co., Kyoto, Japan
Gefriertrockner:	Labconco Freeze dryer, Labconco Corp. Kansas City, MO, USA
Fluoreszenzspektrometer:	Spectrofluorophotometer RF-540 mit Data Recorder DR-34, beide Shimadzu Co., Kyoto, Japan
UV/VIS-Spektrometer:	Spectrophotometer RF-160, Shimadzu Co., Kyoto, Japan
Horizontalschüttler:	Reciprocal Shaker R3506; LAB-LINE Instruments Inc.; Melrose Park, IL, USA
Gewebehomogenisator:	Potter S, Braun Melsungen; Glasgefäß/Teflonpistill

2.2.2 Geräte, welche bei in Neuherberg durchgeführten Versuchen Verwendung fanden

Szintillationszähler:	1600 TR, Packard Instrument GmbH, Dreieich
Verbrennungsautomat:	B306, Packard Instrument GmbH, Dreieich
Zentrifugen:	Biofuge 22R, Heraeus Sepatech, Osterode
Rotoren:	HFA 1494 (1.500 g, 4.000 g) für Einsatz in Biofuge 22R, Heraeus Sepatech, Osterode
HPLC:	Säule: Bakerbond PAH 16-PLUS, 250 x 3.0 (Länge x i.D.), J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande; Pumpe: LC10AD, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan; UV-VIS-Detektor: L3000 Photo Diode Array Detector, Hitachi, Tokyo, Japan; XY-Schreiber: SE120, Bachofer Laborgeräte, Reutlingen
Gefriertrockner:	Beta 1-16, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode
Horizontalschüttler:	KS250, IKA-Labortechnik, Staufen

2.3 Chemikalien

2.3.1 Chemikalien, welche bei in Kansas City, USA, durchgeführten Versuchen Verwendung fanden

Ungereinigtes ^3H -TCDD (spez. Aktivität 40 Ci/mmol, radiochemische Reinheit 97 % laut Angabe des Herstellers, Referenzdatum Okt. 1987) und TCDD (chemische Reinheit >98 %, bestimmt durch GC/MS) stammten von Cambridge Isotope Lab., Woburn, MA, USA; $^{14}\text{C}_6$ -TCDD (spez. Aktivität 0,122 Ci/mmol, radiochemische Reinheit >98 % laut Angabe des Herstellers, Referenzdatum April 87, chemische Reinheit >97 %, bestimmt durch GC/MS) Angaben im Text zur Aktivität beziehen sich jeweils auf die Aktivität zur Zeit der Durchführung eines Versuchs. Die Kombination aus Soluene 350 für das Lösen von Geweben mit Hionic Fluor Szintillationscocktail wurde wegen der geringen Chemolumineszenzneigung gewählt. Toluol OptimaGold grade sowie alle anderen Lösungsmittel der Reinheit HPLC grade wurden von Fisher Scientific, St. Louis, MO, USA, bezogen. Chemikalien ohne gesonderte Angabe stammten von Fisher Scientific, St. Louis, MO, USA, oder Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA.

Kommerziell erhältliche Analysesets fanden Verwendung bei der Bestimmung von Cholesterinen (Cholesterin + Cholesterinester; Cholesterol/HP, Boehringer Mannheim, Mannheim), Phospholipiden (Phospholipids B, Wako Pure Chemical Industries, Richmond, VA, USA), Triglyzeriden (Sigma Procedure #337, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), freiem Glyzerin (Sigma Procedure #337A, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) und Proteinen in Plasma (Sigma Procedure #540, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) oder Lipoproteinfraktionen (Sigma Procedure #611, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Die Implementierung dieser Analysemethoden auf einem Analyseroboter erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

Für die Agarosegel-Elektrophorese wurde Agarose Medium EEO (Geltemperatur 35-45 °C, Gelstärke $>1000 \text{ g/cm}^2$, EEO-Mr. 0,16-0,19, Fisher Biochemistry Products, Fisher Scientific, St. Louis, MO, USA) verwendet. Diethylbarbitursäure (DEBS), Na-diethylbarbiturat und Calciumlactat wurden von Dr. T.L. Pazdernik, Dept. of Pharmacol., Toxicol., Therap., The University of Kansas Medical Center, zur Verfügung gestellt. Alle weiteren für die Elektrophorese verbrauchten Materialien der Reinheitsstufe Biochemical grade stammten von Fisher Scientific, St. Louis, MO, USA.

Die Bezeichnung Phosphatpuffer steht im folgenden für eine wäßrige Lösung der Zusammensetzung: 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0,137 M NaCl, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 2,7 mM KCl, 1 mM NaN_3 , pH 7,4 bei 25 °C. Diese wurde durch Zugabe entsprechender Mengen NaN_3 und $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ zu aus kommerziell erhältlichen Tabletten (Phosphate buffered saline, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) hergestelltem Puffer dargestellt. Sukrosepuffer bezeichnet eine wäßrige Lösung der Zusammensetzung: 0,32 M Sukrose, 10 mM N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES), 1 mM EDTA, pH 7 bei 25 °C.

2.3.2 Chemikalien, welche bei in Neuherberg durchgeführten Versuchen Verwendung fanden

Eine kleine Menge (100 μCi) des in Kansas eingesetzten ungereinigten $^3\text{H-TCDD}$ wurde nach Neuherberg transportiert. Wenn nicht anders vermerkt kamen Lösungsmittel des Reinheitsgrades zur Rückstandsanalyse (z.RA.) der Firma Promochem, Wesel, zum Einsatz. Die Materialien für die Säulenchromatographie stammten von Promochem, Wesel (Na_2SO_4 , Florisil), ICN Biomedicals, Eschwege (Alumina, Silica) und Merck, Darmstadt (Seesand,

H₂SO₄). Konz. H₂SO₄ und konz. HCl wurden von Merck, Darmstadt, bezogen. Monophase S von Canberra Packard GmbH, Dreieich, wurde als Szintillationscocktail verwendet.

2.4 Umgang mit TCDD-haltigen Lösungen

TCDD besitzt eine hohe Neigung an Oberflächen aller Art zu haften. Dieser Umstand machte sich immer wieder in Form niedriger Wiederfindungsraten bemerkbar. Besonders stark haftet TCDD dabei an Kunststoffoberflächen, eine Ausnahme bilden hierbei nur die fluorierten Kunststoffe. Beim Umgang mit TCDD-haltigen Lösungen wurden daher wo immer möglich Teflon-, Glas- oder Metallwerkstücke eingesetzt. Der Umgang mit TCDD wurde durch das Protokoll "*Procedural descriptions of the handling of 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) and its higher chlorinated congeners (PCDDs)*" im Einvernehmen mit dem Safety Office der University of Kansas Medical Center (Kansas City, KS, USA) geregelt bzw. durch die Standard Operating Procedure D0002 „Vorsichtsmaßnahmen Sonderlabor Dioxine“ des Sonderlabors Dioxine am Intitut für Ökologische Chemie, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg.

2.5 Bestimmung von Radioaktivitätsgehalten

2.5.1 Radioaktivitätsbestimmung in Kansas City, USA

2.5.1.1 Allgemeine Methoden

20 ml Szintillationsgläser aus Borosilicatglas stammten von Fisher Scientific, St. Louis, MO, USA. Farblose Proben in geringen Mengen wäßrigen Mediums oder organischen Lösungsmittels wurden mit 10 ml Szintillationscocktail vermischt und im Szintillationszähler vermessen. Der Gehalt des jeweiligen Nuklids wurde aus Zählrate und Quenchfaktor errechnet. Der Quenchfaktor wurde aus dem Quench der Probe durch Vergleich mit einer durch Interpolation zwischen 10 gequenchten Standards ermittelten Quenchkurve bestimmt. Die Berechnungen wurden mit einem vom Hersteller des Geräts bezogenen Computerprogramm durchgeführt. Die gequenchten Standards wurden ebenfalls vom Hersteller des Szintillationszählers bezogen. Dabei wurde vorausgesetzt, daß in diesen Proben, wie auch in den Standards, im wesentlichen der gelöste Sauerstoff als quenchendes Agens wirkte.

Durch geeignete Kontrollexperimente (Messung der Aktivität in einer Lösung vor und nach Zugabe verschiedener Probenvolumina) konnte gezeigt werden, daß dies für Plasmaproben

(bis 500 µl), Urinproben (bis 1 ml) sowie Proben wäßriger Protein- (z.B. Rinderserumalbumin (RS-Albumin)) oder Salzlösungen (z.B. NaBr) gültig war, trotz der für Plasma und Urin üblichen leichten Gelbfärbung bzw. der bei Plasma, Protein- und Salzlösungen beim Zusatz von Szintillationscocktail auftretenden farblosen Niederschläge. Für alle Proben, welche die obige Voraussetzung nicht erfüllten (z.B. stark gefärbte Proben; die Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs im Szintillationscocktail liegt im Bereich des sichtbaren Lichts), wurden eigene Quenchkurven erstellt. Dazu wurden gleiche Volumina einer das Nuklid enthaltenden Lösung in Toluol in 13 Szintillationsgläser pipettiert. Jeweils 3 dieser Proben wurden ohne weitere Behandlung zur Bestimmung des Gehalts wie oben vermessen, den verbleibenden 10 Proben wurden unterschiedliche Mengen des zu untersuchenden Materials zugesetzt und gegebenenfalls der für das Material vorgesehenen Behandlung unterzogen. Diese wurden anschließend unter Angabe des tatsächlichen Gehalts an Radioaktivität zur Aufnahme einer Quenchkurve verwendet.

2.5.1.2 Messung der Radioaktivität in Proben von Vollblut oder isolierter Blutzellfraktionen

Proben von Vollblut oder isolierter Blutzellfraktionen wurden mit H₂O₂ entfärbt. Dazu wurden 100 – 150 mg der Probe in ein Szintillationsglas pipettiert, 1 ml einer Gewebelöser/Isopropanol-Mischung (Vol.-Verhältnis 1:1) zugegeben, das Glas verschlossen und 15 min auf 50 °C erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) wurden unter Schütteln 0,5 ml 30 %iges H₂O₂ in 10 Portionen a 50 µl zugegeben. Das Glas wurde anschließend unter gelegentlichem Schwenken unverschlossen 15 min bei RT, 15 min bei 50 °C und wieder 30 min bei RT stehengelassen. Dann wurden 10 ml Szintillationscocktail zugegeben und das Glas nochmals unverschlossen bei 30 min stehengelassen. Diese Methodik wird vom Hersteller des Szintillationszählers empfohlen. Schon leichte Abweichungen von diesem Protokoll führten häufig zu einer dunklen Eintrübung, die eine Auswertung unmöglich machte.

2.5.1.3 Messung der Radioaktivität in Agarosegelstücken

Für die Bestimmung von Radioaktivität in Agarosegel-Streifen wurden zwei Methoden erprobt:

- a. Zerstörung des Gels durch wiederholtes Gefrieren/Auftauen, und
- b. Schmelzen des Gels im Mikrowellenofen.

Für die Methode a. ergab sich in einem Kontrollexperiment eine Wiederfindungsrate von $89 \pm 3 \%$, für Methode b. $87 \pm 3 \%$. Der geringere Zeitaufwand gab den Ausschlag für die Wahl der Methode b. Dazu wurden die Gelstücke mit 0,5 ml Phosphatpuffer in Szintillationsgläser überführt und in einem Mikrowellenofen erhitzt bis das Gelstück nicht mehr zu erkennen war und sich in der Lösung Blasen zu bilden begannen. Der heißen Lösung wurden sofort 10 ml Szintillationscocktail zugegeben.

2.5.1.4 Bestimmung von Radioaktivitätsgehalten in Geweben

Tierische Gewebe wurden entsprechend oder in leichter Abwandlung der vom Hersteller des Szintillationszählers empfohlenen Methoden vorbehandelt: Eine Probe des jeweiligen Gewebes (Leber, Nieren: 80 - 100 mg; Fettgewebe: 150 - 200 mg; Haut: 300 - 400 mg; Muskel: 350 - 500 mg) wurde in einem Szintillationsglas zerkleinert. Nach Zusatz von 3 ml Gewebelöser wurde das Gefäß fest verschlossen und unter gelegentlichem Schwenken bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur völligen Auflösung des Gewebes inkubiert (12 – 24 h). Anschließend wurden 15 ml Szintillationscocktail zugesetzt.

2.5.1.5 Abschätzung des Gehalts an Radioaktivität in Rattenfäzes im Szintillationszähler

Für Proben getrockneter Fäzes wurden drei alternative Behandlungsmethoden geprüft:

- a. Quellen von 15 – 20 mg getrockneter Fäzes mit 0,1 ml Wasser (30 min), Anlösen der organischen Bestandteile mit 1 ml Gewebelöser (60 min, $40 \text{ }^\circ\text{C}$), Zugabe von 0,5 ml Isopropanol, Oxidation farbiger Bestandteile mit 0,2 ml 30 %igem H_2O_2 ; (10 min, RT; 2 h, $40 \text{ }^\circ\text{C}$), Zugabe von 10 ml Szintillationscocktail;
- b. 60 - 100 mg Fäzes, Oxidation farbiger Bestandteile mit 1,5 ml konz. HClO_4 /30 %igem H_2O_2 (Vol.-Verhältnis 1:1; 60 min, $50 - 70 \text{ }^\circ\text{C}$), Kühlen im Eisbad, Zugabe von 15 ml Szintillationscocktail;
- c. 40 – 50 mg Fäzes, Oxidation farbiger Bestandteile mit 1,5 ml 1 N H_2SO_4 in 10 %igem Ethanol/1 ml NaOCl , (kurz schütteln, lose verschließen, 60 min, $50 \text{ }^\circ\text{C}$), Zugabe von 15 ml Szintillationscocktail.

Methode a. wird vom Hersteller des Szintillationszählers empfohlen, b. und c. wurden der Literatur entnommen¹³⁹. Methode a. erwies sich aufgrund der geringen einsetzbaren Substanzmenge als zu unempfindlich, Methode c. konnte den Quench der Proben nicht ausreichend reduzieren. Bei Methode b. trat eine starke, zeitlich abhängige

Chemolumineszenz auf. Dennoch war diese geeignet, eine Abschätzung der zu erwartenden Ergebnisse zu erhalten, wenn zwischen der Behandlung der Proben mindestens 14 Tage, auf jeden Fall aber eine konstante Zeitspanne für die zu vergleichenden Proben, verstrich. Die endgültige Auswertung der Fäzes mußte unter Verwendung eines Verbrennungsautomaten in Neuherberg vorgenommen werden.

2.5.2 Radioaktivitätsbestimmung in Neuherberg

20 ml Szintillationsgläser aus Polyethylen stammten von Canberra Packard GmbH, Dreieich. Der Szintillationscocktail Monophase S wurde spezifisch für die Verwendung mit tritiierten Substanzen in Verbrennungsautomaten entwickelt. Da eine Standardreihe gequenchter Proben für diesen Szintillationscocktail nicht erhältlich war, mußte eine solche Quenchkurve erstellt werden. Dazu wurden gleiche Volumina einer das Nuklid enthaltenden Lösung in Toluol in 13 Szintillationsgläser pipettiert. Jeweils 3 dieser Proben wurden mit 15 ml Optima Gold (Canberra Packard GmbH, Dreieich) versetzt und in einem Szintillationszähler (Abteilung Technischer Strahlenschutz des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit), auf dem eine Quenchkurve für diesen Szintillationscocktail implementiert war, auf ihren Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Den verbleibenden 10 Proben wurden je 12 ml Monophase S und anschließend verschiedene Mengen (0 - 6 ml) mit Sauerstoff gesättigten Wassers zugegeben. Mit den so erstellten unterschiedlich gequenchten Proben wurde dann eine Quenchkurve ermittelt. Diese wurde im Folgenden auf alle zu messenden Proben angewendet. Proben, für deren Messung eine so erstellte Quenchkurve nicht angemessen erschien (z.B. Vollblut, Fäzes) wurden im Verbrennungsautomaten in $^3\text{H}_2\text{O}$ bzw. $^{14}\text{CO}_2$ überführt.

2.6 Bestimmung der Proteinkonzentrationen in mikrosomalen Suspensionen und hochverdünnten wäßrigen Albuminlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde mit der Methode nach Bradford durchgeführt, einerseits wegen der höheren Empfindlichkeit der Methode (hochverdünnte wäßrige Albuminlösungen: Detektionslimit 1 mg/l gegenüber 10 mg/l bei der Methode Sigma Procedure 611), andererseits weil diese Vorgehensweise die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Experimentatoren in demselben Labor sicherstellte (mikrosomale Suspensionen)¹⁴⁰. Eine Eichkurve wurde mit Hilfe eines Standards (0,2 g RS-Albumin/l; Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) erstellt. Hierzu wurden jeweils 20, 40, 60, 80 und 100 µl des Standards mit Sukrosepuffer auf 100 µl aufgefüllt. Je 20 µl dieser Lösungen

wurden mit 1 ml einer Coomassie-Blau-Lösung (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL, USA) vermischt. Nach 2 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm auf einem UV/VIS-Spektrometer gemessen und aus den Meßwerten eine Eichkurve erstellt. Je zwei Aliquot von 50 µl der zu bestimmenden Probe wurden vor der Messung mit je 650 µl Sukrosepuffer verdünnt, je 20 µl der verdünnten Lösungen zu 1 ml Coomassie-Blau-Lösung gegeben und wie oben vermessen. Die Absorption wurde vom Gerät anhand der Eichkurve selbsttätig in die entsprechende Proteinkonzentration umgerechnet.

2.7 Untersuchungen zum Verteilungsverhalten von TCDD in Blut von Mensch und Ratten

2.7.1 Methodenentwicklung

2.7.1.1 Entnahme und Konservierung von Blut- bzw. Plasmaproben

Blut wurde freiwilligen gesunden männlichen Spendern (Alter 19 – 49 Jahre) aus einer Oberarmvene bzw. männlichen Sprague-Dawley Ratten unter CO₂-Anästhesie aus der vena cava jeweils nach 12stündigem Fasten entnommen. Die evakuierten 10 ml Blutentnahmeröhrchen enthielten 14 mg (38 µmol) EDTA. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Plasma wurde durch Zentrifugation (1400 x g, 15 min bei 4 °C) isoliert. Um Veränderungen des Plasmas während der Aufbewahrung und der Durchführung der Experimente zu minimieren, wurden dem Plasma je 10 µl einer wäßrigen Lösung der Zusammensetzung 37,1 mM Thimerosal, 0,2 M NaN₃ und 0,3 mM Glutathion sowie 10 µl 0,2 M Phenylmethansulphonsäurefluorid in Isopropanol je ml Plasma tropfenweise unter leichtem Schwenken zugesetzt¹⁴¹. Da auch die Zugabe der genannten Konservierungsmittel den enzymatischen wie auch den oxidativen Abbau der Lipoproteine nie ganz verhindern können, wurde die Isolierung der Lipoproteinfraktionen und die anschließende Bestimmung der Lipid-, Protein- und Radioaktivitätsgehalte stets so schnell wie möglich nach der Blutentnahme begonnen und jeder Versuch innerhalb höchstens 72 h abgeschlossen.

2.7.1.2 Inkubation von Vollblut bzw. Plasma mit ungereinigtem ³H-TCDD/TCDD

Inkubationen wurden stets innerhalb von 6 h nach Entnahme der Blutproben vorgenommen. Ungereinigtes ³H-TCDD bzw. ungereinigtes, isotopenverdünntes ³H-TCDD/TCDD, gelöst in Toluol oder Azeton, wurde in ein Glasgefäß eingebracht und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom vertrieben. Es fanden entweder Glasgefäße aus Braunglas Verwendung, oder

Tabelle 2-1: Mengen NaBr zur Einstellung von Lösungen definierter Dichte ausgehend von 0,15 M NaCl

Zugabe [g NaBr/l 0,15 M NaCl]	Eingestellte Dichte [g/ml]	Brechungsindex [n_{20}^D]
0	1,006	1,3340
17,6	1,016	1,3364
82,2	1,063	1,3444
*	1,210	1,3699
371	1,231	1,3734

*Lösungen der Dichte $d = 1,21$ wurden durch Zugabe von 10,3 ml 0,15 M NaCl-Lösung ($d = 1,006$ g/ml) zu 100 ml Lösung der Dichte $d = 1,231$ hergestellt

das Gefäß wurde mittels Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Danach wurde Vollblut oder Plasma zugegeben, das Gefäß luftdicht verschlossen und 60 min bei RT auf einem Horizontalschüttler leicht geschwenkt. Anschließend wurde die Flüssigkeit in ein weiteres Gefäß überführt und weitere 60 min bei RT zur Gleichgewichtseinstellung stehen gelassen. Das Inkubationsgefäß wurde durch schrittweises Spülen mit Wasser, Methanol, Aceton sowie Toluol gereinigt und die bei der Inkubation nicht aufgenommenen Menge an Radioaktivität aus den Spülflüssigkeiten bestimmt.

2.7.1.3 Herstellung von NaCl/NaBr-Lösungen definierter Dichte für die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Die Vorbereitung der auf unterschiedliche Dichten eingestellten Lösungen erfolgte nach Vorschriften, die in den Lipid Laboratories des University of Kansas Medical Centers erarbeitet wurden. Dazu wurde eine 0,15 M NaCl-Lösung ($d = 1,006$ g/ml) hergestellt: 8,77 g NaCl wurden in 750 ml deionisiertem Wasser aufgelöst und zur Vermeidung bakterieller Kontamination 0,13 g NaN_3 (2 mmol) und 0,372 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (1 mmol) zugefügt; der pH der Lösung wurde mittels 2 N NaOH auf 7,4 eingestellt und die Lösung mit deionisiertem Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

Lösungen höherer Dichte wurden durch Zugabe von NaBr zu dieser Ausgangslösung erhalten, mit Ausnahme der Lösung der Dichte $d = 1,21$, die durch Zugabe von 10,3 ml 0,15 M NaCl-Lösung ($d = 1,006$ g/ml) zu 100 ml Lösung der Dichte $d = 1,231$ hergestellt wurde. Die korrekte Einstellung der Dichte wurde anhand des Brechungsindex der Natrium D-Linie bei 20 °C (n_{20}^D) überprüft. Die zur Einstellung von Lösungen höherer Dichte eingesetzten Mengen NaBr in g/100 ml der 0,15 M NaCl-Ausgangslösung sowie die korrespondierenden Brechungsindizes sind in Tabelle 2-1 zusammengefaßt¹⁴².

2.7.1.4 Herstellung eines Dichtegradienten für die Fraktionierung von Plasma durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Zur Unterschichtung einer Plasmaprobe mit einer Salzlösung höherer Dichte wurde die Plasmaprobe in ein 13 x 89 mm Polyallomer-Zentrifugenröhrchen gegeben und in einer auf einer Hebebühne befestigten Halterung arretiert. Eine am Auslauf rundgefeilte Spinalnadel war über eine peristaltische Pumpe mit einem Reservoir der zu unterschichtenden Salzlösung verbunden. Die Pumprate der peristaltischen Pumpe wurde durch zweimalige Messung des innerhalb 10 min gepumpten Volumens bestimmt. Die Hebebühne mit dem Zentrifugenröhrchen wurde unter die lotrecht befestigte Spinalnadel gebracht und solange angehoben, bis sich der Auslauf der Nadel gerade über dem Boden des Röhrchens befand. Anschließend wurde die peristaltische Pumpe für den sich aus dem zu unterschichtenden Volumen mit der Pumprate ergebenden Zeitraum aktiviert. Durch vorsichtiges Absenken der Hebebühne wurde die Nadel zuletzt wieder entfernt.

Zur Überschichtung einer in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegten Probe mit einer Salzlösung geringerer Dichte wurde das Zentrifugenröhrchen wie oben auf einer Hebebühne befestigt. Die zu überschichtende Salzlösung wurde in eine 10 ml Bürette eingefüllt, an deren Auslauf eine rundgefeilte und zum Halbkreis aufgebogene Spinalnadel befestigt war. Die Hebebühne mit dem Zentrifugenröhrchen wurde unter der Bürette postiert. Durch Anheben der Hebebühne wurde anschließend die Nadel so in das Zentrifugenröhrchen eingeführt, daß ihr Auslauf gerade am Meniskus der sich im Röhrchen befindenden Flüssigkeit zu liegen kam. Die zu überschichtende Lösung wurde vorsichtig aus der Bürette einströmen gelassen, wobei durch Absenken der Hebebühne der Auslauf der Nadel immer auf Höhe des Meniskus gehalten wurde. Konnte eine Durchmischung der beiden Flüssigkeiten erfolgreich vermieden werden, führte der dichtebedingte Unterschied in den Brechungsindizes zu einer sichtbaren Grenzfläche. Durch vorsichtiges Absenken der Hebebühne wurde die Nadel zuletzt wieder entfernt und das Zentrifugenröhrchen in einen Ultrazentrifugenrotor überführt (zur Dichtegradienten-Ultrazentrifugation siehe 2.7.1.8).

2.7.1.5 Fraktionieren von Proben nach Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Der Boden des den Dichtegradienten enthaltenden Zentrifugenröhrchens wurde durch Einsetzen in den Fraktionator mit einer Nadel punktiert. Die Öffnung der Nadel blieb dabei knapp über dem Boden des Zentrifugenröhrchens. Das untere Ende der Nadel war mittels zweier Schlauchstücke aus Teflon PFA und einen dazwischengeschalteten Viton-

Pumpenschlauch über eine peristaltische Pumpe mit einem Fraktionssammler verbunden. Die Pumprate der peristaltischen Pumpe wurde jeweils vor der Fraktionierung einer Probengruppe (6 Proben entsprechend dem Fassungsvermögen des SW41.TI Rotors) durch Messung des innerhalb 10 min gepumpten Volumens bestimmt. Entsprechend der sich aus dem gewünschten Fraktionsvolumen mit der Pumprate ergebenden Pumpzeit wurde die Probe durch Vorrücken des Auslaufs am Fraktionssammler in Fraktionen unterteilt und in vorgewogenen Reagenzgläsern gesammelt. Das Gewicht der Fraktionen wurde durch Rückwiegen bestimmt. Vor der Bestimmung der Komponenten-Gehalte wurden die Lösungen auf einem Vortex-Mixer homogenisiert.

2.7.1.6 Ermittlung der Volumina von mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation erhaltenen Lipoproteinfraktionen aus deren Massen zur Berechnung des Lipidgehalts aus der Konzentration

Zur Berechnung der Lipoprotein-Gehalte in unterschiedlichen Fraktionen in mg aus den Lipoprotein-Konzentrationen war die Kenntnis der Fraktionsvolumina nötig. Bei Anwendung der oben beschriebenen Methode werden jedoch nur die Massen, nicht aber die Volumina der einzelnen Fraktionen bestimmt. Es war daher nötig, die Dichte der einzelnen Fraktionen zu bestimmen. Abbildung 2-1 zeigt die mittels eines Pyknometers gemessenen Dichten einer Reihe von 0,15 M NaCl-Lösungen, die mit ansteigenden Mengen NaBr versetzt wurden, gegen den Brechungsindex dieser Lösungen aufgetragen. Während Abbildung 2-1 zeigt, daß die Brechungsindizes von NaBr-Lösungen in 0,15 M NaCl im fraglichen Dichtebereich linear von der Dichte der Lösung abhängen und damit zu ihrer Bestimmung herangezogen werden können, kann diese Behandlung nicht auf mit NaBr versetztes Plasma angewendet werden. Der Brechungsindex wird von den verschiedenen Plasmainhaltsstoffen (Lipide, Proteine, Salze) in nicht reproduzierbarer Weise beeinflusst.

Es wurde daher eine Trennung wie unter 2.7.1.8.2 beschrieben durchgeführt, bei der anstelle von Plasma wäßrige 0,15 M NaCl als Probe diente. Die Dichte der einzelnen Fraktionen konnte damit über die Brechungsindizes mittels der Gleichung der Regressionsgeraden aus Abbildung 2-1 ($d = -6,6367 + 5,728 \times n_{20}^D$) bestimmt werden. Es wurde der Mittelwert der Dichten der einzelnen Fraktionen aus drei Trennungen ermittelt, und mit den so gefundenen Dichten die Volumina der Fraktionen bekannter Masse aus der Trennung von Plasmaproben errechnet. Damit ließen sich Protein- und Lipidgehalte aus den bekannten Konzentrationen in

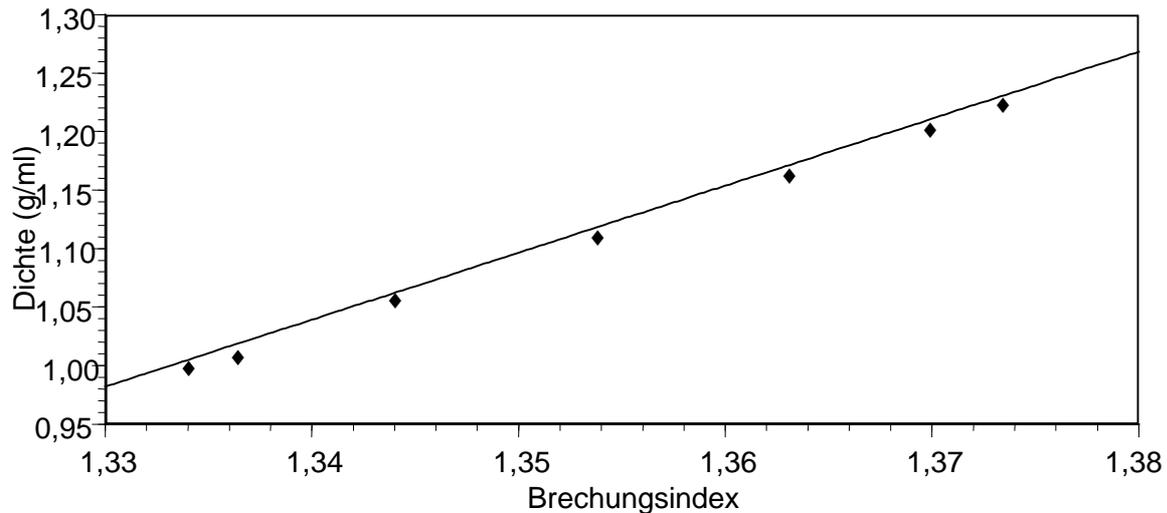


Abbildung 2-1: Dichte von Lösungen von NaBr in 0,15 M NaCl dargestellt als Funktion des Brechungsindex der Lösung zur Bestimmung der Dichte aus dem Brechungsindex. Lineare Regression liefert: $d = -6,6367 + 5,728 \times n_{20}^D$

guter Näherung erhalten. Radioaktivitätsgehalte wurden direkt aus der Szintillationszählung eingewogener Proben der Fraktionen mit deren Masse bestimmt.

2.7.1.7 Überprüfung der Reinheit der isolierten Lipoproteinfraktionen

2.7.1.7.1 Lipoprotein-Elektrophorese mit Lipoprint LDL System

25 µl der zu untersuchenden Probe wurden nach Angaben des Herstellers (Quantimetrix Co., Hawthorne, CA, USA) auf einem 3 % Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch getrennt und die Lipoproteine durch Anfärben des Proteinanteils mit 7-[4-(Benzolazo)-naphthyl-1-azo]-2,2-dimethyl-2,3-dihydropiperidin (Sudanschwarz) sichtbar gemacht.

2.7.1.7.2 Lipoprotein-Elektrophorese mit Electrophoresis System Lipoprotein Kit

1 µl der zu untersuchenden Probe wurden nach Angaben des Herstellers (Ciba Corning Diagnostics, Medfield, MA, USA) auf einem Celluloseacetat-Gel elektrophoretisch getrennt und die Lipoproteine durch Anfärben des Lipidanteils mit Fettrot 7B sichtbar gemacht.

2.7.1.8 Trennung des Plasmas in Lipoproteinfraktionen

2.7.1.8.1 Trennung in einem Schritt

Plasma wurde auf die Dichte $d = 1.24$ g/ml durch Zugabe von 0,397 g NaBr/ml Plasma eingestellt. Dann wurden 2 ml Aliquot des Plasmas nacheinander mit 4 Lagen wässriger

Lösungen, die mittels NaCl/NaBr auf unterschiedliche Dichten eingestellt waren, überlagert: 3 ml der Dichte $d = 1,231 \text{ g/ml}$, 2 ml der Dichte $d = 1,064 \text{ g/ml}$, 2,5 ml der Dichte $d = 1,016 \text{ g/ml}$ und 1 ml der Dichte $d = 1,006 \text{ g/ml}$. Nach Zentrifugieren bei $288.000 \times g$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 h wurde die Probe in 32 Fraktionen zu je ca. $330 \text{ }\mu\text{l}$ unterteilt. Alle Fraktionen wurden elektrophoretisch auf ihren Gehalt an HDL, LDL und VLDL sowie am Analyseroboter auf ihren Proteingehalt untersucht.

2.7.1.8.2 Trennung in zwei Schritten

Plasma wurde auf die Dichte $d = 1.23 \text{ g/ml}$ durch Zugabe von $0,371 \text{ g NaBr/ml}$ Plasma eingestellt. Dann wurden $2,5 \text{ ml}$ Aliquot des Plasmas nacheinander mit 3 Lagen wäßriger Lösungen, die mittels NaCl/NaBr auf unterschiedliche Dichten eingestellt waren, überlagert: $1,5 \text{ ml}$ der Dichte $d = 1,064 \text{ g/ml}$, 3 ml der Dichte $d = 1,016 \text{ ml}$ und $4,5 \text{ ml}$ der Dichte $d = 1,006 \text{ g/ml}$. Nach zentrifugieren bei $288.000 \times g$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ für $2,5 \text{ h}$ wurde die Probe in je drei Fraktionen zu $3,2 \text{ ml}$ (Plasmaproteine und HDL), $1,6 \text{ ml}$ (LDL) und $6,7 \text{ ml}$ (VLDL) unterteilt.

Zur Isolierung der HDL von den Plasmaproteinen wurde ein weiterer Trennungsschritt durchgeführt. 1 ml der diese Komponenten enthaltenden Fraktion wurde mit einer Glas-Tuberkulinspritze in ein vorgewogenes $13 \times 51 \text{ mm}$ Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von $55 - 65 \text{ mg NaBr}$ wurde eine Dichte von ca. $d = 1,25 \text{ g/ml}$ eingestellt. Anschließend wurde diese Lösung wie oben beschrieben mit $1,5 \text{ ml}$ einer NaCl/NaBr-Lösung der Dichte $d = 1,21 \text{ g/ml}$ überschichtet. Nach Zentrifugation bei $412.000 \times g$, 2 h , $16 \text{ }^\circ\text{C}$, wurde 1 ml der Lösung mittels einer Glas-Tuberkulinspritze von oben abgesaugt. Dazu wurde eine auf eine Länge von $0,5 \text{ cm}$ gekürzte, rundgefeilte Spinalnadel auf die Spritze aufgesetzt und das in die Lösung eintauchende Ende der Nadel immer am Meniskus der Flüssigkeit gehalten. Diese die Lipide enthaltende Fraktion wurde in ein vorgewogenes Reagenzglas überführt und eine zweite Fraktion von $0,25 \text{ ml}$ von oben abgenommen. Diese Zwischenfraktion enthielt in der Regel sowohl einen geringen Anteil der Lipide wie auch einen signifikant höheren Proteinanteil (verglichen mit dem in HDL zu erwartenden Protein/Lipid-Verhältnis) und wurde als Mischfraktion nur zur Berechnung der Wiederfindungsrate berücksichtigt. Die im Zentrifugenröhrchen verbliebenen ca. $1,25 \text{ ml}$ wurden erneut mit $1,5 \text{ ml}$ Saline der Dichte $d = 1,21 \text{ g/ml}$ überschichtet und das Verfahren analog wiederholt. Die jeweiligen Lipid- und Mischfraktionen wurden mit denjenigen aus

dem 1. Durchlauf vereinigt und alle Fraktionen auf einem Vortex-Mixer homogenisiert. Das Gewicht der einzelnen Fraktionen wurde durch Rückwiegen bestimmt.

In allen Fraktionen sowie in einer Probe des unbehandelten Plasmas wurden auf dem Analyseroboter die Konzentrationen von Proteinen, Cholesterinen, und Triglyzeriden, in einigen Fällen auch von freiem Glycerin und Phospholipiden, bestimmt.

2.7.1.9 Herstellung Lipoprotein-freien Plasmas

Je 2 ml Plasma von Mensch bzw. Ratte wurden durch Zugabe von 0,633 g NaBr auf die Dichte $d = 1,23 \text{ g/ml}$ eingestellt und in $13 \times 89 \text{ mm}$ Polyallomer-Zentrifugenröhrchen eingebracht. Diese wurden zunächst mit 3 ml einer NaCl/NaBr-Lösung der Dichte $d = 1,21 \text{ g/ml}$ und anschließend mit 6,5 ml deionisiertem Wasser überschichtet. Nach Zentrifugation für 24 h bei $288.000 \times g$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, wurde der Boden des Zentrifugenröhrchens durch Einsetzen in den Fraktionator punktiert und 1 ml Flüssigkeit vom Boden des Zentrifugenröhrchens abgepumpt. Diese Fraktion wurde dann gegen 2 mal 500 ml Phosphatpuffer für insgesamt 24 h dialysiert. Die resultierende Lösung enthielt $<2\%$ (unterhalb der Detektionsgrenze) des Lipidgehalts des ursprünglichen Plasmas.

2.7.1.10 Elektrophoretische Trennung isolierter Plasmaproteine

Als Gelpuffer diente eine wäßrige Lösung der Zusammensetzung 45 mM Tris, 25 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,4 bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$, als Elektrodenkammerpuffer eine wäßrige Lösung der Zusammensetzung 13 mM Tris, 75 mM Borsäure, 6 mM EDTA, pH 8,4 bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ¹⁴³. Zur Herstellung der Fixierlösung wurden 12,5 g (55 mmol) Pikrinsäure in 830 ml Wasser gegeben und unter leichtem Rühren 24 h bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde die kräftig gelbe Lösung filtriert und mit 170 ml Eisessig versetzt. Entfärberlösung wurde durch Mischen von 450 ml Wasser mit 450 ml Methanol und 100 ml Eisessig hergestellt. Zum Anfärben der Proteine diente eine 4,1 mM Lösung von Dinatrium-8-amino-2-benzolazo-7-(4-nitrobenzolazo)-1-naphthol-3,6-disulfonsäure (Amidoschwarz) in Entfärberlösung.

0,5 g Agarose wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 50 ml Gelpuffer versetzt und der Erlenmeyerkolben mit Haushalts-Frischhaltefolie verschlossen. Die Suspension wurde in einem Mikrowellenofen erwärmt bis eine klare Lösung entstanden war und sich erste Blasen zeigten. Unter leichtem Rühren wurde die Lösung auf ca. $60 \text{ }^\circ\text{C}$ abkühlen gelassen. Sie wurde dann in eine $14 \times 11 \text{ cm}$ (L x B) Gelhalterung, deren offene Seiten mit Tesafilm gegen Auslaufen gesichert waren, gleichmäßig ausgegossen. Ein quer zur

Laufrichtung in etwa in der Mitte des Gels (67 mm vom kathodischen Rand) eingesetzter Teflonkamm bewirkte die Aussparung von zwanzig 1×5 mm (L x B) Probenkammern. Nach Abkühlen des Gels auf RT wurden die Tesafilmstreifen entfernt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 900 ml auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühltem Elektrodenkammerpuffer gefüllt, die Halterung mit dem Gel in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und der Teflonkamm vorsichtig entfernt. Die Elektrophorese wurde in einem auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehaltenen Raum durchgeführt und das Gel vor der Probenaufgabe 5 min zur Einstellung des thermischen Gleichgewichts im gekühlten Puffer belassen.

50 μl des zu untersuchenden Lipoprotein-freien Plasmas bzw. einer Lösung von 50 g/l Human- oder Rattenserumalbumin (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) in Gelpuffer wurden mit 0,1 μCi ungereinigtem ^3H -TCDD in einem 13×75 mm Reagenzglas unter leichtem Schwenken 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in ein leeres Reagenzglas überführt, 60 min stengelassen und schließlich weitere 50 μl einer Lösung der Zusammensetzung 1,2 mM 3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulphonphthalein (Bromphenolblau) und 33 mM Glutathion in Glycerin/Wasser (2:1) zugegeben. Eine weitere 50 μl -Probe des Lipoprotein-freien Plasmas bzw. der Albuminlösung wurde mit Ausnahme der Zugabe von ungereinigtem ^3H -TCDD identisch behandelt. Je 5 μl der ungereinigtes ^3H -TCDD-enthaltenden Lösung wurden in die Probenvertiefungen 3,5,7 und 9, je 5 μl der Kontrollösung in die Probenvertiefungen 12, 14, 16 und 18 des Gels überführt. Von der radioaktiv markierten Lösung wurden zusätzlich je 3 mal 5 μl zur Bestimmung der Wiederfindungsrate in Szintillationsgläser überführt.

Nach der Probenaufgabe wurde die Trennung durch Einschalten der Spannungsversorgung in Gang gesetzt. Nach ca. 15 min wurde eine Pumpe zugeschaltet, die den Elektrodenkammerpuffer mit ca. 30 ml/min umwälzte. Die dem Bromphenolblau zuzuschreibende blaue Bande war zu diesem Zeitpunkt einige mm in das Gel vorgedrungen; ein Ausschwemmen der Probe aus der Probenvertiefung durch Umwälzen des Puffers sollte so vermieden werden. Eine Spannung von 80 V (5,7 V/cm) wurde für 5,5 h aufrechterhalten. Nach Beendigung der Trennung wurde das Gel mit der Gelhalterung aus dem Gerät genommen und mit einem Skalpell in Laufrichtung der Bahnen zwischen den Bahnen 10 und 11 zerteilt.

Die Gelhälfte mit den Bahnen 11 - 20 (ohne ungereinigtes ^3H -TCDD) wurde in einer mit Fixierlösung gefüllten Stahlwanne 15 min leicht geschwenkt. Das nun leuchtend gelbe Gel

wurde zwischen zwei Papierfilter gelegt und unter leichtem Andruck (Auflegen einer Glasplatte, ca. 250 g) zwischen zwei Stapeln Zellstoff weitestgehend von überflüssiger Fixierlösung befreit. Das feuchte Gel wurde dann in eine Stahlwanne verbracht und soviel der Farbreagenz enthaltenden Lösung zugegeben, daß das Gel gerade bedeckt war. Nach 10 min unter leichtem Schwenken wurde die Lösung des Farbreagenz gegen Entfärberlösung ausgetauscht, 10 min leicht geschwenkt und die Entfärberlösung nochmals gegen eine frische Charge ausgetauscht. Nach weiteren 10 min unter leichtem Schwenken war der Gelhintergrund völlig klar. Das Gel wurde auf Zellstoff soweit wie möglich getrocknet, auf GelBond Film (SpectraPor, Los Angeles, CA, USA) übertragen und unter Auflegen einer Lage Filterpapier sowie einer Glasplatte über Nacht getrocknet. So konnte ein Aufwellen des Gels während der Trocknung verhindert werden. Eine semiquantitative Erfassung der Verteilung der Proteine in den angefärbten Kontrollbahnen gelang durch Einlesen auf dem Densitometer (Messung der Extinktion im Transmissionsmodus bei 595 nm).

Die Gelhälfte mit den Bahnen 1 - 10 wurde mittels eines Skalpell entlang der nicht benutzten Bahnen 4, 6 und 8 in 4 Streifen geschnitten. Die so erhaltenen Streifen wurden auf einer mit Millimeterpapier hinterlegten Glasplatte in Stücke der Länge 2,4 cm, 2 cm, 2 x 1 cm, 0,8 cm, 12 x 0,5 cm und 0,8 cm (beginnend vom kathodischen Ende) zerschnitten. Der Radioaktivitätsgehalt in den Stücken wurde nach Schmelzen im Mikrowellenofen bestimmt. Die Wiederfindungsraten beliefen sich auf 41 ± 9 % der eingesetzten Radioaktivität.

Um die Plasmaproteine nach einer Trennung klassifizieren zu können, wurden mit der hier beschriebenen Methode, jedoch ohne Zusatz von ^3H -TCDD, zusätzlich je eine Trennung der folgenden Lösungen durchgeführt: Je eine Probe aus Human- bzw. Rattenplasma isolierter Proteine, 50 g humanes Serumalbumin/l Gelpuffer, 50 g Rattenserumalbumin/l Gelpuffer, 30 g Immunglobulin (Cohn Fraktion 3; 13 % α_2 , 58 % β , 29 % γ)/l Gelpuffer, 30 g Immunglobulin (Cohn Fraktion 4; 23 % Albumin, 62 % α , 12 % β , 4 % γ)/l Gelpuffer (alle Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA; Zusammensetzung laut Angaben des Herstellers).

2.7.1.11 Extraktion von ^3H -TCDD und Verunreinigungen aus Vollblut bzw. Plasma

Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz der Methoden wurden 2 ml Vollblut, Blutzellfraktion oder Plasma mit 0,1 μCi ungereinigtem ^3H -TCDD inkubiert. Die aufgenommene Aktivität wurde durch Szintillationszählung gewogener Proben bestimmt. Die Proben wurden den unten beschriebenen Extraktionsverfahren unterzogen.

2.7.1.11.1 Fest/Flüssig-Kaltextraktion mit CH₂Cl₂/Cyclohexan bzw. CH₂Cl₂/Cyclohexan/ Azeton

Ca. 150 mg Vollblut, Zellfraktion oder Plasma wurden mit Na₂SO₄/Seesand (Gew.-Verhältnis Na₂SO₄/Blut 10:1 bzw. 100:1; Na₂SO₄/Seesand 1:1) verrieben. Eine Chromatographiesäule wurde mit 10 g Na₂SO₄ beschickt, das Gemisch darauf gegeben und weitere 5 g Na₂SO₄ darüber geschichtet. Es wurde mit 150 ml CH₂Cl₂/Cyclohexan (Vol.-Verhältnis 1:1) bzw. CH₂Cl₂/Cyclohexan/Azeton (Vol.-Verhältnis 1:1:1) extrahiert und das Eluens in einem 250 ml Rundkolben gesammelt. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 3 ml eingengt. Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz wurde die Lösung in ein Szintillationsglas überführt, der Rundkolben mit 3 x 1,5 ml Toluol nachgespült und die Waschflüssigkeiten mit dem Extrakt vereinigt. Die verbliebene Flüssigkeitsmenge wurde im Stickstoffstrom auf ca. 1 ml eingengt und die Radioaktivität durch Szintillationszählung bestimmt. Die durchschnittliche Extraktionseffizienz betrug 63 ± 21 % (n = 3), 55 ± 35 % (n = 4) bzw. 61 ± 7 % (n = 3) bei der Extraktion von Vollblut, Plasma bzw. Zellfraktion mit CH₂Cl₂/Cyclohexan und 51 ± 21 % (n = 3) bei der Extraktion von Plasma mit CH₂Cl₂/Cyclohexan/Azeton.

2.7.1.11.2 Heißextraktion von Plasma mit Toluol

Die Extraktion erfolgte analog 2.7.1.11.1 mit folgenden Modifikationen:

Ca. 150 mg Vollblut, Blutzellfraktion bzw. Plasma wurden mit Na₂SO₄/Seesand (Gew.-Verhältnis. Na₂SO₄/Probe 100:1; Na₂SO₄/Seesand 1:1) verrieben. Das Gemisch wurde in eine Soxhlehöhle (33 x 90 mm; Schleicher + Schüll, Dassel) überführt und 24 h mit 250 ml Toluol unter Rückfluß extrahiert. Die durchschnittliche Extraktionseffizienz betrug 44 ± 1 % (n=2).

2.7.1.11.3 Flüssig/Flüssig-Extraktion von Plasma mit Toluol nach Denaturierung des Plasmas

Ca. 150 mg Plasma wurden in einem 32 x 12 mm HPLC-Probengläschen (Merck, Darmstadt, Schraubkappen mit Teflondichtung), vorgelegt und denaturierendes Agens zugegeben. Das Gemisch wurde einer Temperaturbehandlung unterzogen und anschließend mit 4 x 0,5 ml Toluol versetzt und ca. 2 min heftig per Hand geschüttelt. Zur vollständigen Phasentrennung wurde das Gemisch 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Das Extraktionsmittel wurde dann mit einer Pasteurpipette von der wäßrigen Lösung abpipettiert und in einem 100 ml Spitzkolben

bzw. zur Bestimmung der Wiederfindungsrate in einem Szintillationsglas gesammelt. Die in der Umlösung verbliebene Aktivität wurde direkt oder nach Abfiltrieren etwaiger fester Rückstände (Glas Microfiber Filter, Whatman, Maidstone, GB) durch Szintillationszählung bestimmt. Die auf dem Filter verbliebene Aktivität wurde durch Verbrennung des Filters am Verbrennungsautomaten bestimmt. Tabelle 2-2 zeigt eine Zusammenstellung der erprobten denaturierenden Agentien sowie der Temperaturbehandlungen.

Die Extraktion nach Behandlung mit 10 N HCl, 14 h, 115 °C, erwies sich als die effizienteste Methode und wurde daher für die Extraktion von Plasma und Plasmafraktionen gewählt. Die Extraktion größerer Volumina (Plasmafraktionen) erfolgte in 20 ml Zentrifugengläsern (Schraubkappen mit Teflondichtung) unter Beibehaltung der Volumenverhältnisse (Plasma:10 N HCl:Toluol 1,5:2,25:5) durchgeführt. Beim Einengen des Extrakts auf 10 µl für die HPLC-Analyse fiel ein farbloser bis gelblicher, wachsartiger Niederschlag aus. Die Extrakte wurden deshalb zunächst durch Chromatographie an einer Sandwichsäule gereinigt. Lag das zur Extraktion verwendete Toluolvolumen über 3 ml, so wurde der Extrakt zunächst im Stickstoffstrom auf ca. 3 ml eingengt.

2.7.1.12 Chromatographie von Plasmaextrakten an der Sandwichsäule zur Vorbereitung der Proben für die HPLC

Die Chromatographiesäule wurde zur Hälfte mit Hexan befüllt und nacheinander mit den

Tabelle 2-2: Flüssig/Flüssig-Extraktion von Plasma mit Toluol nach Denaturierung des Plasmas: Verwendete denaturierende Agens und Temperaturbehandlungen

Denaturierendes Agens (Zugabe je 150 mg Plasma)	Temperaturbehandlung	Beobachtungen	Extraktions-effizienz [%]
Unbehandelte Kontrolle	unbehandelte Kontrolle	Farbloser Niederschlag	67 ± 4
500 µl Soluene*	50 °C/14 h	Emulsion	15 ± 1
150 µl 9 N KOH	50 °C/4 h	Emulsion	14 ± 4
225 µl 10 N HCl	50 °C/4 h	Farbloser bis grauer Niederschlag	8 ± 3
150 µl 9 N KOH	115 °C/14 h	Klar, dunkelgelb; Niederschlag bei Zugabe von Toluol	5,1 ± 0,3
225 µl 10 N HCl	115 °C/14 h	Schwarzer, flockiger Niederschlag	93,5 ± 0,4

* Soluene Gewebelöser; Canberra Packard GmbH, Dreieich

folgenden Materialien beschickt, die zuvor in Hexan aufgeschlämmt worden waren: 5 g Na_2SO_4 , 2,5 g Silica, 5 g Silica/44 Gew.% konz. H_2SO_4 , 2,5 g Silica/33 Gew.% 1 N NaOH, 5 g Na_2SO_4 . Danach wurde die Säule mit 40 ml Hexan und anschließend mit 40 ml Cyclohexan/ CH_2Cl_2 (Vol.-Verhältnis 1:1) gespült. Der Plasmaextrakt in Toluol wurde auf die Na_2SO_4 -Schicht aufgegeben und der Spitzkolben mit 3×1 ml Toluol gespült; die Spülflüssigkeiten wurden ebenfalls auf die Säule gebracht. Es wurde mit 150 ml Cyclohexan/ CH_2Cl_2 (Vol.-Verhältnis 1:1) eluiert (1 Tropfen/s). Das Eluat wurde in einem 250 ml Rundkolben aufgefangen, am Rotationsverdampfer auf ca. 3 ml eingengt und in einen Spitzkolben überführt. Der Rundkolben wurde mit $3 \times 1,5$ ml Toluol nachgespült und die Waschflüssigkeiten im Spitzkolben gesammelt. Das verbliebene Volumen wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 200 μl reduziert und anschließend mit einer Pasteurpipette in 100 μl Aliquot in eine 2 ml Rollrandflasche mit 200 μl -Mikro-Einsatz (Abimed Analysen Technik, Langenfeld) transferiert. Nach jedem Aliquot wurde das Lösungsmittel bis fast zur Trockne im leichten Stickstoffstrom vertrieben. Zuletzt wurde der Spitzkolben mit 3×100 μl Toluol gespült und diese ebenfalls in den Mikro-Einsatz überführt. Das Gesamtvolumen wurde im leichten Stickstoffstrom bis auf etwa 10 μl reduziert und zur Einspritzung in die HPLC verwendet.

2.7.1.13 Untersuchung der radiochemischen Reinheit von ungereinigtem ^3H -TCDD in einer Standardlösung oder in Plasmaextrakten mittels HPLC

In einem 500 ml Erlenmeyerkolben wurden 255 ml deionisiertes Wasser mit 45 ml Methanol gemischt und die Lösung 30 min in einem Ultraschallbad entgast. Anschließend wurde zum vollständigen Entgasen für 5 min Helium durch die Lösung strömen gelassen. Der Erlenmeyerkolben wurde als Vorratsgefäß an die HPLC-Apparatur angeschlossen und die Pumpe mit einer Flußrate von 0,5 ml/min in Gang gesetzt. Nach ca. 30 min war die Extinktion des reinen Elutionsmittels bei 250 nm am Detektor konstant.

Ein Volumen von 4,5 μl einer Lösung von 31 nM TCDD in Toluol wurde in einer 20 μl Hamiltonspritze (Hamilton Inc., Reno, NV, USA) aufgezogen. Weitere 2 μl wurden leer aufgezogen, um eine kleine Luftblase in der Spritze zu erhalten. Dann wurden 10 μl des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards oder ein auf 10 μl eingengter gereinigter Plasmaextrakt aufgezogen. Der den Plasmaextrakt enthaltende Mikro-Einsatz wurde mit ca. 3 μl Toluol gespült und diese ebenfalls in die Spritze gezogen. Das gesamte Volumen wurde in das Injektionsventil eingespritzt und die Trennung durch das Öffnen des Ventils gestartet. Das

Öffnen des Ventils startete gleichzeitig eine Zeituhr am UV/VIS-Detektor. Am Detektor wurde die Extinktion des Elutionsmittels bei 250 nm gemessen.

Zur Charakterisierung der Verteilung des Radioaktivitätsgehalts auf ^3H -TCDD und Verunreinigungen wurde beginnend mit dem Öffnen des Injektionsventils am Auslauf des Detektors das Elutionsmittel in Szintillationsgläsern fraktioniert gesammelt. Die Fraktionen wurden per Hand gewechselt. Während der ersten 20 min der Trennung wurden die Fraktionen alle 5 min gewechselt, danach erfolgte der Wechsel minütlich. Die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wurde durch Szintillationszählung bestimmt. Die Abbildung 2-2 zeigt die bei der Einspritzung des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards gefundene Verteilung der Radioaktivität als Funktion der Retentionszeit. Das auf die UV-Absorption des unmarkierten TCDD zurückzuführende Extinktionsmaximum trat stets zeitgleich mit dem steilen Anstieg des Radioaktivitätsgehalts bei ca. 75 min auf.

2.7.1.14 Isolierung von reinem ^3H -TCDD sowie der in ungereinigtem ^3H -TCDD enthaltenen Verunreinigungen

Zur Isolierung des reinen ^3H -TCDD bzw. der Verunreinigungen wurden 3 mal je 30 μCi des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards in je 20 μl Toluol ohne Zusatz von unmarkiertem TCDD eingespritzt. Das Elutionsmittel wurde in 13 x 75 mm Reagenzgläsern am Auslauf in Fraktionen zu je 2 min gesammelt. Zeitgleiche Fraktionen aus den drei Trennungen wurden vereinigt und der radioaktive Gehalt in 10 μl -Proben durch Szintillationszählung bestimmt.

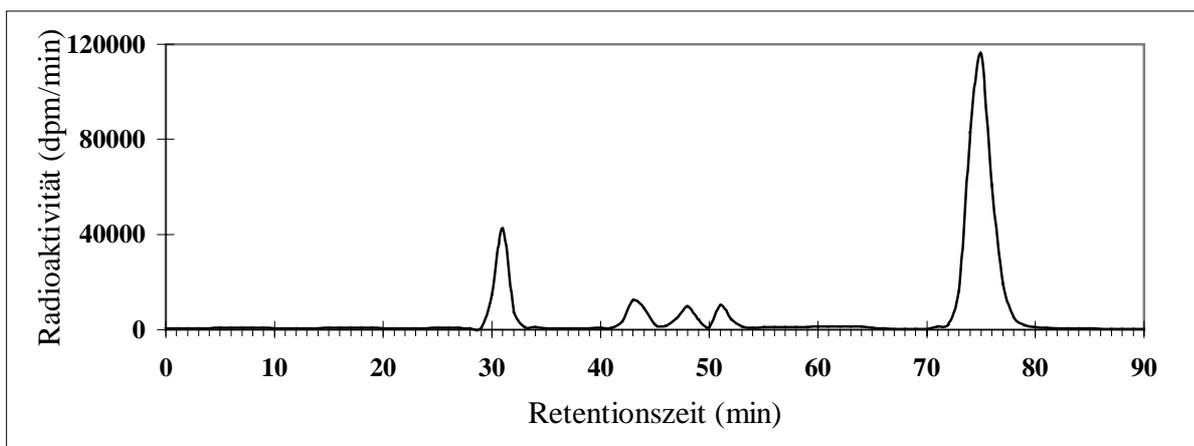


Abbildung 2-2: HPLC-Chromatogramm des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards. Chromatographische Bedingungen: T = 25°C; 1 ml/min Methanol/Wasser (85/15 Vol./Vol.); Bakerbond PAH 16-PLUS, 250 x 3.0 (L x i.D.); Der Hauptpeak bei 72 - 77 min wurde durch Vergleich mit der Retention nicht markierten TCDD (Detektion der UV-Absorption) als ^3H -TCDD identifiziert

Die Verunreinigungen (28 – 34 min, 40 – 56 min) bzw. reines ^3H -TCDD (70 – 80 min) enthaltenden Fraktionen wurden in zwei 250 ml Rundkolben vereinigt, die Reagenzgläser mit je 3 x 1,5 ml Isopropanol nachgespült und weitere 100 ml Isopropanol zugegeben. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 3 ml eingeengt, wobei das im Elutionsmittel enthaltene Wasser als Azeotrop mit Toluol und Isopropanol (48,7 % Toluol, 38,2 % Isopropanol, 13,1 % Wasser, Siedepunkt 76,3 °C bei 1013,25 hPa¹⁴⁴) zuerst übergeht. Die verbliebenen Lösungen wurden portionsweise unter wiederholtem Abblasen überschüssigen Solvens im leichten Stickstoffstrom in 2 ml HPLC-Probengläschen überführt und der Rundkolben mit je 3 x 1,5 ml Toluol nachgespült. Bei der Einspritzung je eines 10 µl Aliquot beider Lösungen fanden sich keine Verunreinigungen mehr im gereinigten ^3H -TCDD und kein ^3H -TCDD in der Fraktion der Verunreinigungen. Für den Transport nach Kansas City wurde das Lösungsmittel im leichten Stickstoffstrom bis zur Trockne abgeblasen.

2.7.2 Experimenteller Ansatz

2.7.2.1 Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung von ^3H -TCDD/TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion

Das Plasma von mehreren menschlichen Spendern wurde vereinigt und je ein 2,9 ml Aliquot mit

- a. 8,8 nCi ungereinigtem ^3H -TCDD, bzw.
- b. 0,95 µCi ungereinigtem ^3H -TCDD, bzw.
- c. 1,0 µg (3,2 nmol; 1,3 µCi) isotonenverdünntem ungereinigtem ^3H -TCDD/TCDD (Isotopenverhältnis 1:70 bezogen auf die reinen Substanzen), bzw.
- d. 32 µg (98 nmol; 0,69 µCi) isotonenverdünntem ^3H -TCDD/TCDD (Isotopenverhältnis 1:4120 bezogen auf die reinen Substanzen)

inkubiert. Das Plasma wurde in Plasmaproteine und die verschiedenen Lipoproteinfraktionen aufgetrennt und der Radioaktivitätsgehalt in allen Fraktionen und im Plasma bestimmt.

2.7.2.2 Untersuchung der Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD zwischen Zellfraktion und Plasma

Je zwei 1 ml Aliquot Vollblut wurden mit 0,02 µCi ungereinigtem ^3H -TCDD inkubiert. Nach der Gleichgewichtseinstellung wurde das Plasma von der Zellfraktion durch Zentrifugation

abgetrennt. Die Zellfraktion wurde dreimal mit eiskalter isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und die Radioaktivität in der Zellfraktion, in Plasma und in den Waschflüssigkeiten sowie die Konzentrationen von Proteinen, Cholesterinen und Triglyzeriden im Plasma wurden bestimmt. Je 3 Individuen beider Arten (Mensch, Ratte) wurden beprobt.

2.7.2.3 Untersuchung der Abhängigkeit der Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion von der Verteilung der Lipide

Je 10 ml Plasma von einem menschlichen Spender bzw. aus einem Pool von 3 Ratten wurde mit 0,18 μCi ungereinigtem ^3H -TCDD inkubiert. Drei Aliquot zu je 3 ml wurden entnommen, in Plasmaproteine und die verschiedenen Lipoproteinfraktionen aufgetrennt und anfangs nur die Gehalte an Radioaktivität, Proteinen, Cholesterinen und Triglyzeriden in allen Fraktionen und im Plasma bestimmt. In späteren Versuchen (siehe 3.1.1) wurde zusätzlich der Gehalt an Phospholipiden und freiem Glycerin ermittelt. 6 Individuen (Mensch) bzw. 6 Pools aus je 3 Ratten wurden beprobt.

2.7.2.4 Untersuchung der Bindung von ^3H -TCDD an Plasmaproteine

Das zu untersuchende Plasma wurde aus Vollblutproben isoliert, die Lipoproteine abgetrennt, und die Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD innerhalb der Plasmaproteine elektrophoretisch charakterisiert. Je 5 Individuen beider Gattungen (Mensch, Ratte) wurden beprobt. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den unter Verwendung reinen Human- (n=3) bzw. Rattenserumalbumins (n=3) gefundenen Verteilungen im Gel verglichen.

2.7.2.5 Validierung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Verteilung von TCDD in Blut von Mensch und Ratte

2.7.2.5.1 Extraktion von mit ^3H -TCDD inkubiertem Plasmafraktionen und Quantifizierung der Verunreinigungen mittels HPLC

Je 10 ml Plasma von einem menschlichen Spender bzw. aus einem Pool von 3 Ratten wurde mit 1 μCi ungereinigtem ^3H -TCDD inkubiert. Diesen Proben wurden je drei Aliquot zu 3 ml entnommen, in Plasmaproteine und die verschiedenen Lipoproteinfraktionen aufgetrennt und die Gehalte an Radioaktivität, Proteinen, Cholesterinen und Triglyzeriden, Phospholipiden und freiem Glycerin in allen Fraktionen und im Plasma bestimmt. Die verbliebenen Fraktionsmengen wurden in Probengläschen verpackt nach Neuherberg transportiert und dort je zwei der drei Fraktionsserien pro Spezies nach der Denaturierung mit 10 N HCl mit Toluol

extrahiert. Dabei wurden zunächst nur geringe Mengen des ursprünglich eingesetzten ^3H -TCDD wiedergefunden, die Wiederfindungsrate lag bei $19 \pm 8 \%$ ($n = 22$). Bei näherer Untersuchung der zum Transport verwendeten Probengläschen wurde festgestellt, daß Schraubkappen mit einer Kautschukdichtung zum Einsatz gekommen waren. Nach Heißextraktion der Schraubkappen mit Toluol für 24 h analog 2.7.1.11.2 wurden die eingengten Extrakte mit den Extrakten der Plasmafraktionen vereinigt, die Wiederfindungsrate betrug danach $83 \pm 12 \%$ ($n = 22$). Die relativen Gehalte an reinem ^3H -TCDD und den Verunreinigungen wurden mittels HPLC-Analyse in den vereinigten Extrakten bestimmt.

2.7.2.5.2 Untersuchung der Verteilung von reinem ^3H -TCDD bzw. der isolierten Verunreinigungen in Plasmafraktionen, Vergleich mit der Verteilung des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards

Reines ^3H -TCDD und die in dem ^3H -TCDD-Standard enthaltenen Verunreinigungen wurden durch präparative HPLC getrennt isoliert. Je 10 ml Plasma von einem menschlichen Spender wurden mit 2,63 ng (8,09 pmol; 0,2 μCi) gereinigtem ^3H -TCDD, 0,2 μCi der isolierten Verunreinigungen bzw. 0,2 μCi des verunreinigten ^3H -TCDD inkubiert. Zwei Aliquot zu je 3 ml wurden entnommen, in Plasmaproteine und die verschiedenen Lipoproteinfraktionen aufgetrennt und die Gehalte an Radioaktivität, Proteinen, Cholesterinen, Triglyzeriden, Phospholipiden und freiem Glyzerin in allen Fraktionen sowie im Plasma bestimmt.

2.8 Einleitende Versuche zur Bestimmung von Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizienten: Bestimmung der Adsorptionskonstante von ^3H -TCDD an Albumin bzw. Bestätigung der Löslichkeit von ^3H -TCDD in Puffer

2.8.1 Herstellung der RS-Albuminlösungen

0,5 g RS-Albumin wurden in einen 100 ml Messkolben gegeben, 50 ml Phosphatpuffer zugegeben und die Lösung bis zur völligen Auflösung des Feststoffs gerührt. Anschließend wurde mit Phosphatpuffer auf 100 ml aufgefüllt, um eine Albuminlösung der Konzentration 5 g/l zu erhalten. Zur Herstellung verdünnterer Lösungen wurden X ml dieser Lösung in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt, mit Phosphatpuffer auf 100 ml aufgefüllt und wiederum 15 min gerührt (ergibt Konzentration $(X/200)$ g/l). Zuletzt wurden die Proteinkonzentrationen auf einem Analyseroboter bestimmt.

2.8.2 Inkubation von Proteinlösungen oder Puffer mit ^3H -TCDD als Bodenkörper

Ungereinigtes ^3H -TCDD bzw. mit TCDD isotonenverdünntes ungereinigtes ^3H -TCDD in Toluol wurde in 4 ml Probengläschen mit Schraubverschluss (Wheaton Science Products, Milville, NJ, USA) vorgelegt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom vertrieben. 2 ml Proteinlösung bzw. 2 ml Phosphatpuffer wurden zugegeben. Zum Schutz vor Licht wurde das verschlossene Gläschen für die Dauer des Versuchs in eine größere Braunglasflasche gestellt. Die enthaltene Lösung wurde auf einem Horizontalschüttler in leichter Bewegung gehalten (ca. 60 min^{-1}). In definierten Zeitabständen wurden Proben (20 – 50 μg) genommen und ihr Radioaktivitätsgehalt am Szintillationszähler bestimmt.

2.8.3 Inkubation von Proteinlösungen oder Puffer mit ^3H -TCDD unter Verwendung einer Dialysemembran

Lösungen von ungereinigtem ^3H -TCDD, ^{14}C -TCDD und TCDD in Toluol, welche die Komponenten in definierten molaren Verhältnissen enthielten (Annahme: 100 %ige Reinheit aller Komponenten), wurden hergestellt. Der Gehalt an radioaktiven Isotopen wurde durch Szintillationszählung bestimmt. Ein 4 - 5 cm langes Stück eines zuvor 24 h in Phosphatpuffer eingeweichten Dialyseschlauches (SpectraPor, Los Angeles, CA, USA; Molekulargewichtsgrenze 100.000 bzw. 1000 D) wurde an einem Ende mit einem Stück Aluminium-Haushaltsfolie (Dicke ca. 0,5 mm) verschlossen. Eine auf das einzusetzende RS-Albumin abgestimmte Menge der TCDD-Lösungen wurde auf einen 40 x 10 mm Filterpapierstreifen (Whatman, Maidstone, GB) oder in ein Aluminium-Mikrowägeschiffchen gegeben und an Luft bis zur völligen Trockne stehen gelassen. Der Papierstreifen bzw. das Aluminium-Mikrowägeschiffchen wurde in den Dialyseschlauch eingeführt und der Dialyseschlauch mit ca. 1 ml Wasser bzw. einer 0,82 μM RS-Albuminlösung gefüllt. Danach wurde auch das zweite Ende des Schlauchs mit Aluminiumfolie verschlossen und das Schlauchstück in ein 13 x 80 mm Reagenzglas eingebracht. Dem Reagenzglas wurden 3 - 5 ml Phosphatpuffer bzw. der entsprechenden RS-Albuminlösung zugesetzt, das Reagenzglas luftdicht verschlossen und unter Lichtschutz auf einem Horizontalschüttler in leichter Bewegung gehalten (ca. 60 min^{-1}). In bestimmten Zeitabständen wurden Proben (20 – 50 μg) entnommen und ihr Radioaktivitätsgehalt am Szintillationszähler bestimmt. Nach Beendigung des Experiments wurde die im Dialyseschlauch befindliche Lösung, der Filterpapierstreifen bzw. das Aluminium-Mikrowägeschiffchen sowie der Dialyseschlauch auf gelöste bzw. absorbierte Radioaktivität überprüft.

2.9 Untersuchung der Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihrer Beeinflussung durch Futterzusätze

2.9.1 Versuchstierhaltung

Als Versuchstiere wurden männliche, geschlechtsreife Tiere der Gattung *Rattus norvegicus*, Rasse Sprague-Dawley (Sasco, Omaha, Nebraska, USA) verwendet. Zum Zeitpunkt der Lieferung betrug das Körpergewicht der Tiere zwischen 200 und 220 g. Nach Angaben der Lieferfirma entsprach dies einem Alter von etwa 50 Tagen. Die Unterbringung erfolgte in einem klimakontrollierten Raum in den Stallungen der University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, USA, bei 22 °C, 40 - 60 % Luftfeuchtigkeit und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus (Licht von 6.00-18.00 Uhr). Die Kontrolle der Klimaanlage erfolgte durch einen Honeywell DeltaNet W1044 Computer (Honeywell, Minneapolis, MN, USA). Jedes Tier wurde einzeln mit freiem Zugang zu Leitungswasser und Futter untergebracht. Das Futter (Rodent Chow 5001, Ralston Purina, St. Louis, MO, USA) wurde in einer Futtermühle gemahlen. Die Nahrungsaufnahme der Tiere wurde durch Wiegen der Futterbehälter vor und nach dem Befüllen kontrolliert. Tiere, deren Fäzes und Urin gesammelt werden sollte, wurden in Metabolismuskäfigen aus Kunststoff (Nalgene, Rochester, NY, USA) mit Stahlgitterboden gehalten. Alle anderen Tiere wurden in Stahlkäfigen mit Gitterboden (Shoreline, Kansas City, MO, USA) gehalten. Die Käfige wurden jede Woche gegen frisch gespülte und autoklavierte Käfige derselben Bauart ausgewechselt. Bei der Spülung einiger Metabolismuskäfige mit Methanol zeigte sich, daß keine nennenswerten Verluste an Radioaktivität z.B. durch Haften an den Wänden der Käfige auftraten.

Alle Tiere wurden nach Lieferung für die gesamte Dauer der Versuche täglich zwischen 12.00 und 15.00 Uhr gewogen sowie äußerlich begutachtet. Zeigte ein Tier auffälliges Verhalten oder plötzlichen Gewichtsverlust wurde zunächst das Tierpflegepersonal der Animal Care Facilities zu Rate gezogen; in besonderen Fällen stand ein Veterinär zur Verfügung. Die Zähne der Tiere, die gemahlene Futter erhielten, wurden in regelmäßigen Abständen gekürzt. Grundlage der Tierhaltung und -behandlung waren die Richtlinien der Animal Care Facilities, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, USA, Protokollnummer: ACUP 89-03-05-00.

2.9.2 Methoden

2.9.2.1 Zubereitung des Futters mit Futtermittelzusätzen

Das gemahlene Futter wurde in einer Stahlwanne eingewogen, mit der entsprechenden Menge des Futtermittelzusatzes (Cholestyramin: 4 Gew.%; Hexadecan: 5 Gew.%) versetzt und innig vermischt.

2.9.2.2 Herstellung der Dosierlösungen

2 μCi ungereinigtes ^3H -TCDD, 6,15 μg (20,3 nmol, 10 μCi) isotopenverdünntes ungereinigtes ^3H -TCDD/TCDD (Isotopenverhältnis 1:49 bezogen auf die reinen Substanzen), 24,6 ng (81,3 pmol, 2 μCi) ^3H -TCDD oder 2 μCi aus dem verunreinigten ^3H -TCDD isolierter Verunreinigungen, gelöst in Toluol, wurden in einem Szintillationsglas vorgelegt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom ausgetrieben. Nach Zugabe von 8 ml Maisöl wurde das Szintillationsglas mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und das Maisöl für 96 h mit einem Teflonrührfisch gerührt. Anschließend wurde das Maisöl in einen Vorratsbehälter aus Braunglas überführt und weitere 24 h gerührt. Der Radioaktivitätsgehalt wurde durch Szintillationszählung gewogener Proben bestimmt, mit der bekannten spez. Aktivität des ^3H -TCDD (unter Annahme von 100% radiochemischer Reinheit) auf den Gehalt in g TCDD/g Maisöl und dann auf den Volumengehalt (Dichte Maisöl: $d = 0,92 \text{ g/ml}$) in g TCDD/ml Maisöl umgerechnet. Die TCDD-Konzentration wurde zuletzt durch Zugabe weiteren Maisöls so eingestellt, daß 4 ml der Dosierlösung gerade die zu applizierende Dosis in g TCDD/kg Körpergewicht enthielten.

2.9.2.3 Dosierung der Tiere

Der Dosierung der Tiere ging stets eine einwöchige Adaptationsphase voraus. Es wurden nur jene Tiere verwendet, deren Körpergewicht in dieser Zeit im zu erwartenden Umfang zunahm. Die Einteilung der Tiere in Dosisgruppen wurde so vorgenommen, daß in allen Gruppen ähnliche mittlere Körpergewichte und Standardabweichungen vorlagen.

Jedes Tier erhielt per Magensonde jeweils 4 ml/kg Körpergewicht der TCDD-Lösung in Maisöl, Kontrollen bekamen reines Maisöl. Um Verletzungen der Tiere durch die Intubation oder Dosierungsungenauigkeiten durch Ausspucken der applizierten Lösung zu erkennen, wurde jedes Tier nach Dosierung für mindestens 10 min beobachtet.

2.9.2.4 Urin- und Fäzesprobennahme

Beginnend mit dem Tag der Dosierung wurden die Urin- und Fäzesauffangbehälter der Metabolismuskäfige täglich zwischen 12:00 und 15:00 geleert und die Käfige von an den Wänden haftenden Futter- und Fäzesresten befreit. Das Urinvolumen konnte am Auffangbehälter selbst abgelesen werden (± 2 ml) und ein Aliquot von 5 - 15 ml wurde zur Bestimmung des Radioaktivitätsgehalts in Szintillationsgläsern aufbewahrt. Die gesamte Fäzesmenge eines Tages wurde in Polyethylen-Wägeschalen überführt und 48 h an Luft in einem Abzug trocknen gelassen. Die getrockneten Fäzes wurde gewogen, in einer Kaffemühle zerkleinert, und mit der unter 2.5.1.5.b beschriebenen Methode der ungefähre Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Für die Überführung nach Neuherberg wurden Fäzes in Szintillationsgläser eingefüllt und bei 4 °C gelagert.

2.9.2.5 Tötung der Tiere und Entnahme von Gewebeproben

Nach Ende der festgesetzten Versuchszeiten wurden die Tiere durch Asphyxiation mit CO₂ getötet. Der Abdominalraum wurde durch einen ventralen, sagittalen Schnitt eröffnet und 10 ml Blut aus der vena cava mit einer 20 ml Spritze entnommen. Das Blut wurde in 10 ml Blutentnahmeröhrchen mit 14 mg (38 μ mol) EDTA überführt und nach Verschließen zur vollständigen Auflösung des EDTA mehrmals invertiert. Durch Zentrifugieren bei 1500 \times g bei 4°C wurde Plasma von den zellulären Bestandteilen getrennt und der Gehalt an Radioaktivität durch Szintillationszählung von zwei 1 ml Aliquot bestimmt.

Zur Entnahme der Leber wurde sofort nach Gewinnung des Bluts das Organ von Gefäßen und Bindegewebe befreit. Nach Spülung mit physiologischer NaCl-Lösung (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL, USA) wurde das Gewicht bestimmt und anschließend 3 Proben von je 2 - 3 g abgetrennt, von denen zwei sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C zur späteren Bestimmung der enzymatischen Aktivität aufbewahrt wurden. Jeweils 2 Proben von 1 - 2 g Fettgewebe wurden aus dem epididymalen Fett, Proben von 0,5 g Muskelgewebe aus den Muskeln der Hinterläufe genommen. Ca. 2 - 3 cm² Haut wurden aus dem Rücken des Tieres präpariert; Unterhautfett wurde durch Kratzen mit einem Skalpell entfernt.

Nach Beendigung der Versuche wurden die Kadaver der mit TCDD belasteten Tiere tiefgefroren und später in einem Hochtemperaturbrennofen (Rollins Waste Disposal, Kansas City, MO, USA) vernichtet.

2.9.2.6 Isolierung mikrosomalen Proteins aus Lebergewebe

Tiefgefrorene Leberproben (ca. 1 g) wurden in 3 Anteilen (Gewicht/Volumen) eisgekühltem Sukrosepuffer aufgetaut und sofort auf Eis homogenisiert (1200 Upm, 10 Durchgänge). Das Homogenat wurde anschließend bei $10.000 \times g$, 4°C 30 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde verworfen und der Überstand eine Stunde bei $100.000 \times g$ zentrifugiert. Das verbleibende Präzipitat wurde sofort in 3 ml eisgekühltem Sukrosepuffer resuspendiert und auf Eis homogenisiert (1200 Upm, 4 Durchgänge). Proben zu je 500 μl wurden in 1,5 μl Eppendorfgefäße abgefüllt und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration in je einer Probe wurde mittels der Methode nach Bradford bestimmt (siehe 2.3.1.1)

2.9.2.7 Bestimmung der EROD-Aktivitäten in mikrosomalen Suspensionen

Durch Verdünnen von 50 μl -Aliquot der zu untersuchenden Mikrosomensuspension mit Sukrosepuffer wurde eine Proteinkonzentration von 0,7 g/l eingestellt und die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Je 200 μl dieser Suspension wurden zu 750 μl eines eisgekühlten, frisch zubereiteten Reaktionsgemisches der Zusammensetzung 0,13 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 3 mM MgCl_2 , 1,33 mM EDTA, 13,3 μM Ethoxyresorufin und 66,7 μM Dicumarol (pH 7.4) gegeben. Zum Reaktionsstart wurden 50 μl eines NADPH regenerierenden Systems (0,1 M Glukose-6-Phosphat, 20 kU/l Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, 20 mM NADP) eingebracht und sofort 6 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert (Dubnoff Metabolic Shaking Incubator, Precision GCA Corporation, Winchester, VA, USA). Anschließend wurde die Reaktion durch Ausfällen des Proteins mit 2 ml eisgekühlten Azetons beendet. Für Leerwerte wurde Azeton vor dem NADPH-regenerierenden System zugegeben. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde ein Gemisch aller in diesem Versuch bearbeiteten Mikrosomensuspensionen als Probe mit einer Reaktionslösung ohne Ethoxyresorufin verwendet. Anstatt des Ethoxyresorufins wurden vor der Inkubation 0, 5, 10, 15 bzw. 20 μl 0,1 M Resorufin in Ethylenglycol zugesetzt. Alle Proben wurden abschließend bei $1400 \times g$ zentrifugiert und der Überstand spektrofluorometrisch (Anregung bei 535 nm, Messung der Fluoreszenz bei 595 nm) gemessen. Die enzymatische Aktivität der EROD wurde anschließend mit Hilfe der Eichkurve berechnet^{145,146,147,148}.

2.9.3 Experimenteller Ansatz

2.9.3.1 Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Cholestyramin

Dreißig Sprague-Dawley Ratten wurden in 6 Gruppen zu je 5 Tieren unterteilt. Je zwei Gruppen erhielten 2 µg (6,15 nmol, 3,2 µCi) isotopenverdünntes, ungereinigtes ³H-TCDD/TCDD/kg Körpergewicht, zwei weitere erhielten 0,65 µCi (ca. 8 ng bezogen auf die reine Substanz) ungereinigtes ³H-TCDD /kg Körpergewicht, die zwei letzten erhielten Vehikel. Beginnend mit dem Tag nach der Dosierung wurde dem Futter je einer Gruppe pro TCDD-Dosis 4 Gew.% Cholestyramin zugesetzt. Von den Tieren, die 2 µg TCDD/kg Körpergewicht erhalten hatten, wurde beginnend mit dem Tag der Dosierung für 20 Tage Urin und Fäzes gesammelt. Der Radioaktivitätsgehalt in Urin wurde in Kansas City gemessen. Die Fäzesproben wurden archiviert und in Neuherberg am Verbrennungsautomaten vermessen. Am 21. Tag wurden alle Tiere getötet und Gewebeproben entnommen. In allen Geweben wurde der Radioaktivitätsgehalt bestimmt; EROD-Aktivitäten wurden in der Mikrosomenfraktion von Leberhomogenaten gemessen.

2.9.3.2 Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Hexadekan

Die Untersuchung erfolgte analog 2.9.3.1 mit folgenden Modifikationen:

Die Ratten erhielten am Tag vor der Dosierung kein Futter, um die Resorption der Dosis zu maximieren. Beginnend mit dem Tag nach der Dosierung wurde dem Futter je einer Gruppe pro TCDD-Dosis 5 Gew.% Hexadekan zugesetzt. Alle mit TCDD dosierten Tiere wurden in Metabolismuskäfigen gehalten. Bei der Ermittlung der aufgenommenen Futtermenge wurde verschüttetes Futter gesammelt, gewogen und entsprechend berücksichtigt. Beginnend mit dem Tag der Dosierung wurden von allen mit TCDD dosierten Tieren für 20 Tage Urin und Fäzes gesammelt, der Radioaktivitätsgehalt im Urin in Kansas City bestimmt und die Fäzes in Neuherberg am Verbrennungsautomaten auf ihren Radioaktivitätsgehalt überprüft. Die im Urin der mit der niedrigen Dosis behandelten Ratten gemessene Radioaktivität lag etwa ab dem 12. – 13. Tag unterhalb der Nachweisgrenze und konnte daher nicht über den gesamten Verlauf des Versuchs beobachtet werden. Nur die bis zum 10. Tag erhaltenen Werte wurden berücksichtigt. Auf die Untersuchung von Proben der Nieren auf Radioaktivität wurde in

diesem Fall verzichtet, da die in diesem Organ im vorangegangenen Experiment gefundenen Aktivitäten sehr nahe an der Nachweisgrenze lagen.

2.9.3.3 Validierung der Ergebnisse zu Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten

Um den Einfluß der Verunreinigungen im ^3H -TCDD Standard auf die Ergebnisse der Versuche zur Ausscheidung von TCDD in Sprague-Dawley Ratten unter Gabe von Futterzusätzen zu bestimmen, sollte der zeitliche Verlauf der Ausscheidung des ungereinigten Standards mit dem des gereinigten Standards und der isolierten Verunreinigung verglichen werden. Fünfzehn Sprague-Dawley Ratten wurden in 3 Gruppen zu je 5 Ratten aufgeteilt. Je einer Gruppe wurden 8 ng (24,6 pmol, 0,65 μCi) gereinigtes ^3H -TCDD/kg Körpergewicht, 0,65 μCi aus dem verunreinigten ^3H -TCDD-Standard isolierte Verunreinigungen/kg Körpergewicht oder 0,65 μCi ungereinigtes ^3H -TCDD/kg Körpergewicht in Maisöl oral nach einer 24stündigen Fastenperiode appliziert. Von allen Tieren wurde beginnend mit dem Tag der Dosierung für 10 Tage Urin und Fäzes gesammelt. Der Radioaktivitätsgehalt in Urin wurde in Kansas City gemessen, der Gehalt in getrockneten Fäzes durch Verbrennung von Fäzesproben in Neuherberg. Am 11. Tag wurden alle Tiere getötet, die Lebern entnommen, gewogen, und Gewebeproben eingefroren. Radioaktivitätsgehalte in Lebergeweben sowie EROD-Aktivitäten in der Mikrosomenfraktion von Leberhomogenaten wurden bestimmt.

2.10 Statistische Auswertung

Lineare Regressionsanalysen und Students t-Test wurden Mithilfe von in Microsoft Excel (Microsoft Co., Redmond, WA, USA) implementierten Funktionen durchgeführt. Kurvenanpassung und Parameteroptimierung in nichtlinearen Systemen wurde mittels Deltagraph 2.0 (Deltapoint Inc. und Microsoft Inc., Redmond, WA, USA) durchgeführt. Die Signifikanz linearer Korrelationen wurde anhand der Beziehung

$$t = \sqrt{\frac{r^2(N-2)}{1-r^2}} \quad \text{Gleichung 10}$$

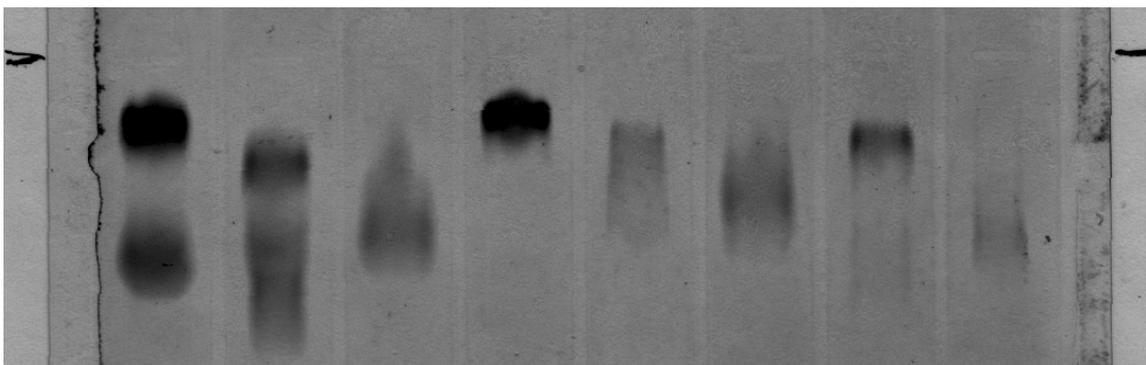
untersucht, worin r für den Pearson Produktmoment Korrelationskoeffizienten steht und t mit tabellierten Wahrscheinlichkeiten verglichen wurde¹⁴⁹.

3 Ergebnisse

3.1 **Untersuchungen zum Verteilungsverhalten von TCDD in Blut von Mensch und Ratten**

3.1.1 Methodenentwicklung

Für die Trennung der Lipoproteine fand eine Methode Anwendung, welche im Lipid Laboratory des University of Kansas Medical Centers entwickelt wurde¹⁵⁰. Diese Methode berücksichtigt aber nicht die Trennung der HDL von Plasmaproteinen; zudem wurde sie zwar für die Trennung menschlicher Lipoproteine validiert, nicht aber für Lipoproteine im Plasma von Ratten. Zunächst mußte daher ein Weg gefunden werden, die Reinheit erhaltener Fraktionen zu überprüfen, um anschließend die Entwicklung eines HDL/Plasmaprotein-Trennungsschritts und die Validierung der Methode für Rattenplasma durchführen zu können. Die von Naito et al. entwickelte Methode der Polyacrylamidgel-Diskelektrophorese, auf dem das Lipoprint LDL System der Firma Quantimetrix beruht, erwies sich für den Einsatz mit Proben aus der Dichtegradientenzentrifugation ungeeignet¹⁵¹. Die dem Plasma zugesetzten Antioxidantien verhinderten die Polymerisation der zum Auftragen der Probe dienenden Acrylamidlösung. Anstatt der zu erwartenden Lipoproteinbanden fanden sich nur breite Verteilungen. Im Gegensatz dazu beeinflussten die unterschiedlichen Salzgehalte der Proben



um. lasma	Ratten- plasma	Hum. HDL	Hum. LDL	Hum. VLDL	Ratten- HDL	Ratten- LDL	Ratten- VLDL
--------------	-------------------	-------------	-------------	--------------	----------------	----------------	-----------------

Abbildung 3-1: Elektrophorese auf Celluloseacetat und Anfärben der fetthaltigen Anteile mit Fettrot B von je einer Probe von humanem Plasma, Rattenplasma sowie den daraus isolierten Plasmaproteinfraktionen; mit Ausnahme einer geringen Verunreinigung der LDL aus Rattenplasma mit VLDL sind die isolierten Fraktionen rein

zwar die absoluten Migrationsraten der Lipoproteine im Celluloseacetatgel des Ciba Corning Lipoprotein Electrophoresis Kit, nicht aber die Qualität der Trennung. Der Einfluß des Salzgehalts auf die Migrationsraten zeigte sich linear, wobei höherer Salzgehalt zu geringeren Migrationsraten führte, und die Identifizierung der Lipoproteinspezies gelang durch Vergleich mit Plasmaproben, die auf einen ähnlichen Salzgehalt eingestellt wurden. Abbildung 3-1 zeigt exemplarisch einen Vergleich zwischen den auf Celluloseacetat ermittelten Verteilungen der Lipoproteine je einer menschlichen und einer Rattenplasmaprobe sowie der aus diesen mittels Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Lipoproteinfraktionen.

Es wurde zunächst versucht, eine alternative Methode zu implementieren, die eine vollständige Trennung aller 4 Fraktionen (Plasmaproteine, HDL, LDL, VLDL) in einem Zentrifugationsschritt erlaubt hätte¹⁵². Die Resultate waren jedoch nicht zufriedenstellend, die Trennung von Plasmaproteinen, HDL und LDL genügte nicht den Anforderungen der durchzuführenden Versuche hinsichtlich Vollständigkeit und Reproduzierbarkeit. Zudem erfordert die Trennung der HDL von Plasmaproteinen sehr hohe Beschleunigungen oder alternativ lange Zentrifugationszeiten, was zu strukturellen Veränderungen an den Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL, VLDL) führen kann¹⁵³. Aus diesem Grund kam diese Technik nicht zum weiteren Einsatz.

Die Isolierung der HDL von Plasmaproteinen erfolgte durch Einführung eines zweiten Trennungsschritts. Mit diesem Vorgehen gelang es, 84 ± 11 % der Cholesterine, 66 ± 11 % der Triglyzeride und 75 ± 7 % der Phospholipide in HDL aus Proben menschlichen Plasmas zu isolieren. Aus Plasmaproben von Ratten wurden 83 ± 5 % der Cholesterine, 33 ± 14 % der Triglyzeride und 49 ± 4 % der Phospholipide in HDL isoliert.

Der besonders in Rattenplasma vergleichsweise hohe Anteil der in der Plasmaproteinfraktion verbleibenden Triglyzeride überraschte zunächst. Bei der Entwicklung der Methode war nur menschliches Plasma eingesetzt worden, wo dieser Effekt nur vermindert auftrat. Die auf dem Analyseroboter implementierte enzymatische Meßmethode für Triglyzeride in Plasma mißt Glycerin, welches bei der Lipolyse durch zugesetzte Lipoprotein-Lipase aus den Triglyzeriden freigesetzt wird. Freies Glycerin, daß bei einer Trennung im Dichtegradienten nicht in die überschichtete Phase niedrigerer Dichte gelangt, läßt dabei den in der Bodenfraktion verbliebenen Anteil der Triglyzeride zu hoch erscheinen. Es wurde daher bei einigen Proben eine Messung des freien Glycerins in beiden Fraktionen durchgeführt. Diese Messung beruht auf der selben Methode wie die Messung der Triglyzeride, mit dem Unterschied daß keine

Tabelle 3-1: Relative Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD in Fraktionen von menschlichem Plasma nach Inkubation von Plasma mit unterschiedlichen Mengen ^3H -TCDD/TCDD und Auftrennung durch Dichtegradientenzentrifugation

Zugabe ungereinigtes ^3H-TCDD [$\mu\text{Ci/ml}$ Plasma]	0,003	0,33	0,45	0,23
Zugabe TCDD [$\mu\text{g/ml}$ Plasma]	0	0	0,34	11,0
Von Plasma aufgenommene Menge ungereinigtes ^3H-TCDD (% der Zugabe)	60	50	10	4
Gesamt-Wiederfindungsrate ungereinigtes ^3H-TCDD [% der Zugabe]	66	71	77	81
Plasmafraktion	Verteilung ungereinigtes ^3H-TCDD auf Plasmafraktionen [% der in Plasma aufgenommenen Menge]			
Proteine	4	8	6	11
HDL	8	7	7	8
LDL	59	59	62	53
VLDL	29	27	25	27

Lipoprotein-Lipase zugesetzt wird. Durch Korrektur für freies Glycerin erhöhte sich der Anteil der von den Plasmaproteinen abgetrennten Triglyzeride von 54 ± 2 auf 75 ± 4 % bei einer menschlichen Plasmaprobe und von 20 ± 7 auf 76 ± 6 % bei einer Probe von Rattenplasma.

3.1.2 Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung von ^3H -TCDD/TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion

Tabelle 3-1 faßt die Ergebnisse der Untersuchung der Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD bzw. isotonenverdünntem ungereinigtem ^3H -TCDD bei Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanz zusammen. Die Gesamt-Wiederfindungsrate bezogen auf ungereinigtes ^3H -TCDD stieg mit der zugegebenen Menge deutlich an. Nur bei Zugabe von $11 \mu\text{g}$ TCDD/ml Plasma war eine leichte Verschiebung des Radioaktivitätsgehalts von LDL zu Plasmaproteinen zu beobachten, bei geringeren Mengen zeigte sich die Verteilung unabhängig von der im Plasma vorliegenden Konzentration.

3.1.3 Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD zwischen Zellfraktion und Plasma

Bei der Untersuchung der Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD zwischen Zellfraktion und Plasma konnte ein Zusammenhang zwischen der Verteilung der Substanz und dem

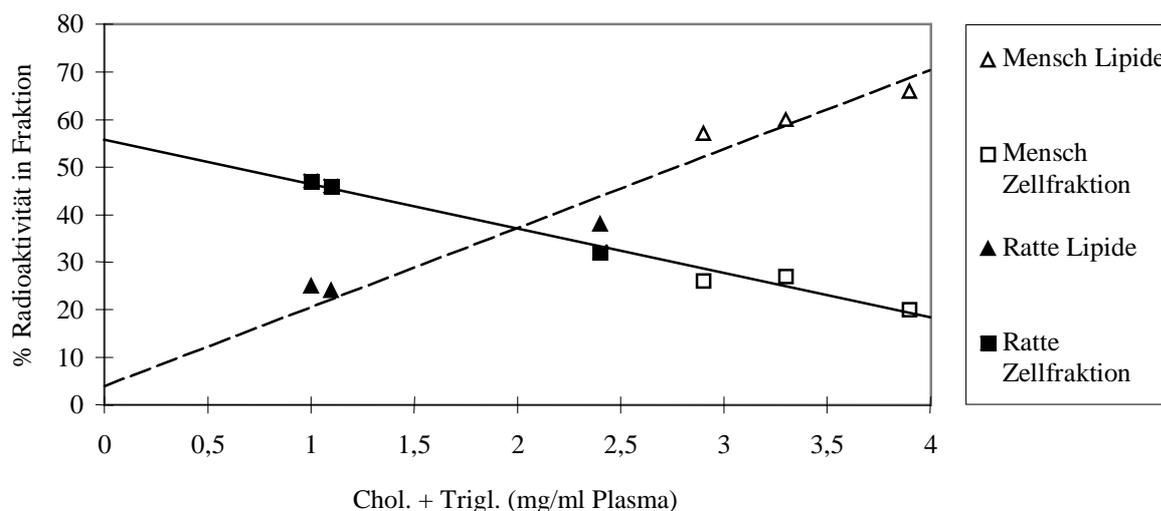


Abbildung 3-2: Relativer Gehalt (in % des in Vollblut enthaltenen) an ungereinigtem ^3H -TCDD in Blutzellfraktion und Lipoproteinen von Mensch und Ratte als Funktion der Gesamtkonzentration an Cholesterinen und Triglyzeriden im Plasma isoliert aus der jeweiligen Vollblutprobe. Für die lineare Regressionsanalyse der Gehalte in Lipoproteinen wurde der Ursprung als Datenpunkt hinzugenommen (durchgezogene Linie: Ausgleichsgerade für Zellfraktion; gestrichelte Linie: Ausgleichsgerade für Plasma)

Lipidgehalt der Lipoproteine im Plasma dargestellt werden. Zwar fand sich keine Proportionalität der Verteilung der Radioaktivität mit dem Gehalt an Cholesterinen oder Triglyzeriden, jedoch bestand näherungsweise ein linearer Zusammenhang zwischen Radioaktivität und der Summe dieser Neutralfette in mg/ml Plasma. Abbildung 3-2 verdeutlicht diesen Zusammenhang graphisch. Der relative Gehalt in Plasmaproteinen ist in Abbildung 3-2 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Die Regressionsanalyse ergab Achsenabschnitte von 4 ± 4 % ungereinigtes ^3H -TCDD für Lipoproteine (theoretisch 0 %) und 55 ± 3 % für die Zellfraktion (angegebene Fehler repräsentieren die Standardfehler der geschätzten y-Werte für alle x) sowie Steigungen von 17 % ungereinigtes ^3H -TCDD in Lipoproteinen/[mg (Cholesterine + Triglyzeride)/ml Plasma] und - 9,3 % ungereinigtes ^3H -TCDD in der Zellfraktion/[mg (Cholesterine + Triglyzeride)/ml Plasma]. Die Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,97$ (Lipoproteine) bzw. $r^2 = 0,98$ (Zellfraktion) belegten die Signifikanz dieser Beziehungen ($p < 0,01$). Die relative Menge der aus dem Plasma isolierten Radioaktivität war dem Lipidgehalt nicht proportional, ließ sich aber mittels der für Lipoprotein- und Zellfraktion ermittelten Gleichungen in guter Näherung berechnen:

Tabelle 3-2: Vergleich von experimentell gefundenen mit nach Gleichung 11 berechneten Radioaktivitäts-Gehalten in der Plasmaproteinfraktion von Vollblutproben von Mensch und Ratte

Probe	Plasma-Lipidgehalt [mg Chol. + Trig./ml Plasma]	Gehalt Radioaktivität in Plasmaproteinen [% der in Vollblut enthaltenen]	
		gefunden	berechnet
Mensch 1	3,9	14	12
Mensch 2	2,9	17	19
Mensch 3	3,3	13	16
Ratte 1	1	28	33
Ratte 2	2,4	30	23
Ratte 3	1,1	30	32

$${}^3\text{H}_{\text{Plpr.}} = 100 - (a_1 + b_1 x) - (a_2 + b_2 x)$$

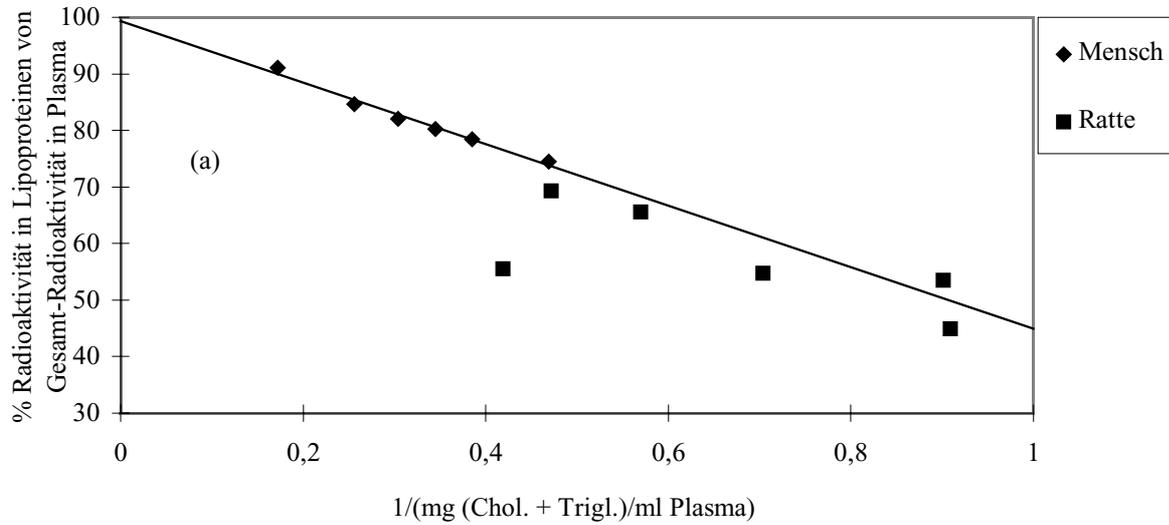
Gleichung 11

wobei ${}^3\text{H}_{\text{Plpr.}}$ für den Gehalt an Radioaktivität in Plasmaproteinen in % der in Vollblut enthaltenen Radioaktivität, a_1 , a_2 , b_1 und b_2 für die Achsenabschnitte (a) bzw. Steigungen (b) der Ausgleichsgeraden für Plasma (Subskript 1) bzw. Zellfraktion (Subskript 2) stehen. Tabelle 3-2 zeigt einen Vergleich der experimentell bestimmten mit nach Gleichung 11 berechneten Gehalten.

3.1.4 Verteilung von ungereinigtem ${}^3\text{H}$ -TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion in Plasma in Abhängigkeit von Menge und Verteilung der Lipide

Aus der Verteilung des ungereinigten ${}^3\text{H}$ -TCDD auf die vier untersuchten Fraktionen Plasmaproteine, HDL, LDL und VLDL ließen sich wiederum zwei lineare Beziehungen erschließen: 1. Der in den vereinigten Lipoproteinen lokalisierte Prozentsatz der in Plasma vorliegenden Menge an ${}^3\text{H}$ -assoziiertes Radioaktivität zeigte sich dem inversen der Konzentration an Cholesterinen + Triglyzeriden proportional; 2. die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Lipoproteinfraktionen der Verteilung von Cholesterinen + Triglyzeriden auf diese Fraktionen direkt proportional war. Abbildung 3-3 veranschaulicht diese Zusammenhänge.

(a)



(b)

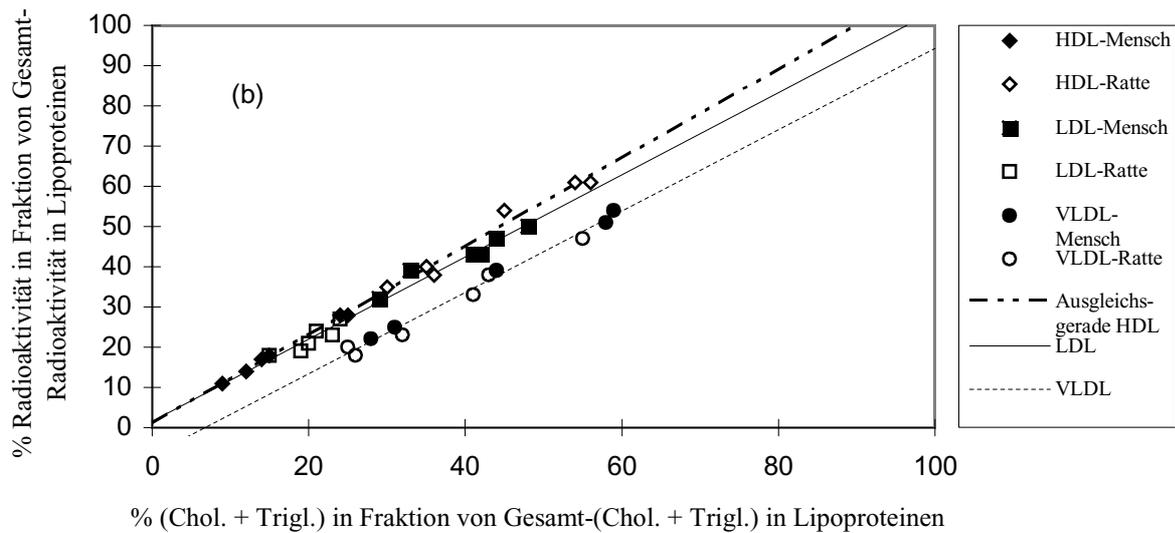


Abbildung 3-3: Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD in Plasma: (a) Abhängigkeit des in den vereinigten Lipoproteinfraktionen isolierten Anteils der Radioaktivität von oben erwähnt, stark speziesabhängig und wird darüber hinaus bei Plasma vor Fraktionierung; Ausgleichsgerade berechnet nur mit Daten aus menschlichem Plasma; (b) Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Lipoproteinfraktionen in Abhängigkeit vom relativen Gehalt an (Chol. + Trigl.) in den Fraktionen

In Abbildung 3-3a wird dabei deutlich, daß die Verteilung des ungereinigten ^3H -TCDD auf Plasma- und Lipoproteine in menschlichem Plasma deutlich besser mit der Lipidkonzentration korrelierte als im Plasma von Ratten. In der Regel lagen die in den Lipoproteinfraktionen

isolierten relativen Mengen an Radioaktivität niedriger als die im Plasma gemessene Lipidmenge gemäß der in menschlichen Plasma gefundenen Gesetzmäßigkeiten erwarten ließ. Da die in Abbildung 3-3a aufgetragenen Werte für die Lipidkonzentrationen im Plasma vor der Fraktionierung gemessen wurden, läßt sich dieser Umstand auf die bereits beschriebene Instabilität der Triglyzeride in Ratten-Lipoproteinen während der Fraktionierung zurückführen. Für die Berechnung der Ausgleichsgeraden wurden daher nur die in menschlichen Plasma ermittelten Daten verwendet. Der Achsenabschnitt von $99 \pm 1 \%$ ungereinigtes ^3H -TCDD in den Lipoproteinfraktionen lag dabei sehr nahe an der Theorie (100% bei ca. 10^{-3} (mg Chol. + Trigly./ml Plasma) $^{-1}$ entsprechend der maximal theoretisch möglichen Menge der Lipide von ca. 960 mg/ml), die Steigung betrug -54% ungereinigtes ^3H -TCDD in den Lipoproteinfraktionen/(mg Chol. + Trigly./ml Plasma) $^{-1}$. bei einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,991$

Abbildung 3-3b zeigt den Zusammenhang zwischen der Verteilung des ungereinigten ^3H -TCDD und der Verteilung von Cholesterinen und Triglyzeriden auf die verschiedenen Lipoproteinfraktionen. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden aus der Auftragung des relativen Lipidgehalts gegen den relativen Radioaktivitätsgehalt je Fraktion in % des gesamten in den Lipoproteinen vorliegenden Gehalts errechneten sich zu 1,01 bzw. 1,02 (% TCDD)/% (Chol. + Trigly.) für HDL und VLDL bzw. LDL, $r^2 > 0,99$ in allen drei Fällen. Während die Achsenabschnitte bei HDL und LDL mit $1 \pm 2 \%$ bzw. $2 \pm 2 \%$ der Theorie entsprachen, fand sich für VLDL ein Achsenabschnitt von $-7 \pm 2 \%$. Dieser Umstand wurde jedoch erst nach

Tabelle 3-3: Vergleich der Verteilung ^3H -assoziierter Radioaktivität aus ungereinigtem ^3H -TCDD in Lipoproteinfraktionen mit der gemessenen Verteilung der Lipide (Cholesterine + Triglyzeride) ohne und mit Korrektur für freies Glycerin

Probenherkunft	Fraktion	Radioaktivität in Fraktion [%]	Lipide in Fraktion [%]	Lipide in Fraktion korrigiert f. freies Glycerin [%]
Mensch	HDL	17	14	15
	LDL	43	42	45
	VLDL	39	44	40
Ratte	HDL	40	35	40
	LDL	27	24	26
	VLDL	33	41	34

Durchführung der Mehrzahl der Trennungen deutlich. Es wurde daraufhin bei der letzten von den je sechs Proben der beiden untersuchten Spezies in den Fraktionen zusätzlich zu den Lipiden auch freies Glycerin gemessen. Wie Tabelle 3-3 zeigt, verschwand die Abweichung nach Korrektur des Lipidgehalts für freies Glycerin.

3.1.5 Bindung von ^3H -TCDD an Plasmaproteine

Abbildung 3-4 zeigt exemplarisch die Ergebnisse je einer Trennung isolierter menschlicher bzw. Ratten-Plasmaproteine mittels des unter 2.6.1.10 beschriebenen elektrophoretischen Trennungsverfahren. Angedeutete Querlinien geben die Partitionierung der Gelstreifen wieder, in denen die Verteilung des Radioaktivitätsgehalts bestimmt wurde. Auffällig waren zunächst die deutlichen Unterschiede in den Verteilungsmustern der Plasmaproteine von Ratte und Mensch sowie die unter gleichen Bedingungen geringere Migrationsrate des Serumalbumins aus Rattenplasma im Vergleich zu humanem Serumalbumin: 50 g/l humanes bzw. Ratten-Serumalbumin, Tris-/Borsäure-/EDTA-Puffer; 5,5 h; 5,7 V/cm: unter diesen Bedingungen migrierte humanes Serumalbumin 43 ± 2 mm (n=20), Ratten-Serumalbumin 36 ± 2 mm (n=20). Trotz einer leicht verringerten Migrationsrate der Serumalbumine in lipidfreiem Plasma gegenüber den Referenzsubstanzen (humanes Serumalbumin in lipidfreiem Plasma: 39 ± 1 mm; Ratten-Serumalbumin in lipidfreiem Plasma: 30 ± 2 mm)

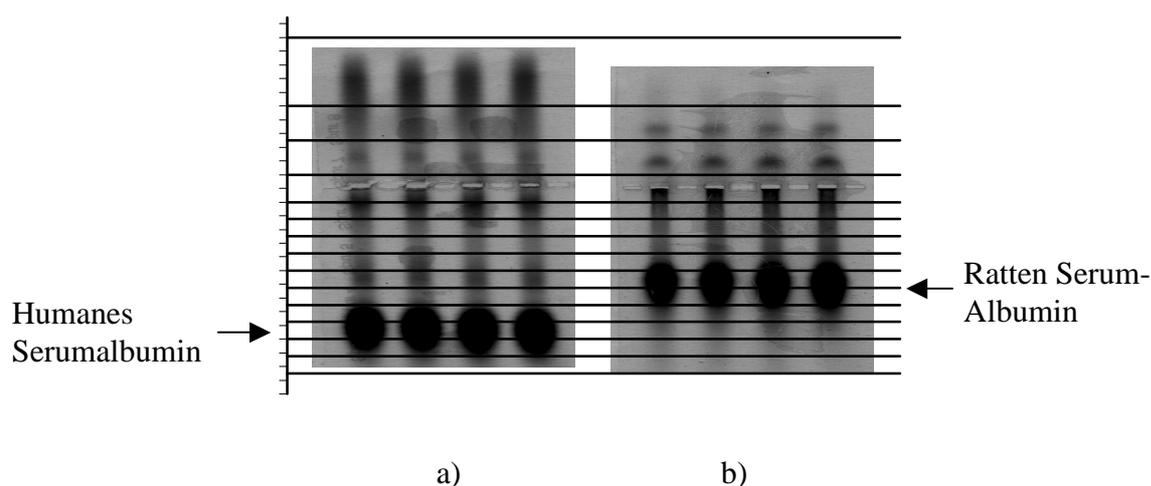


Abbildung 3-4: Elektrophorese Lipoprotein-freier Plasmaproteine isoliert aus a) humanem Plasma, b) Rattenplasma auf Agarosegel; das Plasma in den gezeigten Kontrollbahnen wurde nicht mit ^3H -TCDD inkubiert und die Proteine im Gel mit Amido-Schwarz angefärbt; die parallel mitgelaufenen, mit ^3H -TCDD inkubiertem Plasma enthaltenden Bahnen wurden statt dessen in einzelne Bahnen aufgeteilt und die Bahnen entlang der eingezeichneten Linien zerschnitten, und abschließend der Radioaktivitätsgehalt in den so erhaltenen Stücken bestimmt

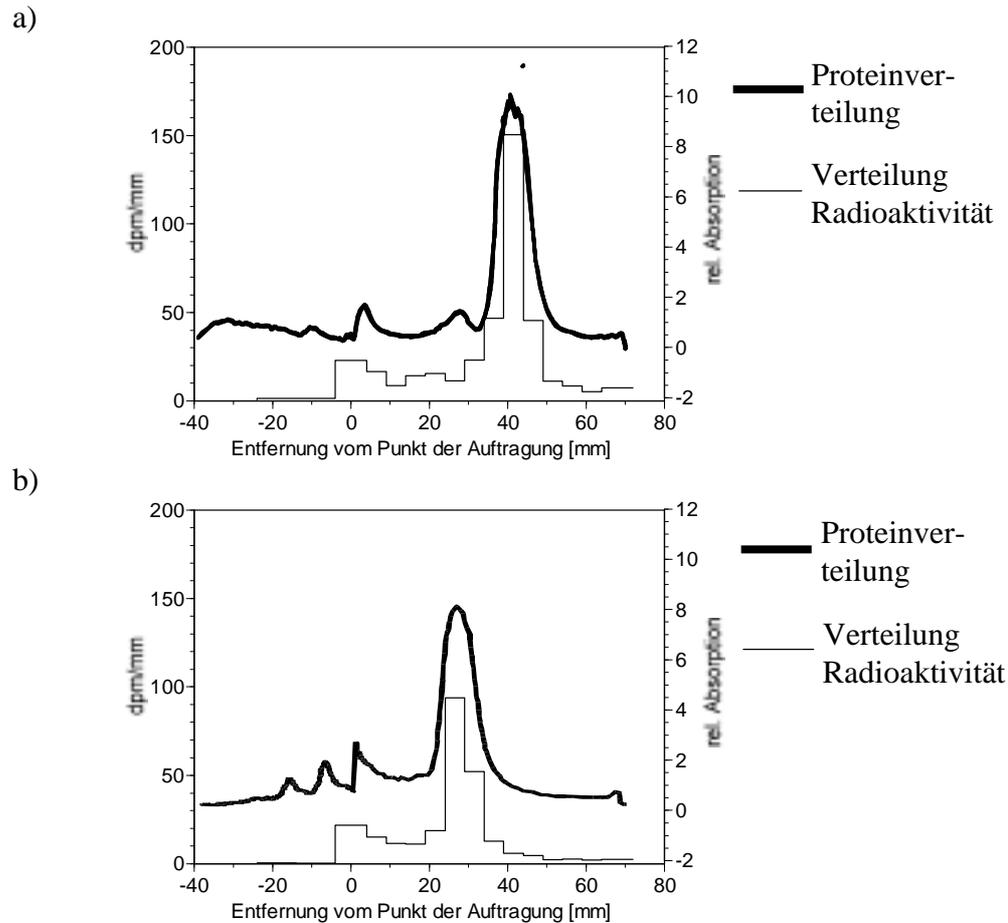


Abbildung 3-5: Vergleich der Verteilungen der Proteine (fett gezeichnet) und der Radioaktivität auf Agarosegelen nach Elektrophorese von mit ^3H -TCDD inkubierten Plasmaproteinen isoliert aus a) humanem Plasma, b) Rattenplasma

lassen die bekannten Mengenverhältnisse der Plasmaproteine keine andere Identifikation der intensivsten Proteinbande zu. Mit Ausnahme der Serumalbumine gelang die Identifizierung der einzelnen Plasmaproteine in humanem Plasma in den erhaltenen Verteilungsmustern weder durch Vergleich mit Literaturangaben noch mit Referenzsubstanzen (Cohn Fraktion 3 bzw. 4) zweifelsfrei. Für Plasmaproteine aus Rattenplasma standen keine Referenzsubstanzen zur Verfügung.

In Abbildung 3-5a sind die Ergebnisse der densitometrischen Proteinbestimmung einer Kontrollbahn sowie der Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in einer Versuchsbahn aus der Trennung einer Probe menschlicher Plasmaproteine, in Abbildung 3-5b die einer Rattenplasmaprotein-Probe exemplarisch dargestellt. Nur geringe Unterschiede fanden sich zwischen den Ergebnissen einzelner Bahnen aus einer Probe. Auch zwischen Proben unterschiedlicher Individuen derselben Spezies traten nur unwesentliche Verschiebungen auf.

Tabelle 3-4: Verteilung von ^3H -TCDD-assoziiertes Radioaktivität nach Elektrophorese von mit ^3H -TCDD inkubierten Plasmaproben bzw. Referenzlösungen

Position des Gelstücks auf dem Gel (mm vom Kathodischen Rand des Gels)	Elektrophoretisch untersuchte Probe			
	Plasmaproteine isoliert aus humanen Blutproben (n=5)	50 g/l humanes Serumalbumin in Gelpuffer (n=3)	Plasmaproteine isoliert aus Proben von Rattenblut (n=5)	50 g/l Ratten-Serumalbumin in Gelpuffer (n=3)
	[% der aus einem mit 5 μl Probe beladenen Gelstreifen zurückgewonnenen Radioaktivität]			
0-24	1 \pm 0,3	1 \pm 0,2	1 \pm 0,3	1 \pm 0,3
25-44	1 \pm 0,2	1 \pm 0,04	1 \pm 0,1	1 \pm 0,08
45-54	1 \pm 0,3	1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	1 \pm 0,1
55-64	1 \pm 0,3	1 \pm 0,1	1 \pm 0,3	1 \pm 0,1
65-72 (Probenaufgabe bei 67-68 mm)	7 \pm 1	4 \pm 1	11 \pm 3	8 \pm 1
73-77	3 \pm 0,4	2 \pm 1	5 \pm 1	4 \pm 0,4
78-82	3 \pm 0,5	2 \pm 1	4 \pm 1	4 \pm 0,3
83-87	4 \pm 0,4	2 \pm 0,1	5 \pm 2	2 \pm 0,1
88-92	4 \pm 0,3	2 \pm 0,1	8 \pm 4	2 \pm 0,1
93-97	4 \pm 1	2 \pm 1	30 \pm 7	6 \pm 2
98-102	5 \pm 1	3 \pm 0,4	18 \pm 8	15 \pm 5
103-107	18 \pm 6	16 \pm 9	6 \pm 2	33 \pm 2
108-112	35 \pm 7	33 \pm 9	3 \pm 1	15 \pm 5
113-117	7 \pm 3	20 \pm 11	2 \pm 0,3	4 \pm 0,4
118-122	2 \pm 0,3	4 \pm 2	1 \pm 0,2	2 \pm 0,1
123-127	1 \pm 0,3	2 \pm 1	1 \pm 0,2	3 \pm 0,1
128-132	1 \pm 0,4	1 \pm 1	1 \pm 0,2	1 \pm 0,1
133-140	2 \pm 0,3	2 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1

Tabelle 3-4 gibt die über 6 Individuen jeder Spezies gemittelten Verteilungen der aus den Gelstreifen zurückgewonnenen Radioaktivität im Vergleich zu den Verteilungen bei Verwendung reines humanen bzw. Ratten-Serumalbumins wieder. Lipidfreie Plasmaproteine aus Mensch und Ratte verhielten sich dabei sehr ähnlich wie reines Serumalbumin, mit der Ausnahme etwas erhöhter Werte (22 \pm 6 % gegenüber 15 \pm 4 % der eingesetzten Radioaktivität) im Bereich zwischen dem Punkt der Probenaufgabe und der Serumalbumin-Bande.

3.1.6 Validierung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Verteilung von TCDD in Blut von Mensch und Ratte

3.1.6.1 Extraktion von mit ^3H -TCDD inkubiertem Plasmafraktionen und Quantifizierung der Verunreinigungen mittels HPLC

Bei der Untersuchung des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards mittels HPLC zeigte sich, daß dieser mindestens 4 weitere Verbindungen neben ^3H -TCDD enthielt. Diese eluierten unter den gewählten chromatographischen Bedingungen bei relativen Retentionszeiten von $r_f = 0,45 \pm 0,04$ (Verunreinigung 1), $0,63 \pm 0,06$ (Verunreinigung 2), $0,70 \pm 0,05$ (Verunreinigung 3) bzw. $0,78 \pm 0,06$ (Verunreinigung 4; $n = 9$; Retentionszeit von ^3H -TCDD $\equiv 1$). Da die Verunreinigungen 2 - 4 in den meisten Fällen nicht klar getrennt werden konnten, wurde stets über sie summiert. Ein Versuch, die Verunreinigungen mittels GC/MS zu identifizieren, mißlang.

Bei der chromatographischen Trennung des ^3H -TCDD-Standards ergaben sich eine durchschnittliche Zusammensetzung von $15 \pm 1\%$ Verunreinigung 1, $17 \pm 2\%$ Verunreinigung 2 - 4 sowie $69 \pm 2\%$ ^3H -TCDD ($n = 10$). Wurde der Standard zunächst auf einer Sandwichsäule chromatographiert, fanden sich $12 \pm 1\%$ Verunreinigung 1, $19 \pm 0\%$ Verunreinigung 2 - 4 sowie $66 \pm 1\%$ ^3H -TCDD ($n = 2$). Wurde der Standard hingegen mit Plasma inkubiert, das Plasma extrahiert und der Extrakt nach Reinigung an der Sandwichsäule chromatographisch untersucht, ergab sich eine Zusammensetzung von $12 \pm 1\%$ Verunreinigung 1, $14 \pm 7\%$ Verunreinigung 2 - 4 sowie $75 \pm 8\%$ ^3H -TCDD ($n = 6$). Die Wiederfindungsraten über den gesamten Vorgang der Reinigung an der Sandwichsäule und Trennung mittels HPLC betragen $86 \pm 11\%$ ($n = 26$).

Tabelle 3-5 gibt die Ergebnisse der Trennungen der Plasmaproben in Protein- und Lipidfraktionen sowie der in diesen Fraktionen enthaltenen Radioaktivität in ^3H -TCDD und Verunreinigungen wieder. Die Verteilung der Gesamtradioaktivität auf die Protein- und Lipidfraktionen entsprach den in 3.1.4 beschriebenen Ergebnissen.

Die Analyse der Verteilungen von ^3H -TCDD bzw. der Verunreinigungen ergab ein uneinheitliches Bild. Während sich in menschlichem Plasma eine Verschiebung der relativen Gehalte zu höherem ^3H -TCDD-Anteil von Protein zu VLDL-Fraktion andeutete, war ein solches Verhalten in Rattenplasma nicht zu konstatieren. Bei menschlichen HDL sowie Ratten-HDL und -LDL fanden sich jeweils stark abweichende Verteilungen in den zwei

Tabelle 3-5: Verteilung von ^3H -TCDD und der in ungereinigtem ^3H -TCDD vorliegenden Verunreinigungen auf Plasmafraktionen in Blut von Mensch und Ratte

	Verunreinigung 1 (%; n = 2)	Verunreinigung 2- 4 (%; n = 2)	^3H -TCDD (%; n = 2)	Gesamtradioaktivität (%; n = 2)*	Chol. + Trigl. (%; n = 2)
Humanes Plasma Plasmaproteine	19 ± 4	18 ± 2	63 ± 6	18 ± 1	
Humanes Plasma HDL-Fraktion	20 ± 8	32 ± 18	49 ± 26	18 ± 0 (23 ± 1)*	15 ± 1
Humanes Plasma LDL-Fraktion	11 ± 0	17 ± 0	72 ± 1	36 ± 0,5 (46 ± 1)*	46 ± 1
Humanes Plasma VLDL-Fraktion	10 ± 0	10 ± 1	80 ± 1	24 ± 0,5 (31 ± 1)*	39 ± 1
Rattenplasma Plasmaproteine	11 ± 1	15 ± 3	75 ± 4	47 ± 0	
Rattenplasma HDL-Fraktion	21 ± 11	28 ± 25	50 ± 36	23 ± 2 (46 ± 4)*	30 ± 2
Rattenplasma LDL-Fraktion	19 ± 12	30 ± 25	52 ± 37	5 ± 3 (10 ± 6)*	9 ± 6
Rattenplasma VLDL-Fraktion	13 ± 1	16 ± 1	70 ± 2	22 ± 2 (43 ± 4)*	43 ± 3

* Angaben in Klammern: Anteil der gesamten in Lipidfraktionen gefundenen Radioaktivität

untersuchten Proben, so daß hier keine klare Aussage möglich war. Jeweils eine Probe enthielt deutlich niedrigere relative Mengen an ^3H -TCDD, diese Proben waren gleichzeitig diejenigen, bei denen die niedrigste Wiederfindungsrate nach dem Transport von Kansas City nach Neuherberg zu verzeichnen war.

Ein Verlust der Probensubstanz beim Transport von Kansas City nach Neuherberg kann ausgeschlossen werden, da alle Proben vor und nach dem Transport gewogen wurden, und bei keiner Probe Gewichtsverluste >0,1 % gemessen wurden. Es fiel jedoch nachträglich auf, daß die Versiegelung in den Schraubkappen der Proben, in denen die Unregelmäßigkeiten auftraten, eine etwas unterschiedliche Färbung aufwies. Unter Umständen waren einige Schraubkappen zur Anwendung gekommen, deren Versiegelung nicht Teflon-beschichtet war, und ein Teil des in der Probe enthaltenen TCDD haftete selektiv an der Kunststoffoberfläche.

Die Unterschiede zwischen den Verteilungen in menschlichen Plasmaproteinen bzw. menschlichen VLDL mit Ausnahme der hohen Konzentrationen von Verunreinigung 1 in menschlichen Plasmaproteinen waren dabei dennoch nicht signifikant verschieden ($p < 0,05$) von den Ergebnissen der Kontrollversuche, bei denen der Standard mit Plasma inkubiert, das Plasma extrahiert und der Extrakt nach Reinigung an der Sandwichtsäule chromatographisch untersucht wurde. Die experimentellen Fehlerquellen summierten sich über den gesamten Versuchsverlauf zu stark, um Unterschiede zwischen den Verteilungen noch feststellen zu können. Es wurde daher nach einer Methode gesucht, bei der ein solcher Vergleich mit weniger fehlerbehafteten experimentellen Schritten erreicht werden konnte.

3.1.6.2 Vergleich der Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD-Standard, reinem ^3H -TCDD bzw. der isolierten Verunreinigungen in Plasmafraktionen

Tabelle 3-6 gibt die Verteilungen des ^3H -TCDD-Standards, der in ungereinigtem ^3H -TCDD vorliegenden Verunreinigungen und des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards auf die aus humanem Plasma isolierten Fraktionen wieder und zeigt den Vergleich mit der aus der

Tabelle 3-6: Verteilung von ^3H -TCDD, der in ungereinigtem ^3H -TCDD vorliegenden Verunreinigungen und des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards auf Plasmafraktionen in Humanblut, Vergleich mit der aus der Zusammensetzung des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards errechneten Verteilung

	Inkubation von humanem Plasma mit [% der eingesetzten Aktivität]			Berechnet aus $0,7 \times A +$ $0,3 \times B^*$
	^3H -TCDD (A)	Verunreini- gungen (B)	Ungereinigtem ^3H -TCDD (C)	
Plasmaproteine	15 ± 1	14 ± 0	16 ± 1	15
HDL-Fraktion	18 ± 3	20 ± 0	17 ± 3	18
LDL-Fraktion	30 ± 0	20 ± 2	26 ± 2	27
VLDL-Fraktion	31 ± 1	42 ± 1	37 ± 7	34
	[% der in Lipidfraktionen wiedergefundenen Aktivität]			Verteilung von Chol. + Trigl. auf Lipidfraktionen
HDL-Fraktion	23 ± 3	24 ± 0	22 ± 4	23 ± 0
LDL-Fraktion	39 ± 1	25 ± 2	32 ± 2	33 ± 0
VLDL-Fraktion	39 ± 1	51 ± 2	46 ± 8	44 ± 1

* Die Analyse des ungereinigten ^3H -TCDD ergab eine Zusammensetzung von 70% ^3H -TCDD und 30 % Verunreinigungen

Zusammensetzung des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards (Annahme 70 % ^3H -TCDD, 30 % Verunreinigungen) errechneten Verteilung. Die berechneten Werte stimmen gut mit der für den ungereinigten Standard gefundenen Verteilung überein.

Weiterhin faßt Tabelle 3-6 die Verteilung der Radioaktivität auf diese Fraktionen bezogen auf die aus den Lipidfraktionen isolierte Radioaktivität zusammen und stellt diese der Verteilung von Cholesterinen und Triglyzeriden gegenüber. Der lineare Zusammenhang zwischen der Verteilung der Radioaktivität auf die Lipidfraktionen und der Verteilung der genannten Lipide wie in Abbildung 3-3 gezeigt, bestätigte sich dabei nur für den ungereinigten ^3H -TCDD-Standard.

3.2 Versuche zur Bestimmung von Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizienten: Bestätigung der Wasserlöslichkeit von ^3H -TCDD und Bestimmung der Adsorptionskonstante von ^3H -TCDD an Albumin

3.2.1 Inkubation von Proteinlösungen oder Puffer mit ^3H -TCDD als Bodenkörper

In einem einleitenden Versuch wurden je 2 ml aqua dest. und Phosphatpuffer sowie je 2 ml von Albuminlösungen der Konzentration 0,1, 1, 3 bzw. 5 g/l (1,5, 15, 46 bzw. 77 $\mu\text{mol/l}$) mit je 250 nCi ungereinigtem ^3H -TCDD als Bodenkörper für 48 h inkubiert. Proben wurden nach 6, 12, 18, 24, 36 und 48 h entnommen. Die maximale Konzentration war nach 24 – 36 h erreicht. In aqua dest. und Phosphatpuffer fanden sich daraufhin Aktivitäten von $5,3 \pm 0,1$ bzw. $4,7 \pm 0,5$ nCi/ml entsprechend einer Löslichkeit von 66 bzw. 60 ppt bezogen auf die reine Substanz. In der Literatur wird die Löslichkeit von TCDD mit 19 ± 4 ppt entsprechend $6 \pm 1 \times 10^{-11}$ mol/l angegeben¹⁴. In der 0,1 g Albumin/l enthaltenden Lösung fanden sich 27 ± 1 nCi/ml nach 48 h. Bei der Inkubation mit Albuminlösungen höherer Konzentration war nahezu die gesamte eingesetzte Radioaktivität in Lösung gegangen (1 g/l: 114 ± 6 nCi/ml; 3 g/l: 126 ± 5 nCi/ml; 5 g/l: 132 ± 5 nCi/ml), so daß eine Interpretation nicht möglich war.

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde ein Versuch unternommen, bei dem Albuminlösungen steigender Konzentration mit unterschiedlichen Mengen ^3H -TCDD unter sonst gleichen Bedingungen wie oben inkubiert wurden. Tabelle 3-7 faßt die Ergebnisse dieses Versuchs zusammen.

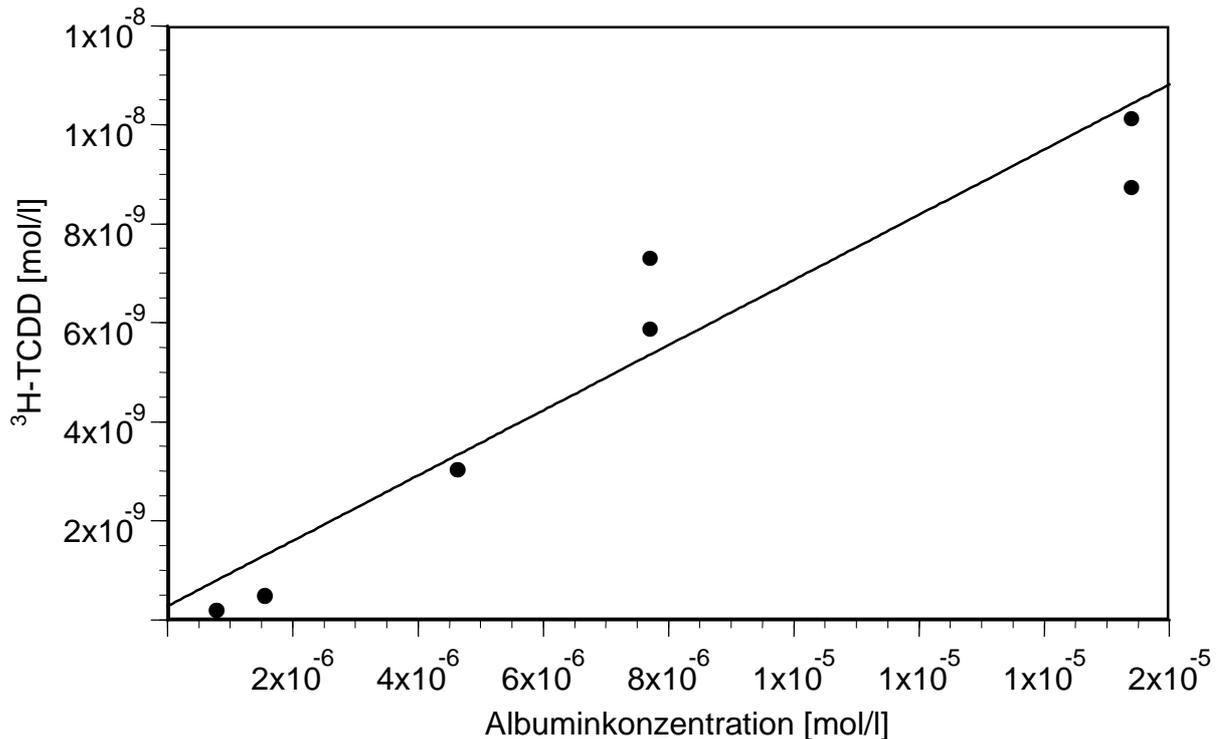


Abbildung 3-6: Ermittlung der Bindungskonstante von ³H-TCDD an Albumin aus der Gleichgewichtskonzentration von ³H-TCDD in Albuminlösungen unterschiedlicher Konzentration über einem Bodenkörper von ³H-TCDD

Abbildung 3-6 zeigt eine grafische Auftragung der Ergebnisse aus Tabelle 3-7. Die Berechnung der Ausgleichsgerade ergibt einen Achsenabschnitt von $(0,3 \pm 1) \times 10^{-9}$ mol TCDD/l, entsprechend einer Löslichkeit von 90 ± 330 ppt im reinen Lösungsmittel (entsprechend dem 4 – 8fachen der Literatur¹⁴), sowie eine Steigung von $6,6 \times 10^{-4}$ (mol TCDD/l)/(mol Albumin/l) bei einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,94$. Daraus ergibt sich mit Gleichung 9 eine Dissoziationskonstante für die Bindung von TCDD an Albumin von $K_D = (0,4 \pm 1,5) \times 10^{-6}$. Unter Verwendung des mit geringerer Unsicherheit behafteten Literaturwertes für die Löslichkeit von TCDD in reinem Wasser ergibt sich mit Gleichung 9 die Dissoziationskonstante zu $(9 \pm 2) \times 10^{-8}$ mol/l.

Tabelle 3-7 zeigt, daß bei dem beschriebenen Versuch in allen Fällen weniger als die Hälfte des eingesetzten ³H-TCDD in Lösung gingen. Dies kann als Hinweis interpretiert werden, daß die Gleichung 9 zugrundeliegende Annahme, es liege eine gesättigte Lösung über einem Bodenkörper von ³H-TCDD vor, gegeben war. Dennoch zeigte sich ein Trend zur Abhängigkeit der ³H-TCDD Konzentrationen in Lösung von der vorgelegten Menge bei gleicher Albumin-Konzentration, wie ein Vergleich der Doppelbestimmungen bei den

Tabelle 3-7: Aktivität in Albuminlösungen verschiedener Konzentration nach Inkubation von je 2 ml der Albuminlösung mit einem Überschuß an ungereinigtem ^3H -TCDD für 48 h

C_{Albumin} [g/l Phosphatpuffer]	0,05	0,05	0,1	0,1	0,3	0,3	0,5	0,5	1	1
Einsatz ungereinigtes ^3H -TCDD [nCi]	115	118	120	124	253	283	757	545	1060	1347
Aufnahme in Lösung [nCi/2 ml]	24 $\pm 0,2$	24 ± 2	40 $\pm 0,2$	40 $\pm 0,8$	172 ± 6	172 $\pm 0,8$	396 ± 4	322 ± 4	470 ± 2	542 ± 6

Konzentrationen von 0,5 bzw. 1 g Albumin/l belegt. Diese Beobachtung bestätigte sich in einer Wiederholung des Experiments.

Die Affinität von TCDD, an allen Oberflächen zu haften, ist hinlänglich bekannt. Um auszuschließen, daß das beobachtete Phänomen ein Resultat eines Gleichgewichts zwischen der Bindung an der Oberfläche der Glasröhrchen und der Bindung an Albumin war, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem durch Vorlage eines großen molaren Überschusses von isotonenverdünntem ^3H -TCDD die Absättigung der Bindungsstellen am Glas erreicht werden sollte.

Dazu wurden in je zwei Probengläschen jeweils 23,1, 7,7, 2,6, 0,87 bzw. 0,29 μg TCDD in Toluol vorgelegt und je 204 nCi ungereinigtes ^3H -TCDD in Toluol zugegeben und nach Vertreiben des Lösungsmittels mit wäßrigen Lösungen der Albumin-Konzentrationen 4900 ± 300 , 1670 ± 40 , 564 ± 7 , 178 ± 2 bzw. 56 ± 1 mg/l (72 ± 5 , $24,6 \pm 0,6$, $7,7 \pm 0,1$, $2,62 \pm 0,03$, $0,82 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/l}$) für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität in je 3 Proben zu jeweils 100 μl gemessen. Diese Messungen ergaben eine so hohe Variabilität (z.B. 6000 ± 4000 dpm/100 μl bei einer dreifachen Beprobung der höchsten Albuminkonzentration), daß eine sinnvolle Auswertung nicht möglich war. Dieses Verhalten bestätigte sich auch bei mehrfacher Wiederholung des Versuchs.

3.2.2 Inkubation von Proteinlösungen oder Puffer mit ^3H -TCDD unter Verwendung einer schlauchförmigen Dialysemembran

Die Trennung des TCDD-Bodenkörpers von der Dialyselösung durch eine Dialysemembran sollte verhindern, daß TCDD bei der Inkubation und Probenahme kolloidal in Lösung ging. Zunächst wurde nur eine Dialysemembran mit einer Durchlässigkeit für Molekulargewichte <1000 D verwendet.

In einem Vorversuch wurde sichergestellt, daß die zur Anwendung gebrachte Methode des Abdichtens des Dialyseschlauchs mittels Aluminiumfolie den Schlauch dicht verschloß: Ein Stück Dialyseschlauch wurde mit ca. 1 ml Albuminlösung der Konzentration 4900 mg/l (72 µmol/l) gefüllt, mit Aluminiumfolie verschlossen und in ein mit 5 ml aqua dest. gefülltes 13 x 80 mm Reagenzglas gegeben. Nach 72 h sanftem Schütteln wurden der den Schlauch umgebenden Flüssigkeit Proben zu je 1 ml entnommen, am Lyophilisator getrocknet und die Proteinkonzentration im Rückstand nach Bradford bestimmt¹⁴⁰. Diese lag unterhalb des Detektionslimits der Methode (1 mg/l).

Zunächst wurde die Verwendbarkeit von Filterpapierstreifen als Träger für TCDD für die Einbringung in den Dialyseschlauch untersucht. Hierzu wurden je zwei Filterpapierstreifen mit 73, 145, oder 218 nCi ungereinigtem ³H-TCDD bzw. mit 73, 145, oder 218 nCi im Verhältnis 360:1 mit TCDD isotopenverdünntem ³H-TCDD (310, 620 bzw. 930 ng, entsprechend 0,96, 1,91 bzw. 2,87 nmol TCDD) in Toluol beladen. Die Filterstreifen wurden in mit Phosphatpuffer (ungereinigtes ³H-TCDD) bzw. 0,82 µmol/l Albuminlösung (isotopenverdünntes ³H-TCDD) gefüllte Stücke des Dialyseschlauchs eingebracht und diese mit 10 ml Phosphatpuffer (ungereinigtes ³H-TCDD) bzw. 3 ml 0,82 µmol/l Albuminlösung (isotopenverdünntes ³H-TCDD) equilibriert. Proben von 100 µl (ungereinigtes ³H-TCDD) bzw. 10 µl (isotopenverdünntes ³H-TCDD) wurden nach 24, 36, 48, 60, 72, 96 und 400 h genommen. Nach 400 h betrug die maximal erreichte Konzentration im reinen Phosphatpuffer 4 ppt entsprechend 23 % der in der Literatur angegebenen Löslichkeit in Wasser. In den Albuminlösungen konnte auch nach 400 h keine Radioaktivität nachgewiesen werden. Über 90% der eingesetzten Radioaktivität wurden dabei adsorbiert an den Filterpapierstreifen gefunden, dieses System wurde daher nicht weiter verwendet.

Nun wurde die Eignung von Aluminium-Wägeschiffchen anstelle der Filterpapierstreifen untersucht. Je 100 nCi ungereinigtes ³H-TCDD wurden in zwei Aluminium-Wägeschiffchen vorgelegt, diese in Dialyseschlauchstücke eingebracht, und mit je 3 ml Phosphatpuffer inkubiert. Proben zu je 50 µl wurden nach 44, 139, 192, 282, 402 und 715 h entnommen ihr Radioaktivitätsgehalt untersucht. Tabelle 3-8 zeigt die hierbei erhaltenen Aktivitäten in der umgebenden Lösung.

Tabelle 3-8 zeigt deutlich, daß auch nach 750 h ein Gleichgewichtszustand nicht ganz erreicht war. Um dennoch eine Aussage über die erreichbare Gleichgewichtskonzentration zu erhalten, wurde eine Gleichgewichtskonzentration aus dem Achsenabschnitt einer Ausgleichsgeraden

Tabelle 3-8: Verlauf der Aktivitätszunahme in der Dialyselösung (Phosphatpuffer) bei Dialyse gegen eine gesättigte wäßrige Lösung von ungereinigtem ^3H -TCDD, in der die Konzentration des ungereinigten ^3H -TCDD durch überschüssigen Bodenkörper der Substanz konstant gehalten wird; Grenze der Durchlässigkeit der Membran in Abhängigkeit vom Molekulargewicht: 1000D

Inkubationszeit [h]	44	139	192	282	402	715
Aktivität im Phosphatpuffer [nCi/ml]	0,18	0,55	0,80	1,0	1,3	1,6

errechnet. Dabei wurde gemäß der Gleichung (Zur Ableitung von Gleichung 12 siehe Anhang 7.2):

$$[^3\text{H}-\text{TCDD}] = L_{^3\text{H}-\text{TCDD},\text{H}_2\text{O}} - \left(\frac{1}{k_v} \right) \frac{[^3\text{H}-\text{TCDD}]}{t} \quad \text{Gleichung 12}$$

die in der wäßrigen Lösung ermittelte Aktivität [^3H -TCDD] in nCi gegen [^3H -TCDD]/t aufgetragen. Für die Parameter $L_{^3\text{H}-\text{TCDD},\text{H}_2\text{O}}$, also der Löslichkeit von ^3H -TCDD im reinen Lösungsmittel, sowie k_v , der Geschwindigkeitskonstante des Austauschs zwischen den Kompartimenten, wurden $3,1 \pm 0,3$ nCi/ml (entsprechend 36 ± 3 ppt bezogen auf die reine Substanz) und $1,59 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,78 gefunden.

Da der auf diese Weise ermittelte Wert für die Wasserlöslichkeit von ^3H -TCDD nahe an den in der Literatur angegebenen Werten lag, wurde diese Methode für weitere Versuche gewählt. Es wurde nun untersucht, welche Menge TCDD vorgelegt werden muß, um alle nicht-spezifischen Bindungsstellen an den Oberflächen im System abzusättigen und damit die Voraussetzung der Anwendbarkeit von Gleichung 9, nämlich das Vorliegen einer gesättigten Lösung über einem festen Bodenkörper, zu garantieren. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen von ungereinigtem ^3H -TCDD und isopenverdünntem ungereinigtem ^3H -TCDD bzw. isopenverdünntem ^{14}C -TCDD gelöst in Toluol in Aluminium-Wägeschiffchen eingebracht und das Lösungsmittel durch Verdunsten bis zur Trockne entfernt: 1. 100 nCi ungereinigtes ^3H -TCDD; 2. 1 μCi ungereinigtes ^3H -TCDD, 3. 620 nCi ungereinigtes ^3H -TCDD unter Zusatz von 45 nCi ^{14}C -TCDD (120 ng, 0,37 nmol, entsprechend einem molaren Verhältnis ^{14}C -TCDD/ ^3H -TCDD von 16:1 bezogen auf die reinen Substanzen), 4. 450 nCi ungereinigtes ^3H -TCDD unter Zusatz von 530 nCi ^{14}C -TCDD (1,41 μg , 4,35 nmol, entsprechend einem molaren Verhältnis ^{14}C -TCDD/ ^3H -TCDD von 250:1 bezogen auf die reinen Substanzen) sowie 5. 1,42 μCi ^{14}C -TCDD (3,8 μg , 11,7 nmol) unter Zusatz von

Tabelle 3-9: Maximale Konzentrationen in der Dialyselösung bei der Dialyse von wäßrigen Lösungen von ungereinigtem ^3H -TCDD, deren Konzentration durch einen festen Bodenkörper konstant gehalten wird, gegen Phosphatpuffer bzw. wäßrige Lösungen von Albumin; Durchlässigkeit der Dialysemembran: bis 1000 D

Inkubationslösung	Eingesetzte Radioaktivität	Aktivität in Dialyselösung nach 750 h	Wiederfindungsraten	
			gesamt	davon in Inkubationslösung (5ml)
	[nCi]	[nCi/ml]		
Phosphatpuffer	100 ^3H	0,04 ± 0,01 ^3H	81 ± 5 % ^3H	0,20 %
0,82 µM Albumin	1000 ^3H	0,41 ± 0,02 ^3H	71 ± 1 % ^3H	0,20 %
0,82 µM Albumin	620 ^3H , 45 ^{14}C	0,25 ± 0,02 ^3H 0,01 ± 0,005 ^{14}C	94 ± 1 % ^3H 95 ± 1 % ^{14}C	0,20 % ^3H 0,11 % ^{14}C
0,82 µM Albumin	450 ^3H , 530 ^{14}C	0,14 ± 0,01 ^3H 0,09 ± 0,01 ^{14}C	91 ± 1 % ^3H 93 ± 2 % ^{14}C	0,16 % ^3H 0,08 % ^{14}C
0,82 µM Albumin	1420 ^{14}C	0,23 ± 0,01 ^{14}C	83 ± 1 % ^{14}C	0,08 % ^{14}C

12,4 µg TCDD (53,9 nmol, entsprechend einem molaren Verhältnis TCDD/ ^{14}C -TCDD von 4,6:1 bezogen auf die reinen Substanzen). Die Aluminium-Wägeschiffchen wurden in Dialyseschlauchstücke eingebracht und mit je 5 ml Phosphatpuffer (1.) bzw. 0,82 µmol/l Albuminlösung (2. – 5.; insgesamt 4,1 nmol Albumin, entsprechend molaren Verhältnissen TCDD/Albumin von ca. 1:100, 1:10, 1:1 und 10:1 bezogen auf die reinen Substanzen) inkubiert. Der Gehalt an Radioaktivität in der Lösung wurde jeweils nach 50, 100, 220, 410, 610 und 750 h untersucht. Zwischen 610 und 750 h wurde kein weiterer Anstieg des Radioaktivitätsgehalts in Lösung mehr festgestellt.

Tabelle 3-9 faßt die nach 750 h in der Dialyselösung ermittelten Konzentrationen an radioaktiv markiertem TCDD zusammen. Diese verhielten sich wie 1:10:55:470:5000 (berechnet aus der ^3H -TCDD-Aktivität für 1. und 2., aus der ^{14}C -TCDD-Aktivität für 3. - 5.). Sieht man von dem Sprung zwischen den aus der ^3H -TCDD- und der ^{14}C -TCDD-Aktivität berechneten Werten ab, entspricht dieses Verhältnis dem Verhältnis der eingesetzten Substanzen. Somit konnte eine Sättigung des Systems auf diesem Wege nicht erreicht werden. Jedoch blieben die in der Dialyselösung festgestellten Aktivitäten weit unter den bei dem vorangegangenen Versuch beobachteten. Wie aus Tabelle 3-9 ersichtlich, belief sich die aus

der gesamten Dialyselösung wiedergewonnene Aktivität nur auf einen sehr kleinen Bruchteil der eingesetzten Aktivität.

Der Versuch wurde analog wiederholt, wobei der Dialyseschlauch durch einen solchen mit einer Durchlässigkeit für Moleküle bis Molekulargewicht 100,000 D ersetzt wurde, zum Einsatz kamen: 1. 200 nCi ungereinigtes ^3H -TCDD; 2. 700 nCi ungereinigtes ^3H -TCDD, 3. 420 nCi ungereinigtes ^3H -TCDD unter Zusatz von 30 nCi ^{14}C -TCDD (80 ng, 0,24 nmol, entsprechend einem molaren Verhältnis ^{14}C -TCDD/ ^3H -TCDD von 16:1 bezogen auf die reinen Substanzen), 4. 270 nCi ungereinigtes ^3H -TCDD unter Zusatz von 320 nCi ^{14}C -TCDD (0,85 μg , 2,63 nmol, entsprechend einem molaren Verhältnis ^{14}C -TCDD/ ^3H -TCDD von 250:1 bezogen auf die reinen Substanzen) sowie 5. 291 nCi ^{14}C -TCDD (0,77 μg , 2,39 nmol) unter Zusatz von 7,6 μg TCDD (23,5 nmol, entsprechend einem molaren Verhältnis TCDD/ ^{14}C -TCDD von 10:1 bezogen auf die reinen Substanzen).

Wie auch im vorangegangenen Versuch beobachtet, stieg die Aktivität in der Lösung zwischen 500 h und 600 h nur noch wenig an, sie fiel jedoch in den mehr als der Hälfte der Versuchsansätze deutlich ab, wobei gleichzeitig eine milchige Eintrübung der Dialysemembran festzustellen war. Dies kann vermutlich auf mikrobiellen Befall

Tabelle 3-10: Dialyse von wässrigen Lösungen von ^3H -TCDD, deren Konzentration durch eine festen Bodenkörper konstant gehalten wird, gegen Phosphatpuffer bzw. wässrige Lösungen von Albumin; Durchlässigkeit der Dialysemembran: bis 100,000 D

Inkubationslösung	Eingesetzte Radioaktivität	Aktivität in Dialyselösung nach 600 h	Wiederfindungsraten	
			gesamt	davon in Inkubationslösung (5ml)
	[nCi]	[nCi/ml]		
Phosphatpuffer	200 ^3H	$1,08 \pm 0,01$ ^3H	32 ± 11 % ^3H	2,7 %
0,82 μM Albumin	700 ^3H	$13,0 \pm 1$ ^3H	43 ± 4 % ^3H	9,3 %
0,82 μM Albumin	420 ^3H , 30 ^{14}C	$1,45 \pm 0,04$ ^3H $0,10 \pm 0,005$ ^{14}C	103 ± 12 % ^3H 64 ± 16 % ^{14}C	1,7 % ^3H 1,7 % ^{14}C
0,82 μM Albumin	270 ^3H , 320 ^{14}C -	$0,65 \pm 0,01$ ^3H $0,48 \pm 0,04$ ^{14}C	135 ± 8 % ^3H 78 ± 3 % ^{14}C	0,24% ^3H 0,15 % ^{14}C
0,82 μM Albumin	291 ^{14}C	$0,29 \pm 0,01$ ^{14}C	56 ± 7 % ^{14}C	0,1 % ^{14}C

zurückgeführt werden, trotz der Zugabe von NaN_3 als Bakterizid zum Phosphatpuffer. Da sich in den nicht eingetrübten Ansätzen keine Veränderung der Aktivität in der Dialyselösung gegenüber 600 h zeigte, wurden die nach 600 h ermittelten Aktivitäten ausgewertet. Tabelle 3-10 gibt die dabei erhaltenen maximalen Aktivitäten in der Dialyselösung wieder.

Tatsächlich stimmte nun die im Phosphatpuffer gefundene Aktivität umgerechnet auf die Konzentration an reinem ^3H -TCDD mit 13 ppt sehr gut mit den Literaturwerten überein. Zudem war der Anstieg der Gesamt-TCDD-Konzentrationen in Lösung mit 1:12:20:100:600 weniger deutlich abhängig von der vorgelegten Menge. Eine Sättigung des Systems konnte aber dennoch nicht festgestellt werden. Weiterhin machten die ungenügenden Wiederfindungsraten in diesem Experiment die Ergebnisse zweifelhaft. Die Versuche wurden an diesem Punkt nicht weitergeführt.

Es bleibt zu bemerken, daß bei obigen Versuchen, immer wenn ein Bodenkörper von in bekanntem Verhältnis mit ^{14}C -TCDD isotonenverdünntes ^3H -TCDD vorlag, in den wäßrigen Lösungen stets $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse gefunden wurden, die teilweise deutlich vom eingesetzten Verhältnis abwichen. Dabei war das Verhältnis immer größer als aufgrund der eingesetzten Mengen $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ zu erwarten war, und die Abweichungen waren um so größer, je kleiner das eingesetzte $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis ursprünglich war. Mögliche Ursachen hierfür werden im Folgenden diskutiert.

3.3 Untersuchung der Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihrer Beeinflussung durch Futterzusätze

3.3.1 Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Cholestyramin

Tabelle 3-11 gibt die durchschnittliche Gewichtszunahme sowie Futtermenge der mit ^3H -TCDD und Futter unter Zusatz von Cholestyramin behandelten Gruppen von je 5 Ratten über die Dauer des Versuchs wieder. Die durchschnittliche Futtermenge pro kg Körpergewicht und Tag wurde dabei für jede Ratte aus der kumulativen aufgenommenen Futtermenge dividiert durch die Summe über das täglich ermittelte Körpergewicht errechnet. Die Daten scheinen zu belegen, daß bereits die Gabe von $2\ \mu\text{g}$ TCDD/kg Körpergewicht zu einer Verminderung der Futtermenge führt; dieser Unterschied bleibt auch nach Korrektur für die geringere Gewichtszunahme signifikant. Hierzu muß jedoch bemerkt werden, daß in

Tabelle 3-11: Durchschnittliche Gewichtszunahme, kumulative Futtermenge und tägliche Futtermenge pro kg Körpergewicht von Ratten (n = 5 Ratten pro Gruppe) innerhalb von 21 Tagen nach oraler Gabe von unterschiedlichen Mengen an ungereinigtem ^3H -TCDD bzw. isotonverdünnem ungereinigtem ^3H -TCDD unter Fütterung mit normalem Futter oder mit Futter, dem 4 Gew.-% Cholestyramin beigemischt wurden

Behandlung	Gewicht an Tag 21 [% des Ausgangsgewichts]	Kumulative Futtermenge aufnahme in 21 Tagen [g]	Futtermenge [g/kg Körpergewicht und Tag]
$2\ \mu\text{g}$ TCDD/kg + Cholestyramin	120 ± 3	586 ± 29	84 ± 3
$2\ \mu\text{g}$ TCDD/kg	126 ± 5	561 ± 49	79 ± 1
$8\ \text{ng}$ TCDD/kg + Cholestyramin	133 ± 7	861 ± 36	118 ± 6
$8\ \text{ng}$ TCDD/kg	139 ± 4	877 ± 43	114 ± 5
Cholestyramin	131 ± 3	862 ± 30	116 ± 2
Ohne	135 ± 7	859 ± 14	116 ± 4

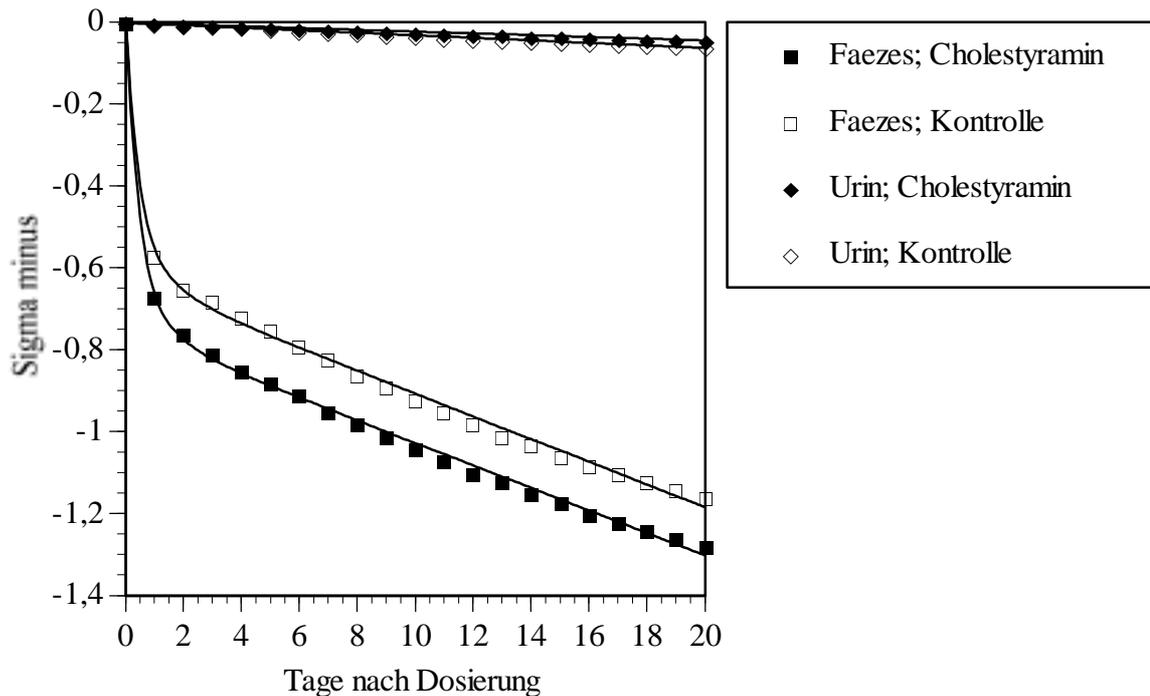


Abbildung 3-7: Sigma minus Auftragung ($\ln(1 - \text{kumulative Ausscheidung in Bruchteilen der Dosis})$ gegen Zeit nach Dosierung) der Ausscheidung einer Dosis von $2 \mu\text{g}$ isotonenverdünntem ungereinigtem $^3\text{H-TCDD}$ mit den Fäzes (■ bzw. □) und dem Urin (◆ bzw. ◇) durch Ratten ohne (□ bzw. ◇) und mit (■ bzw. ◆) Futterzusatz Cholestyramin

diesem Versuch keine Korrektur für verschüttetes Futter vorgenommen wurde. Die in Metabolismuskäfigen gehaltenen Tiere können aber aufgrund des Aufbaus der Käfige weniger Futter verschütten. Zweifellos festzustellen ist jedoch bei der mit $2 \mu\text{g}$ isotonenverdünntem $^3\text{H-TCDD}$ und Cholestyramin behandelten Gruppe eine signifikant geringere Zunahme des Körpergewichts gegenüber den Gruppen, welche weniger TCDD erhalten hatten.

Abbildung 3-7 stellt den zeitlichen Verlauf des im Körper verbliebenen Anteils der Dosis in einer für die Darstellung der Ausscheidung übliche Sigma minus Auftragung ($\text{Sigma minus} = \ln(1 - \text{kumulative Ausscheidung in Bruchteilen der Dosis})$ gegen Zeit nach Dosierung) berechnet aus den in Fäzes und Urin gefundenen Radioaktivitätsgehalten gemittelt über die mit $2 \mu\text{g/kg}$ behandelten Tiergruppen dar. Bei dieser Art der Darstellung ergibt sich eine Gerade, wenn die Ausscheidung einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung folgt. Die Ausscheidung mit den Fäzes während der ersten zwei Tage wich jedoch klar von einem solchen Verhalten ab. In beiden Gruppen wurden zwischen 39 % und 62 % ($50 \pm 7 \%$, $n = 10$) der Dosis innerhalb von 48 h nach der Dosierung wieder ausgeschieden, wonach sich die Ausscheidung verlangsamte. Wegen des augenscheinlich großen Unterschiedes in der

Resorption der Dosis wurden Fehlerbalken der besseren Übersichtlichkeit halber in Abbildung 3-7 nicht eingefügt. Im Gegensatz zur Ausscheidung mit den Fäzes ergab die Ausscheidung mit dem Urin in der obigen Auftragung für beide Gruppen in erster Näherung eine Gerade. Die kumulative Ausscheidung mit dem Urin und den Fäzes innerhalb von 20 Tagen beliefen sich auf $3,6 \pm 0,4 \%$ und $73 \pm 2 \%$ in der mit Cholestyramin behandelten Gruppe bzw. $5,0 \pm 0,4 \%$ und $69 \pm 5 \%$ in der Kontrollgruppe, wobei der Unterschied in der kumulativen Ausscheidung mit dem Urin zwischen diesen Gruppen statistische Signifikanz erreichte ($p < 0,05$). Mit den optimierten Parametern der in Abbildung 3-7 gezeigten Kurvenanpassung errechnet sich eine Halbwertszeit für die Ausscheidung von ^3H -TCDD mit den Fäzes von 24 ± 4 Tagen für die mit Cholestyramin gefütterten Tiere, bzw. 24 ± 3 Tagen für die Kontrolltiere. Die Methode der Kurvenanpassung ist unter 3.3.3 beschrieben.

Tabelle 3-12 faßt die für die Verteilung der Radioaktivität in den Geweben gefundenen Werte zusammen. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den Anteil der in den Geweben verbliebenen Radioaktivität von der ursprünglichen Dosis. Zwischen den mit Cholestyramin behandelten Tieren und den Kontrollen einer Dosisgruppe ergaben sich, bedingt auch durch die hohen Standardabweichungen innerhalb der Gruppen, keine signifikanten Unterschiede. Die Unterschiede zwischen den Dosisgruppen erreichten hingegen mit Ausnahme der Niere in allen Geweben statistische Signifikanz, insbesondere ist die Verschiebung der relativen

Tabelle 3-12: Ausscheidung von TCDD unter Verabreichung von Cholestyramin: Gewebekonzentrationen 21 Tage nach der Dosierung

Dosis	2 µg/kg		8 ng/kg		Einheit
	Cholestyramin	Kein Cholestyramin	Cholestyramin	Kein Cholestyramin	
Leber	6 ± 2	5 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	Prozent der Dosis im Organ
Niere	14 ± 4	19 ± 9	28 ± 29	25 ± 27	Prozent der Dosis im Organ (x 1000)
Serum	$4,6 \pm 0,7$	5 ± 1	$2,2 \pm 0,5$	3 ± 1	Prozent der Dosis pro ml (x 1000)
Muskeln	$3,3 \pm 0,9$	$4 \pm 2\%$	5 ± 2	9 ± 2	Prozent der Dosis pro g Gewebe (x 1000)
Haut	6 ± 1	7 ± 2	18 ± 7	24 ± 3	Prozent der Dosis pro g Gewebe (x 1000)
Fettgewebe	$0,07 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,04$	$0,3 \pm 0,1$	Prozent der Dosis pro g Gewebe

Die angegebenen Fehler repräsentieren Standardabweichungen.

Belastung vom Fettgewebe zur Leber beim Übergang von der niedrigen zur höheren Dosis beachtenswert. Die in der Niere gemessenen Aktivitäten lagen jedoch, insbesondere bei der niedrigeren Dosis, nah an den in unbelasteten Proben gemessenen Hintergrund (ca. 0,6 Zählereignisse pro Minute bei einstündiger Messung im Szintillationszähler; bei Festlegung einer Nachweisgrenze beim 3-fachen des Hintergrundes ergibt sich diese bei einer spez. Aktivität des ungereinigten ^3H -TCDD zum Zeitpunkt der Versuche von 26,5 Ci/mmol zu ca. 20 – 100 fg bezogen auf die reine Substanz je nach Quench der Probe).

Die Bestimmung der EROD-Aktivitäten in der mikrosomalen Fraktion von homogenisierten Leberproben ergab für die beiden mit 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ behandelten Gruppen Aktivitäten von 2200 ± 400 bzw. 1950 ± 350 pmol/(mg \times min) (Cholestyramin bzw. Kontrolle), für die mit 8 ng/kg dosierten Tiere 140 ± 40 bzw. 140 ± 40 pmol/(mg \times min) (Cholestyramin bzw. Kontrolle) und für die nicht mit TCDD behandelten Tiere 150 ± 20 bzw. 120 ± 20 pmol/(mg \times min). Letztere entsprechen den routinemäßig für unbehandelte Tiere gemessenen Werte für diesen Parameter.

3.3.2 Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Hexadekan

Tabelle 3-13 gibt die durchschnittliche Gewichtszunahme sowie Futteraufnahme der mit ^3H -TCDD und Futter unter Zusatz von Hexadekan behandelten Gruppen von je 5 Ratten über die Dauer des Versuchs wieder. Die durchschnittliche Futteraufnahme pro kg Körpergewicht und Tag wurde dabei wie unter 2.9.3.1 beschrieben errechnet. In diesem Versuch wurden nur die nicht mit TCDD behandelten Tiere in Stahlkäfigen gehalten, und bei allen Tieren wurde verschüttetes Futter von der Futteraufnahme abgezogen. Der deutlich geringere Unterschied zwischen einzelnen Gruppen hinsichtlich der Futteraufnahme im Vergleich zu dem Experiment unter Verwendung von Cholestyramin als Futterzusatz zeigt den Einfluß der Berücksichtigung verschütteten Futters. Auch war kein signifikanter Unterschied in der Gewichtszunahme der einzelnen Gruppen festzustellen.

Tabelle 3-13: Durchschnittliche Gewichtszunahme, kumulative Futtermittelaufnahme und tägliche Futtermittelaufnahme pro kg Körpergewicht von Ratten (n = 5 Ratten pro Gruppe) innerhalb von 21 Tagen nach oraler Gabe von unterschiedlichen Mengen an ungereinigtem ³H-TCDD bzw. isotonenverdünntem ungereinigtem ³H-TCDD unter Fütterung mit normalem Futter oder mit Futter, dem 5 Gew.-% Hexadekan beigemischt wurden

Behandlung	Gewicht an Tag 21 [% des Ausgangsgewichts]	Kumulative Futtermittelaufnahme in 21 Tagen [g]	Futtermittelaufnahme [g/kg Körpergewicht und Tag]
2 µg TCDD/kg + Hexadekan	143 ± 13	537 ± 64	80 ± 4
2 µg TCDD/kg	142 ± 4	498 ± 36	75 ± 2
8 ng TCDD/kg + Hexadekan	139 ± 9	586 ± 75	84 ± 8
8 ng TCDD/kg	140 ± 10	616 ± 45	89 ± 4
Hexadekan	145 ± 5	683 ± 47	98 ± 4
Unbehandelt	150 ± 9	662 ± 66	91 ± 9

Abbildung 3-8 zeigt den Verlauf des im Körper der Versuchstiere verbliebenen Dosis als Funktion der Zeit in einer Sigma minus Auftragung. Während sich nahezu identische Halbwertszeiten (mit Hexadekan: 27 ± 3 Tage; ohne Hexadekan: 25 ± 3 Tage) mit der in 3.3.3 beschriebenen Kurvenanpassungsmethode für die Ausscheidung mit den Fäzes in den beiden hoch dosierten Gruppen ergaben, fand sich bei den niedrig dosierten Gruppen ein deutlicher Unterschied zugunsten der mit Hexadekan behandelten Gruppe (mit Hexadekan: 40 ± 7 Tage; ohne Hexadekan: 71 ± 12 Tage).

Die kumulative Ausscheidung belief sich auf 65 ± 5 % bzw. 62 ± 3 % der Dosis mit den Fäzes und 6 ± 2 % bzw. 7 ± 1 % der Dosis mit dem Urin mit bzw. ohne Hexadekan in den mit einer hohen Dosis behandelten Gruppen sowie 55 ± 3 % bzw. 49 ± 4 % der Dosis mit den Fäzes und $2,2 \pm 0,2$ % bzw. $2,5 \pm 0,4$ % der Dosis mit dem Urin mit bzw. ohne Hexadekan in den mit einer niedrigen Dosis behandelten Gruppen. Nur die Ausscheidung mit den Fäzes in den mit einer niedrigen Dosis behandelten Gruppen ergab einen signifikanten Unterschied durch die Zugabe von Hexadekan zum Futter. Hingegen waren sowohl die Ausscheidung mit den Fäzes wie auch mit dem Urin in den höher dosierten Gruppen signifikant höher als in den mit 8 ng TCDD/kg Körpergewicht dosierten Gruppen.

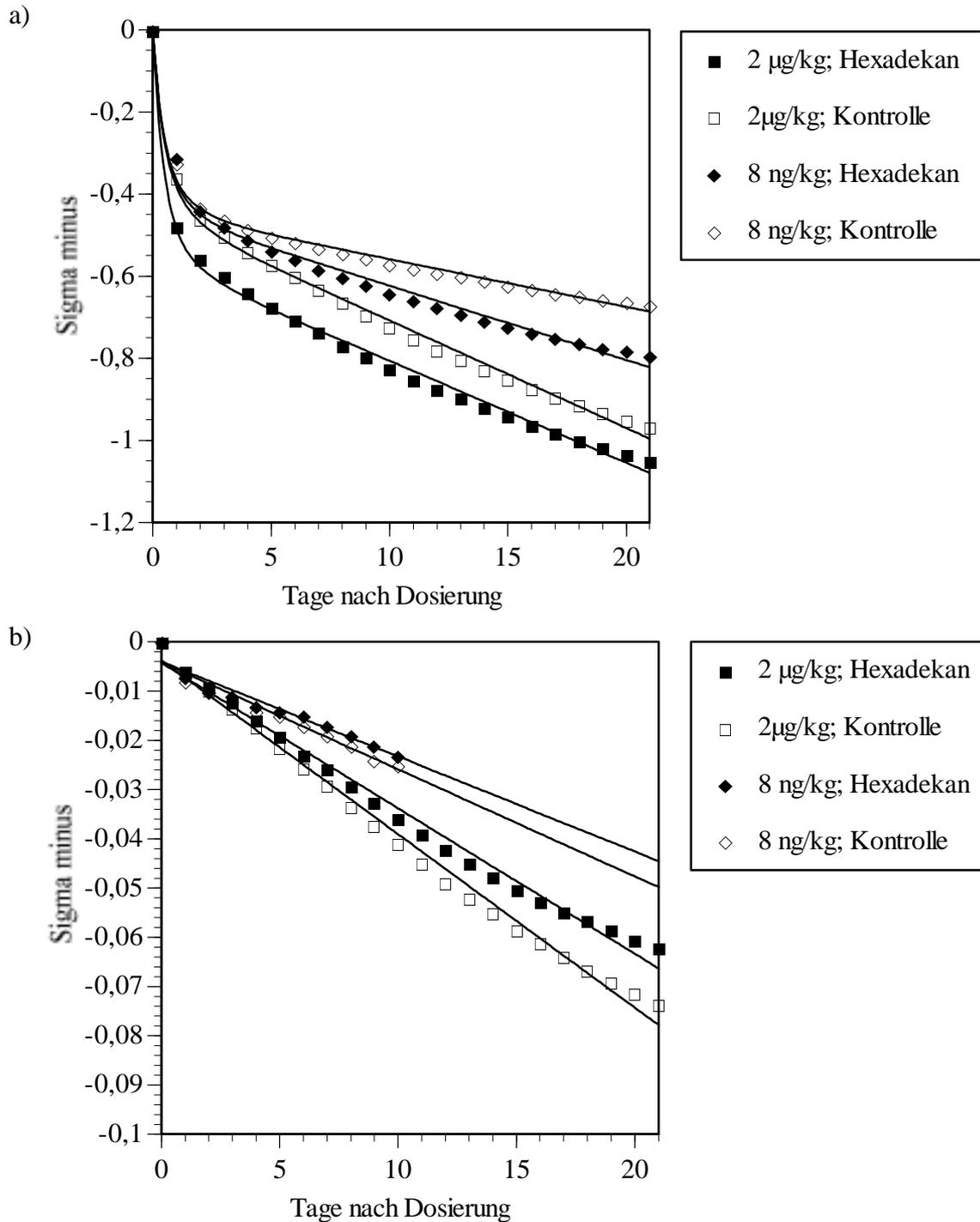


Abbildung 3-8: Sigma minus Auftragung (ln(1-kumulative Ausscheidung in Bruchteilen der Dosis) gegen Zeit nach Dosierung) der Ausscheidung einer Dosis von 2 µg (■ bzw. □) oder 8 ng (◆ bzw. ◇) isotopenverdünntem ungereinigtem ³H-TCDD durch Ratten ohne (□ bzw. ◇) und mit (■ bzw. ◆) Futterzusatz Hexadekan; a) Fäzes; b) Urin

Tabelle 3-14 gibt die in diesem Versuch bestimmten Verteilungen der nach 21 Tagen noch verbliebenen Belastungen mit ³H-TCDD auf die Organe wieder. Obwohl das Fasten der Ratten den gewünschten Zweck, der Erhöhung der Resorptionsrate, erreichte (nur $37 \pm 6 \%$

Tabelle 3-14: Ausscheidung von TCDD unter Verabreichung von Hexadekan: Gewebekonzentrationen 21 Tage nach der Dosierung, korrigiert für die Ausscheidung nicht resorbierten Materials in den ersten 48 h nach der Dosierung

Dosis	2 µg/kg		8 ng/kg		Einheit
	Hexadekan	Kein Hexadekan	Hexadekan	Kein Hexadekan	
Leber	5 ± 1	6 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	Prozent der Dosis im Organ
Serum	6 ± 2	8 ± 1	3 ± 1	4 ± 2	Prozent der Dosis pro ml (x 1000)
Muskeln	5 ± 1	6 ± 1	7 ± 2	7 ± 1	Prozent der Dosis pro g Gewebe (x 1000)
Haut	12 ± 4	16 ± 1	34 ± 11	40 ± 10	Prozent der Dosis pro g Gewebe (x 1000)
Fettgewebe	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0,7 ± 0.2	0,8 ± 0.3	Prozent der Dosis pro g Gewebe

Die angegebenen Fehler repräsentieren Standardabweichungen.

wurden in den ersten 48 h ausgeschieden), konnte eine Verringerung der Standardabweichungen innerhalb einzelner Dosisgruppen nicht verwirklicht werden. Die Verteilung der ³H-TCDD assoziierten Radioaktivität auf die isolierten Gewebe weist einige Unterschiede zu der Verteilung auf, die in dem Experiment unter Verwendung von Cholestyramin gefunden wurden. So ist zwar, wie im Vergleich mit Tabelle 3-12 ersichtlich, der Anteil der Dosis in der Leber, in Serum und in Muskeln nahezu gleich, und auch die Erhöhung des Anteils in der Leber mit der Dosis findet sich wieder. Die Gehalte in den stark lipophilen Geweben, Haut und Fettgewebe, zeigen sich jedoch in etwa verdoppelt.

Die Bestimmung der EROD-Aktivitäten in der mikrosomalen Fraktion von homogenisierten Leberproben ergab für die beiden mit 2 µg TCDD/kg Körpergewicht behandelten Gruppen Aktivitäten von 3400 ± 700 bzw. 2500 ± 400 pmol/(mg x min) (Hexadekan bzw. Kontrolle), für die mit 8 ng TCDD/kg Körpergewicht dosierten Tiere 138 ± 26 bzw. 110 ± 28 pmol/(mg x min) (Hexadekan bzw. Kontrolle) und für die nicht mit TCDD behandelten Tiere 129 ± 40 bzw. 77 ± 23 pmol/(mg x min) (Hexadekan bzw. Kontrolle). Der Trend zu einer leichten Erhöhung dieses Werts in den mit Hexadekan behandelten Tieren erreichte statistische Signifikanz nur in den Kontrolltieren.

3.3.3 Validierung der Ergebnisse zu Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten unter Gabe von Futterzusätzen

Das Gewicht der Ratten nach 10tägiger Versuchsdauer wurde zu $134 \pm 6 \%$ bzw. $132 \pm 4 \%$ bzw. $135 \pm 5 \%$ des Ausgangsgewichts ermittelt. Die in den Lebern der Ratten nach 10tägiger Versuchsdauer verbliebenen Mengen an Radioaktivität beliefen sich auf $23 \pm 10 \%$ bzw. $1 \pm 0,05 \%$ bzw. $18 \pm 3 \%$ der Dosis, und EROD-Aktivitäten in mikrosomalen Fraktionen von Leberhomogenaten wurden zu $83 \pm 35 \text{ pmol}/(\text{mg} \times \text{min})$ bzw. $78 \pm 37 \text{ pmol}/(\text{mg} \times \text{min})$ bzw. $103 \pm 22 \text{ pmol}/(\text{mg} \times \text{min})$ nach Verabreichung des gereinigten Standards bzw. der isolierten Verunreinigungen bzw. des ungereinigten $^3\text{H-TCDD}$ bestimmt.

Abbildung 3-9 stellt den zeitlichen Verlauf der Ausscheidung des ungereinigten Standards mit dem des gereinigten Standards und der isolierten Verunreinigung verglichen in Form einer Sigma minus Auftragung grafisch dar. Diese Daten wurden dazu verwendet, um mittels einer parametrisierten Kurvenanpassungsroutine im Programm Deltagraph die Konstanten zu ermitteln, welche die Ausscheidung der Komponenten des verunreinigten Standards beschreiben.

Dazu wurde zunächst angenommen, daß die gesamte von den mit gereinigtem $^3\text{H-TCDD}$ behandelten Ratten ausgeschiedene Radioaktivität ausschließlich auf $^3\text{H-TCDD}$ bzw. dessen Metaboliten zurückzuführen war. Damit kann die anfängliche schnelle Komponente der Ausscheidung nur auf nicht resorbiertes Material zurückzuführen sein. Damit können aus den für die Ausscheidung des gereinigten $^3\text{H-TCDD}$ erhaltenen Werten die Geschwindigkeitskonstanten der Ausscheidung von $^3\text{H-TCDD}$ mit den Fäzes bei der gegebenen Dosis von $8 \text{ ng } ^3\text{H-TCDD}$ sowie die Geschwindigkeitskonstante der Ausscheidung nicht resorbierten Materials ermittelt werden. Hierzu wurden die Parameter a , b und c einer Gleichung der Form

$$\sigma_{\text{Minus},t} = \ln(a \times \exp(-b \times t) + (1 - a) \times \exp(-c \times t)) \quad \text{Gleichung 13}$$

wobei $\sigma_{\text{Minus},t}$ für $\ln(1 - \text{kumulative Ausscheidung in Bruchteilen der Dosis zur Zeit } t)$, a für den nicht resorbierten Anteil der Dosis, b bzw. c für die Geschwindigkeitskonstanten der Ausscheidung von nicht resorbiertem bzw. von resorbiertem $^3\text{H-TCDD}$ und t für die Zeit nach Dosierung in Tagen stehen, durch Minimierung der Quadrate der Abweichungen an die in Abbildung 3-9 gezeigten Daten angepaßt. Die Optimierung dieser Parameter ergab Werte von $a = 0,42$, $b = 2,944$ und $c = 0,01574$ entsprechend einer Resorptionsrate des $^3\text{H-TCDD}$ von

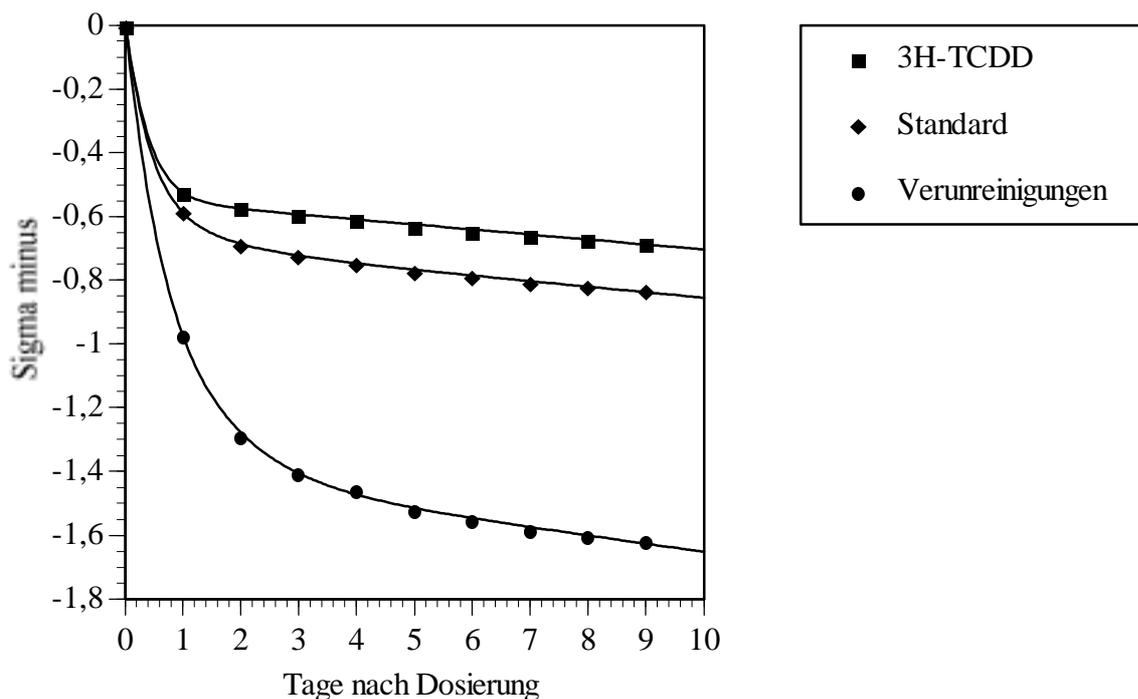


Abbildung 3-9: Sigma minus Auftragung (ln(1-kumulative Ausscheidung in Bruchteilen der Dosis) gegen Zeit nach Dosierung) der Ausscheidung einer Dosis von 8 ng gereinigtem ^3H -TCDD (■) und äquivalenter Mengen bezogen auf ^3H -Aktivität von ungereinigtem ^3H -TCDD (◆) bzw. der isolierten Verunreinigungen (●) mit den Fäzes in Sprague-Dawley Ratten

58 % und Halbwertszeiten von 5,7 h bzw. 44 Tagen für nicht resorbiertes bzw. resorbiertes Material.

Die im ^3H -TCDD-Standard enthaltenen Verunreinigungen bestanden zu etwa gleichen Teilen aus der polareren Verunreinigung 1 sowie einer Gruppe von 3 chemisch ähnlichen weniger polaren Verunreinigungen 2-4. Es lag daher die Vermutung nahe, daß die Ausscheidung der Verunreinigungen in erster Näherung durch die drei Komponenten nicht resorbiertes Material, Verunreinigung 1 sowie Verunreinigungen 2 – 4 beschrieben werden könnte. Die Halbwertszeit von oral dosiertem und nicht resorbiertem Material sollte aber, unter den gegebenen gut vergleichbaren Umständen, unabhängig von der verabreichten Substanz sein. Unter Verwendung der wie oben ermittelten Halbwertszeit für nicht resorbiertes Material wurden daher die Parameter d, e, f, g und h der Gleichung

$$\sigma_{\text{Minus},t} = \ln(d \times \exp(-2,944 \times t) + e \times \exp(-f \times t) + g \times \exp(-h \times t))$$

Gleichung 14

durch Anpassung an die in Abbildung 3-9 dargestellten Daten zu $d = 0,46$ (Anteil nicht resorbierten Materials), $e = 0,29$ (resorbierter Anteil der Dosis an vermutlich Verunreinigung 1), $f = 0,971$ (Geschwindigkeitskonstante der Ausscheidung von vermutlich Verunreinigung 1, entsprechend einer Halbwertszeit von 17 h), $g = 0,25$ (resorbierter Anteil der Dosis an vermutlich Verunreinigungen 2 - 4) und $h = 0,0253$ (Geschwindigkeitskonstante der Ausscheidung von vermutlich Verunreinigungen 2 - 4, entsprechend einer Halbwertszeit von 27 Tagen) ermittelt.

Die so erhaltenen Konstanten wurden nun in eine Gleichung zur Beschreibung des Verhaltens des ungereinigten $^3\text{H-TCDD}$ eingesetzt. Durch Optimierung der Parameter i und j in der Gleichung

$$\sigma_{\text{Minus},t} = \ln(i \times \exp(-2,944 \times t) + (1 - i) \times (0,69 \times \exp(-j \times t) + 0,15 \times \exp(-0,971 \times t) + 0,16 \times \exp(-0,0253 \times t))) \quad \text{Gleichung 15}$$

wurden Werte von $i = 0,40$ (Anteil nicht resorbierten Materials) und $j = 0,1576$ (Geschwindigkeitskonstante der Ausscheidung von $^3\text{H-TCDD}$, entsprechend einer Halbwertszeit von 44 Tagen) gefunden.

Gleichung 15 wurde daher verwendet, um mittels Parameteroptimierung die Ausgleichskurven für die Ausscheidung individueller Ratten zu berechnen und aus den damit erhaltenen Werten Halbwertszeiten für $^3\text{H-TCDD}$ unter den jeweiligen Bedingungen zu ermitteln. Die in Abbildung 3-7 sowie Abbildung 3-8 eingezeichneten Kurven wurden mit den jeweils über eine Gruppe gemittelten Parameter berechnet, die im Text angegebenen Halbwertszeiten sind über die für individuelle Tiere berechneten Halbwertszeiten gemittelt. Auf diese Weise wurde der Einfluß der starken Unterschiede in der Resorption der Ausgangsdosis auf die Berechnung der Halbwertszeiten minimiert.

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkung

Die Instabilität von ^3H -TCDD, und die eventuellen Konsequenzen für experimentelle Arbeiten mit ^3H -TCDD-Standards, finden in der Literatur Erwähnung¹⁵⁴. Dieser Bericht, wie auch erste experimentelle Ergebnisse, die mit den theoretisch zu erwartenden nicht in Einklang standen (z.B. höhere Wasserlöslichkeit des radioaktiven Standards im Vergleich zu der publizierten Löslichkeit von TCDD in Wasser), wurden zum Anlaß genommen, die Reinheit des Standards mittels GC/MS zu prüfen. Wie unter 2.1 erwähnt, wurde der Standard dabei irrtümlicherweise für rein befunden und für alle weiteren Versuche verwendet.

Die geringe Stabilität des tritiierten TCDD, insbesondere im Vergleich mit der hochstabilen, unmarkierten Verbindung, kann auf die Reaktion von Zerfallsprodukten des ^3H -TCDD mit Molekülen aus der Umgebung sowie auf radiolytische Zersetzung in Lösung zurückgeführt werden¹⁵⁵. Das Produkt des β -Zerfalls eines ^3H -Atoms sind ein $^3\text{He}^+$ -Atom und ein schnelles Elektron. Das $^3\text{He}^+$ -Atom besitzt eine hohe Tendenz zur Abspaltung vom aromatischen Ring des TCDD, das verbliebene Carbokation ist ein starkes Elektrophil und kann mit Lösungsmittelmolekülen reagieren. Weiterhin kann insbesondere bei der hohen spezifischen Aktivität des verwendeten Standards Die Kollision eines schnellen Elektrons mit einem weiteren ^3H -markierten TCDD-Molekül kann zur radiolytischen Abspaltung eines Chloratoms und damit zu ^3H -markierten Trichlordibenzo-*p*-dioxinen führen.

Der verwendete Standard stammte aus derselben Produktionscharge wie jener in der von Fernandez et al. beschriebenen Untersuchung analysierte, wurde ebenfalls seit 1987 in Toluol gelagert, und die Analyse durch Fernandez et al. wurde in etwa demselben Zeitraum durchgeführt wie die hierin beschriebenen Versuche¹⁵⁵. Die Ergebnisse scheinen daher weitgehend übertragbar, tatsächlich wurden die Gehalte an reinem ^3H -TCDD von den Autoren ebenfalls mit 62 - 75 % angegeben. In dieser Untersuchung waren die dominierenden Verunreinigungen (20 - 30 % der Gesamtradioaktivität) die o-, p- und m-Anlagerungsprodukte von Toluol an das aus dem Zerfall resultierende Carbokation. Damit könnten die drei auf mittels HPLC nicht komplett auflösbaren Verunreinigungen 2 - 4 bei r_f 0,63 - 0,78, ihre Erklärung finden. Die gegenüber TCDD verringerte Retention auf der C_{18} -Säule kann dabei eventuell auf die stark verringerte Symmetrie zurückgeführt werden, welche

über eine Herabsetzung der Gitterenergie im Kristall die Löslichkeit in allen Lösungsmitteln erhöht.

Verunreinigung 1 kann mit den Ergebnissen von Fernandez et al. jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Die von Fernandez et al. gefundenen Gehalte an verschiedenen substituierten Trichlordibenzo-*p*-dioxinen, welche in guter Übereinstimmung mit theoretisch berechneten standen, beliefen sich auf 2 - 8 %. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die radiolytische Zersetzung in dem hierin verwendeten Standard um ein Mehrfaches höher gewesen sein sollte. Jedoch wurde der hierin verwendete Standard stets bei -20 °C gelagert, und bei jedem Öffnen konnte Wasser aus der Umgebung einkondensieren. Eventuell führte dies verstärkt zur Reaktion des Carbokations Wasser zum 1-Hydroxy, 2,3,7,8-tetrachloro-*p*-dioxin, für das eine deutlich verringerte Retention im verwendeten Lösungsmittelsystem bei der HPLC erwartet werden kann.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde fast ausschließlich in wäßrigen Milieus gearbeitet. Die erhöhte Wasserlöslichkeit der Verunreinigungen machte eine Verifizierung des Einflusses der Verunreinigungen auf die erhaltenen Ergebnisse unabdingbar. Die Diskussion der so festgestellten Konsequenzen erfolgt separat für die einzelnen Themenbereiche.

4.2 Verteilung von TCDD im Blut von Mensch und Ratte

Eine Untersuchung der Verteilung von TCDD auf Blutfraktionen im Blut von Menschen wurde von Henderson und Patterson durchgeführt⁸⁸. Die Autoren berichten jedoch nur über durchschnittliche Verteilungen, ohne auf die Verteilung der Lipide bzw. des TCDD in individuellen Testpersonen, oder eine mögliche Korrelation zwischen diesen Größen, einzugehen. Bei Menschen konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den Konzentrationen von TCDD in Plasma und Fettgewebe bei Berechnung auf Basis der relativen Lipidgehalte festgestellt werden; auf dieser Tatsache beruht die heutige Praxis der Messung von PCDD-Körperlasten durch Quantifizierung der Konzentrationen im Plasma¹⁵⁶. Es bestand daher der begründete Verdacht, daß sich auch ein Zusammenhang zwischen der relativen Verteilung der Lipide auf die Blutfraktionen und der Verteilung von TCDD auf diese Fraktionen finden ließe, der eine mathematische Beschreibung der Verteilung von TCDD im Blut erlaubt. Die unter 1.3.2 erwähnte geringe Affinität für phospholipid-reiche Gewebe führten zu der Hypothese, daß die TCDD-Verteilung mit der Verteilung der Cholesterine und Triglyzeride korreliert. Der relative Anteil der unterschiedlichen Lipide an den Lipiden der drei Lipoproteinspezies ist sehr unterschiedlich (Mensch: HDL 40 % Phospholipide (P), 50 % Cholesterine (C), 10 %

Triglyzeride (T); LDL 25 % P, 65 % C, 10 % T; VLDL 18 % P, 25 % C, 57 % T¹⁵⁷), daher sollte eine solche Korrelation leicht feststellbar sein. Ergänzend eignet sich der Vergleich von Mensch und Ratte besonders deswegen, weil durch die deutlich niedrigeren Blutfettgehalte in Ratten ein großer Bereich dieser Variablen abgedeckt werden kann¹⁵⁷.

4.2.1 Methodenentwicklung

Die für die Bearbeitung dieser Fragestellung entwickelten Methoden zeigten sich adäquat. Der erste Schritt der zweistufigen Trennung der Lipid- und Plasmaproteinfraktionen ist ein an den Zentren für Erkrankungen des Lipidstoffwechsels der USA für die Untersuchung menschlichen Plasmas etabliertes Verfahren, die Plasmalipide werden dabei quantitativ zurückgewonnen¹⁵⁸. Die hohen Wiederfindungsraten von durchschnittlich >80 % des eingesetzten TCDD in diesem mehrstufigen Prozeß bestätigten die prinzipielle Anwendbarkeit der Methode auf die zu untersuchende Fragestellung.

Ein prinzipielles Problem bei der Übertragung des für menschliches Blut entwickelten Trennungsverfahrens auf Rattenblut bestand zunächst in der, im Gegensatz zum Menschen, unscharfen Trennung der Dichteverteilungen in den HDL und LDL der Ratten¹⁵⁹. Die in Abbildung 3-1 offensichtliche leichte Verunreinigung der aus Rattenblut isolierten HDL mit wenig VLDL beruht auf dieser Überlappung, ist jedoch erstens quantitativ unbedeutend und hat zweitens keinen Einfluß auf die hypothetisierte Korrelation. Einen größeren Einfluß auf die Ergebnisse hatte hingegen die im Vergleich zu menschlichen Lipoproteinen verminderte Stabilität der Ratten-Lipoproteine, insbesondere der Triglyzeride, gegenüber den hohen Kräften, die bei der Dichtegradienten-Zentrifugation, speziell im zweiten Trennungsschritt bei $488.000 \times g$, auf die Lipoproteine wirken. Dieses Phänomen war nicht bekannt und wurde nach seiner Identifikation, wo möglich, durch Kompensation für freies Glycerin berücksichtigt.

4.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung von ³H-TCDD/TCDD zwischen Lipoproteinen und Plasmaproteinfraktion

Wie Tabelle 3-1 belegt, ist die Verteilung von TCDD auf die Lipoproteinfraktionen weitgehend von der Menge des eingesetzten TCDD unabhängig. Der untersuchte Konzentrationsbereich übersteigt am oberen Ende die in belasteten Individuen typischerweise gefundenen um mehrere Zehnerpotenzen. Die Abnahme der von den Plasmaproben aufgenommenen Menge des radioaktiv markierten TCDD mit zunehmender Menge der

vorgelegten Verbindung zeigt, daß hier die Sättigungskonzentration von TCDD in Plasma beinahe erreicht war. Die untere Grenze war durch die Nachweisgrenze für die Szintillationsmessung von ^3H -TCDD in wäßrigen Lösungen (ca. 0,5 fmol/ml in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität des ^3H -TCDD-Standards) gegeben. Dies entspricht in etwa den Konzentrationen, die in den Versuchen mit Hexadekan und Cholestyramin im Serum der mit 8 ng/kg Körpergewicht behandelten Tiere 21 Tage nach Dosierung gefunden wurden. Da bei diesen Versuchstieren keine Induktion der CYP1A1 festgestellt werden konnte, entspricht diese Konzentration dem niedrigsten Bereich des Wirkungsspektrums von TCDD. Bei noch deutlich darunter liegenden Konzentrationen könnten Bindungssysteme mit hoher Affinität, jedoch geringer Kapazität, wie z.B. Präalbumin, zu einer Verschiebung der Verteilung führen, solch niedrige Konzentrationen wären aber von geringer physiologischer Relevanz.

Der deutliche Anstieg der Wiederfindungsraten mit der zugegebenen Gesamtmenge TCDD kann auf die Absättigung aktiver Adsorptionsstellen auf den Oberflächen der verwendeten Materialien zurückzuführen sein. Für die leichte Verschiebung des Radioaktivitätsgehalts von LDL zu Plasmaproteinen fand sich keine Erklärung.

4.2.3 Die Verteilung von ungereinigtem ^3H -TCDD zwischen Zellfraktion, Plasmaproteinen und Lipoproteinen, und ihre mathematische Beschreibung

Die in Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4 dargestellten Ergebnisse ermöglichen eine umfassende näherungsweise mathematische Beschreibung des Verteilungsverhaltens von TCDD im Blut von Menschen und Ratten mittels des Gleichungssystems

$$^3\text{H}_{\text{Zellfraktion}} = 55 - 9,3 \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}] \quad \text{Gleichung 16}$$

$$^3\text{H}_{\text{Plasmaproteine}} = 100 - (55 - 9,3 \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]) - (4 + 17 \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]) \quad \text{Gleichung 17}$$

$$^3\text{H}_{\text{HDL}} = (4 + 17 \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]) \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]_{\text{HDL}} \quad \text{Gleichung 18}$$

$$^3\text{H}_{\text{LDL}} = (4 + 17 \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]) \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]_{\text{LDL}} \quad \text{Gleichung 19}$$

$$^3\text{H}_{\text{VLDL}} = (4 + 17 \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]) \times [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]_{\text{VLDL}} \quad \text{Gleichung 20}$$

wobei $^3\text{H}_i$ für den prozentualen Gehalt an TCDD in der i-ten Fraktion am Gesamtgehalt an TCDD in Blut, $[\text{Chol.} + \text{Trigl.}]$ für die Summe der Gehalte an Cholesterinen und Triglyzeriden in mg/ml Plasma, und $[\text{Chol.} + \text{Trigl.}]_i$ für den prozentualen Anteil an Cholesterinen und Triglyzeriden in der i-ten Lipoproteinfraktion am Gesamtplasmagehalt dieser Lipide stehen.

Die numerischen Werte in den obigen Gleichungen wurden aus Steigungen und Achsenabschnitten der in Abbildung 3-2 gezeigten Ausgleichsgeraden erhalten, die Einheiten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Die Steigungen bzw. Achsenabschnitte der in Abbildung 3-3 gezeigten Ausgleichsgeraden wurden näherungsweise gleich 1 bzw. gleich 0 gesetzt.

Dabei muß berücksichtigt werden, daß das obige Gleichungssystem nicht einer physikalisch exakten Beschreibung der Bindung von TCDD an die verschiedenen, im Blut vorliegenden Bindungsstellen entspricht, sondern einen rein empirisch ermittelten Zusammenhang wiedergibt. Insbesondere kann dieses System nur bis zu einer Plasmakonzentration an Lipiden von ca. 5 mg/ml angewandt werden, da es der Tatsache nicht Rechnung trägt, daß ein prozentualer Gehalt in Lipoproteinen >100 % bzw. ein negativer prozentualer Gehalt in Plasmaproteinen nicht möglich sind. Ein solcher Blutfettgehalt entspricht jedoch einer starken Hyperlipidämie beim Menschen, und wird in Ratten nur unter extremen Bedingungen erreicht. TCDD ist in der Lage, in Ratten eine Hyperlipidämie auszulösen, jedoch wurden keine den Gültigkeitsbereich des obigen Systems überschreitenden Konzentrationen beobachtet¹⁶⁰.

In dem obigen Gleichungssystem wurden weiterhin Chylomikronen nicht berücksichtigt, welche den Transport von mit der Nahrung aufgenommen Lipiden, und auch von lipophilen Substanzen wie TCDD, über das Lymphsystem in den Körper vermitteln, und dort schnell vom Fettgewebe und der Leber aufgenommen werden⁷⁹. Die Berücksichtigung der Chylomikronen hätte einen nicht vertretbaren zusätzlichen experimentellen Aufwand bedeutet. Bezüglich der Zusammensetzung ähneln die Chylomikronen stark den VLDL, und es ist kein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Chylomikronen und den verbleibenden Lipoproteinspezies bekannt, der eine Übertragung der Ergebnisse nicht sinnvoll erscheinen ließe. Durch Hinzufügen einer den Gleichungen 18 – 20 analoge Gleichung mit $[\text{Chol.} + \text{Trigl.}]_i = [\text{Chol.} + \text{Trigl.}]_{\text{Chylomikronen}}$ ließe sich die Behandlung der Chylomikronen in einfacher Weise einführen.

4.2.4 Bindung von ³H-TCDD an Plasmaproteine

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bindung von ³H-TCDD an Plasmaproteine bestätigen die in der Literatur berichteten Befunde, unter Verwendung einer anderen Methodologie erhalten wurden¹⁵⁶. Auch bei der Trennung des lipidfreien Plasmas mittels Säulenchromatographie unter Protein-denaturierenden sowie nicht-denaturierenden

Bedingungen wurde der größte Teil des TCDD aus der Fraktion isoliert, welche Proteine des Molekulargewichts um 60 kD (Albumin ca. 64 kD) enthielt.

Albumin besitzt eine große Zahl möglicher Bindungsstellen, die mit einer vergleichsweise hohen Affinität bei niedriger Spezifität eine breite Palette von Molekülen zu binden in der Lage sind. Die hier beschriebenen Resultate sind daher wenig überraschend. Der Anteil des TCDD, der zwischen dem Punkt der Auftragung und der Stelle auf dem Agarosegel, an die Albumin migriert war, isoliert wurde, ist Großteils auf die Desorption des TCDD während der langsamen Migration zurückzuführen. Die leichte Erhöhung der in diesem Bereich wiedergefundenen TCDD-Menge bei Verwendung von Serum gegenüber den Versuchen mit gereinigtem Serumalbumin zeigt, daß nur geringe Mengen TCDD an die verbleibenden Plasmaproteine gebunden vorliegen. Die vergleichsweise niedrigen Wiederfindungsraten finden wahrscheinlich ebenfalls in der Desorption des anfangs an Proteine gebundenen TCDD Erklärung, da das desorbierte TCDD mit dem umgepumpten Puffer aus dem Gel geschwemmt wird.

Es kann davon ausgegangen werden, daß für eine Beschreibung des Verhaltens von TCDD in einem PBPK-Modell in erster Näherung der an Plasmaproteine gebundene Anteil des TCDD im Blut als quantitativ an Albumin gebunden wiedergegeben werden kann. Dies kann für Mensch und Ratte gleichermaßen gelten.

4.2.5 Validierung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Verteilung von TCDD in Blut von Mensch und Ratte

Um die Gültigkeit der oben diskutierten Ergebnisse nachzuweisen mußte gezeigt werden, daß sich die Verunreinigungen in den untersuchten Blutfraktionen genauso verteilen wie TCDD selbst. Da die bisherigen Ergebnisse die Vermutung zuließen, daß die Verteilung des ungereinigten ^3H -TCDD ausschließlich von der Lipophilie der Kompartimente abhing, war ein solches Verhalten nicht unwahrscheinlich. Andererseits zeigten die großen Unterschiede in den Retentionszeiten im System Methanol/Wasser deutliche Variationen in der Wasserlöslichkeit zwischen TCDD und den Verunreinigungen. Die Volumina der wäßrigen Lösungen der bei der Trennung der Lipoproteine anfallenden Fraktionen sind sehr unähnlich, und hierin könnte ein abweichendes Verhalten der Verunreinigungen begründet sein.

Wie unter 3.1.6.1 aufgezeigt, waren die Resultate der HPLC-Messung der Verteilung von Verunreinigungen und des ^3H -TCDD in isolierten Plasmafraktionen nicht geeignet,

Rückschlüsse über etwaige Einflüsse des Vorliegens der Verunreinigungen im verwendeten Standard zu ziehen. Im Unterschied hierzu läßt die Bilanz der Verteilungen von gereinigtem ^3H -TCDD, Verunreinigungen und ungereinigtem Standard eine Beurteilung der Validität der mit dem ungereinigten Standard erhaltenen Ergebnisse zu. Die hier angewendete Methode bedingte eine deutlich niedrigere Anzahl von Arbeitsschritten, die zu Substanzverlusten führen konnten, und die erhaltenen Ergebnisse ergeben ein klares Bild.

Aus Tabelle 3-6 wird deutlich, daß nur die Verteilung des verunreinigten Standards, aber weder die Verteilung des gereinigten ^3H -TCDD noch die der Verunreinigungen, mit der Verteilung der Lipoproteine korreliert. Hingegen ergibt die Berechnung der Verteilung des ungereinigten Standards aus den Verteilungen des gereinigten ^3H -TCDD und der Verunreinigungen unter der Annahme eines Gehaltes von 30 % Verunreinigungen und 70 % ^3H -TCDD im ungereinigten Standard eine sehr gute Übereinstimmung mit der tatsächlich gefundenen Verteilung des ungereinigten Standards und mit der Verteilung der Lipide. Die Verunreinigungen verteilen sich dabei ähnlich den Verhältnissen der Volumina der drei Fraktionen, die bei der Trennung der Lipoproteine erhalten werden (HDL 3,2 ml; LDL 1,6 ml; VLDL 6,7 ml). vermutlich ein Ergebnis ihrer höheren Wasserlöslichkeit. Die gefundene Verteilung ist also insgesamt ein Ergebnis der Verteilung von vermutlich fünf Substanzen unterschiedlicher Lipophilie auf wäßrige Lösungen von Lipoproteinen mit unterschiedlichen Lipidgehalten und Volumina. Damit war eine Rückrechnung der bereits mit dem verunreinigten Standard erhaltenen Ergebnisse nicht möglich. Gleichzeitig zeigen diese Resultate, daß bei einer Wiederholung dieser Untersuchungen die relativen wäßrigen Volumina und das Gleichgewicht der Verteilung von TCDD zwischen den Lipidphasen und der wäßrigen Phase trotz der hohen Lipophilie dieser Verbindung berücksichtigt werden müssen.

Zusammenfassend bleibt nur der Schluß, daß die Validität des unter 4.2.3 diskutierten Gleichungssystems durch diese Ergebnisse in Frage gestellt werden. Um eine weitergehende Aussage zu treffen, müßte die Gesamtheit der beschriebenen Versuche mit gereinigtem ^3H -TCDD wiederholt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

4.3 Vorversuche zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten für TCDD zwischen Rattenblut und -geweben

Historisch wurden Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizienten zunächst ausschließlich *in vivo* aus Blut- und Gewebekonzentrationsverläufen bestimmt^{106,119}. Erst deutlich später begann man mit der *in vitro* Bestimmung dieser Parameter, wobei man sich zunächst der Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltrationstechniken, sowie der sogenannten Headspace-Technik für leichtflüchtige organische Substanzen bediente^{138,112,116,117}. Seit Ende der 80er Jahre wird weiterhin versucht, Verteilungskoeffizienten *in silico* aus physikalischen Eigenschaften von betrachteten Substanzen zu berechnen. Die Löslichkeiten der Substanzen in n-Octanol, Speiseöl, Wasser, und Saline sowie der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, K_{OW} , und der Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und einer immobilisierten Membran sind hierfür herangezogen worden^{137,161,162,163,164}. Über die Berücksichtigung der reversiblen Bindung an Hämoglobin wurde auch der Einfluß der Bindung an ein Protein mit betrachtet¹⁶⁵.

Die Besonderheit einiger der letztgenannten Ansätze besteht dabei in der Notwendigkeit bzw. Möglichkeit, die Zusammensetzung eines Gewebes in die Berechnung mit einzubeziehen^{137,163,164,165}. Damit bietet sich die Gelegenheit, die Veränderungen in der Zusammensetzung der Gewebe, die sich im Verlauf einer TCDD-Exposition ergeben, in ein Modell einzubeziehen. Die genannten Methoden wurden jedoch für niedermolekulare leichtflüchtige Substanzen entwickelt, die wenig spezifische Bindungen eingehen und die schnell genug diffundieren um die Annahme einer Blutfluß—Limitierung zu rechtfertigen. Zudem ergab sich zwar eine gute Übereinstimmung mit experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten für moderat lipophile Substanzen, jedoch nahmen die Abweichungen mit zunehmender Lipophilie der organischen Substanz zu. Für TCDD mußte daher ein neuer Denkansatz gefunden werden.

Seine experimentelle Realisierbarkeit vorausgesetzt, könnte der unter 1.4.2 entwickelte Ansatz die Anforderungen erfüllen. Zu dessen Umsetzung mußte zunächst die Dissoziationskonstante von TCDD an Albumin bestimmt werden. Die dafür vorgeschlagene Methode beruht auf zwei Annahmen: 1. Es existiert nur eine Bindungsstelle für TCDD an Albumin ($n_A = 1$); 2. Durch Vorliegen eines Bodenkörpers wird die Konzentration des ungebundenen TCDD konstant bei der Löslichkeit von TCDD im Lösungsmittel gehalten. Die unter 1. genannte Annahme scheint gerechtfertigt, da bei der Untersuchung der Bindung von HCB an Albumin ebenfalls nur eine Bindungsstelle identifiziert wurde⁹². Damit die unter 2.

genannte Annahme gilt, muß TCDD im Überschuß vorgelegt werden, d.h. nur ein Teil des vorgelegten TCDD darf in Lösung gehen. Dabei muß auch die Adsorption von TCDD an den Oberflächen der verwendeten Geräte berücksichtigt werden, d.h. der Überschuß muß groß genug sein, um auch die Adsorption an diesen Oberflächen abzusättigen. Andererseits darf es aber nicht dazu kommen, daß TCDD kolloidal in Lösung geht. Unter diesen Voraussetzungen sollte die in Lösung gehende Menge TCDD nur von der Albuminkonzentration abhängen, jedoch von der vorgelegten Menge TCDD unabhängig sein.

Die in Tabelle 3-7 und Abbildung 3-6 aufgeführten Ergebnisse widersprachen dem zu erwartenden Verhalten. Die in Lösung gegangene Menge ^3H -TCDD zeigte sich abhängig von der Menge des vorgelegten ^3H -TCDD. Der Versuch, die Adsorption an den Glasoberflächen als Ursache auszuschließen, mißlang. Die Zugabe eines großen Überschusses von unmarkiertem TCDD führte zu sehr großen Abweichungen zwischen Proben aus dem selben Versuchsansatz. Die Ursache hierfür kann in der Bildung von kolloidal gelöstem TCDD gesehen werden. Die bei der Entnahme von Proben mit aufgenommene Menge kolloidal gelösten TCDD ist zufällig und von der gemäß des Löslichkeitsprodukts in Lösung befindlichen Menge unabhängig.

Mit den unter 3.2.2 beschriebenen Versuchen unter Verwendung von Dialysemembranen wurde es unternommen, kolloidal gelöstes Material aus den Albuminlösungen fernzuhalten. Die Porengröße des verwendeten Dialyseschlauchs (Durchlässigkeitsgrenze bei einem Molekulargewicht von ca. 1000 D) sollte Aggregate mit mehr als 3 - 5 TCDD Molekülen nicht mehr passieren lassen. Auch diese Versuche erbrachten keine Ergebnisse, die mit der Theorie in Einklang gebracht werden konnten. Betrachtet man die hier beschriebenen Versuche nachträglich unter dem Gesichtspunkt der Tatsache, daß der verwendete Standard zu 30 % mit Verbindungen verunreinigt war, die sich in Wasser besser lösen als TCDD, so findet dieses Verhalten eine einfache Erklärung. Der methodische Ansatz, einen Bodenkörper von ungelöstem TCDD zu verwenden, potenziert den Einfluß der Verunreinigungen dabei noch. Die Abhängigkeit der in Lösung nachgewiesenen Radioaktivität von der vorgelegten Menge des ungereinigten ^3H -TCDD-Standards wie auch der im Vergleich zu den vorgelegten Molverhältnissen zu hohe Anteil von ^3H gegenüber ^{14}C in den Dialyse-Experimenten ist mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auf diesen Umstand zurückzuführen. Die naheliegende Vermutung, das Scheitern der Versuche sei auf Verunreinigungen im Standard zurückzuführen, wurde auch diskutiert. Sie wurde jedoch in Anbetracht des Ergebnisses der Untersuchung des ^3H -TCDD-Standards auf seine Reinheit mittels GC/MS, die eine Reinheit

von über 98 % ergeben hatte, verworfen. Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht bekannt, daß bei der GC/MS-Untersuchung nur höherchlorierte Dibenzo-*p*-dioxine detektiert wurden. Die Versuche wurden an dieser Stelle beendet.

Abschließend bleibt an dieser Stelle zu bemerken, daß der hier untersuchte Ansatz mit einer weiteren Schwierigkeit behaftet ist. Die Behandlung der Verteilung von TCDD zwischen verschiedenen Phasen wie oben beschrieben setzt ein ideales Verhalten von TCDD in wäßriger Lösung voraus. Der obige Ansatz macht jedoch das Arbeiten mit konzentrierten Lösungen erforderlich, für die ein ideales Verhalten nicht notwendigerweise angenommen werden kann. Ob die Ergebnisse von diesem Umstand beeinflusst wurden, wurde nicht untersucht.

4.4 Untersuchung der Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihrer Beeinflussung durch Futterzusätze

Cholestyramin und Hexadekan sind in der Vergangenheit mehrfach auf ihre Fähigkeit untersucht worden, die Ausscheidung hochlipophiler toxischer Substanzen mit langen Halbwertszeiten im menschlichen Körper zu stimulieren. Hinsichtlich der PCDD/F gab es aber bisher nur einige Untersuchungen, bei der die Ausscheidung dieser Substanzen von menschlichen Patienten mit den Fäzes bei Gabe eines Gemisches von Cholestyramin und Reiskleie beobachtet wurde^{129,130}. Hier wurden jedoch nur zwei PCDF sowie PCB verfolgt, und die Ergebnisse zeigten sich uneinheitlich. Eine solche Untersuchung, welche die Beeinflussung der Ausscheidung von TCDD durch diese Substanzen unter kontrollierten Bedingungen aufzeigt, fehlte bisher.

Cholestyramin ist ein Anionenaustauscherharz und wird weder resorbiert noch metabolisiert. Es ist in der Lage, mit der Galle ausgeschiedene, polare Metaboliten toxischer Verbindungen im Darm zu binden, sie so der enterohepatischen Zirkulation zu entziehen und der Ausscheidung mit den Fäzes zuzuführen. Dagegen beruht die Erhöhung der Ausscheidung lipophiler Verbindungen durch die Gabe von Hexadekan auf der Erhöhung der Lipophilie des Darminhalts. Damit läßt sich das Verteilungsgleichgewicht der lipophilen Verbindung zwischen Blut und Darminhalt zugunsten des Darminhalts verschieben, was zu einer erhöhten Ausscheidung der Verbindung selbst im Gegensatz zu ihren Metaboliten führt¹²⁴.

Enterohepatische Zirkulation spielt für die Ausscheidung von TCDD höchstens eine untergeordnete Rolle⁹⁷. Es stand daher zu erwarten, daß Cholestyramin keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Ausscheidung von TCDD haben würde. Der Effekt auf Ausscheidung durch Hexadekan hingegen ist als vom Anteil der unmetabolisierten Verbindung an der ausgeschiedenen Menge abhängig zu sehen, da nur dieser Anteil von Hexadekan beeinflusst wird. Je höher dieser Anteil, desto größer die potentielle Erhöhung der ausgeschiedenen Gesamtmenge durch die Gabe von Hexadekan. Die Bandbreite der Literaturangaben für diesen Anteil sind mit 20 – 90 % so weit, daß eine Voraussage nicht getroffen werden kann. Dies wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, daß bisher keine Einigung über die Frage, ob TCDD seine Metabolisierung autoinduziert, erreicht wurde.

4.4.1 Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Cholestyramin

Das verminderte Wachstum, welches bei den mit 2 µg/kg Körpergewicht behandelten Tieren beobachtet wurde, stellt bereits ein Symptom akuter Toxizität dar und war nicht erwartet worden. Es war beabsichtigt gewesen eine Dosis zu verabreichen, die zwar maximale Induktion hepatischer Monooxygenasen aber keine akut toxischen Symptome hervorruft. In der beobachteten Größenordnung ist dieser Effekt jedoch für das Experiment unerheblich.

Der große Anteil an nicht resorbiertem Material von durchschnittlich ca. 50 %, sowie die hohe Variabilität dieses Anteils an der Gesamtdosis, überraschten ebenfalls und konnten nicht erklärt werden, fanden sich aber bei allen durchgeführten Experimenten. Erfahrungsgemäß werden bei oraler Gabe in Maisöl meist deutlich höhere Anteile von bis zu 80 % der Dosis aufgenommen¹⁶⁶. Bei einer Halbwertszeit von 17 h für Verunreinigung 1 (siehe 3.3.3) werden innerhalb von 48 h ca. 7/8 der resorbierten Menge an Verunreinigung 1 wieder ausgeschieden. Dies kann jedoch maximal 13 – 15 % der Dosis entsprechend dem relativen Gehalt an Verunreinigung 1 ausmachen. Eine letzte Möglichkeit der Erklärung liegt in der unvollständigen Lösung des TCDD im Maisöl, so daß kolloidal gelöstes TCDD nicht zur Resorption zur Verfügung stand. Das verwendete Protokoll entspricht jedoch der bei vergleichbaren Versuchen üblichen Vorgehensweise, und nicht gelöstes Material hätte zu starken Schwankungen bei der Bestimmung des Radioaktivitätsgehalts in Proben zu je 50 µl des Maisöls geführt. Solche Schwankungen traten nicht auf.

Die leichte Erniedrigung der kumulativen Ausscheidung mit dem Urin in der mit Cholestyramin behandelten Gruppe bestätigt die theoretische Wirkungsweise dieser Substanz. Mit dem Urin werden nur Metaboliten von TCDD ausgeschieden¹¹. Diese können teilweise von Cholestyramin im Darm gebunden werden und werden mit den Fäzes ausgeschieden. Die Größenordnung des aufgezeigten Effekts (ca. 1 % der Dosis) bestätigt dabei die Angabe in der Literatur, daß enterohepatische Zirkulation für TCDD keine Bedeutung hat. Ob dieser Effekt allerdings ganz oder teilweise auf die Verunreinigungen zurückzuführen ist, muß dahingestellt bleiben. Die für die beiden mit 2 µg TCDD/kg Körpergewicht behandelten Gruppen berechneten Halbwertszeiten der fäkalen Ausscheidung von 24 Tagen liegen im Bereich der Angaben die man in der Literatur findet (12 – 31 Tage¹¹). Ihre Übereinstimmung zeigt, daß zumindest bei den mit 2 µg TCDD/kg Körpergewicht behandelten Gruppen kein Effekt der Gabe von Cholestyramin beobachtet wurde. Es muß jedoch zu diesem, wie auch insbesondere zu den im folgenden diskutierten Versuchen gesagt werden, daß die Bestimmung der Halbwertszeiten der Ausscheidung stets auf Datenreihen beruhten, die weniger als eine Halbwertszeit ausmachten. Idealerweise sollte die Bestimmung einer Halbwertszeit mindestens ein Vierfaches dieser Zeitspanne übergreifen. Dies ist jedoch bei der geforderten niedrigen Dosis von 8 ng TCDD/kg Körpergewicht nicht möglich, da hierbei die Nachweisgrenze des ohnehin sehr empfindlichen Nachweises von ³H-TCDD in Fäzes über Szintillationszählung noch vor Ablauf einer Halbwertszeit unterschritten würde.

Ursprünglich war es beabsichtigt gewesen, Unterschiede in der Ausscheidung zwischen den mit und ohne Futterzusatz behandelten Gruppen anhand der in den entnommenen Geweben nachzuweisenden Konzentrationen zu belegen. Darin, und in der mangelnden Verfügbarkeit von Metabolismuskäfigen, lag der Grund für die unterlassene Sammlung von Fäzes und Urin von den mit 8 ng TCDD/kg Körpergewicht behandelten Tieren. Wegen der hohen Standardabweichungen bei der Bestimmung der Gewebekonzentrationen, die unter anderem auch ein Resultat der hohen Variabilität des resorbierten Anteils der Dosis sind, hätte es großer Unterschiede bedurft um Signifikanz zu erreichen. Eine eventuell durch die Gabe von Cholestyramin bedingte geringfügig erhöhte Ausscheidungsrate in der niedrigeren Dosisgruppe hätte daher anhand der Gewebekonzentrationen vermutlich nicht belegt werden können.

Ein Vergleich zwischen den beiden Dosisgruppen hinsichtlich der Verteilung auf die Leber und die übrigen Gewebe außer Serum zeigt das erwartete Ergebnis: der in der Leber wiedergefundene Anteil einer Dosis von 2 µg TCDD/kg Körpergewicht ist deutlich höher, der

Anteil in den übrigen Geweben, insbesondere im Fettgewebe, deutlich niedriger als die jeweiligen Anteile einer Dosis von 8 ng TCDD/kg Körpergewicht. Dieses Verhalten ist in der Literatur wiederholt dokumentiert und kann vermutlich auf die Induktion von mikrosomalen Proteinen in der Leber zurückgeführt werden, die TCDD spezifisch binden¹¹.

Erwartungsgemäß zeigte auch die Bestimmung der EROD-Aktivitäten eine etwa 15-fache Erhöhung in Leberproben der mit 2 µg TCDD/kg Körpergewicht behandelten Tiere gegenüber den mit 8 ng TCDD/kg Körpergewicht dosierten Tieren und den Tieren, die kein TCDD erhalten hatten. Die Annahme, daß die Dosis von 8 ng TCDD/kg Körpergewicht nicht zu einem signifikanten Anstieg der EROD-Aktivität führen würde, wurde dabei gleichzeitig bestätigt.

4.4.2 Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten nach enzyminduzierenden und nicht-enzyminduzierenden Dosen und ihre Beeinflussung durch Hexadekan

Die scheinbar deutlich bessere Futtermittelnutzung, die beim Vergleich der kumulativen Futteraufnahme sowie der Gewichtszunahme der Tiere während des 21-tägigen Versuchs in Tabelle 3-11 bzw. Tabelle 3-13 zu Tage tritt, hat drei Ursachen. Einerseits wurde verschüttetes Futter berücksichtigt, und damit die kumulative Futteraufnahme gesenkt. Andererseits bezieht sich die Gewichtszunahme hier auf das Gewicht nach einer 24-stündigen Fastenperiode, während der die Ratten durchschnittlich 10 % ihres Körpergewichts verloren. Zuletzt waren die in dem Versuch mit Cholestyramin eingesetzten Tiere bei Anlieferung bereits im Durchschnitt ca. 5 % schwerer, was auf leichte Altersunterschiede hindeutet.

Die für die mit 2 µg TCDD/kg Körpergewicht behandelten Tiere erhaltenen Halbwertszeiten der fäkalen Ausscheidung unterscheiden sich nicht signifikant von den im Versuch mit Cholestyramin erhaltenen und sind damit auch im Einklang mit der Literatur. Die Halbwertszeiten der fäkalen Ausscheidung durch die mit 8 ng TCDD/kg Körpergewicht dosierten Tiere hingegen liegen deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten. Tatsächlich kamen jedoch in allen Studien, über die berichtet wurde, deutlich höhere Dosen zum Einsatz¹¹. Die Beobachtung einer so starken Abhängigkeit der Ausscheidung von der Dosis ist daher neu und spricht deutlich für die Möglichkeit der Autoinduktion des eigenen Metabolismus in Ratten durch TCDD. Dafür spricht auch die überproportionale Erhöhung der Ausscheidung mit dem Urin in den mit der höheren Dosis behandelten Tieren (nahezu verdreifacht).

In dem Ausbleiben der Autoinduktion des Metabolismus kann auch einer der Auslöser für den nur bei der Dosis von 8 ng TCDD/kg Körpergewicht beobachteten Einfluß des Hexadekan gesehen werden. Wenn der Metabolismus von TCDD der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ausscheidung ist, so kann Hexadekan keinen Einfluß auf die Ausscheidung nehmen. Bei einer Dosis, bei welcher der Metabolismus aber noch nicht induziert wird, könnte hingegen die Ausscheidung durch die Darmwand der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein. Unter diesen Umständen kann Hexadekan durch die Erhöhung der Lipophilie des Darminhalts die Ausscheidung beschleunigen.

In der Literatur wird häufig der Metabolismus von TCDD als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ausscheidung zitiert⁹⁹. Es wurde jedoch bereits darauf hingewiesen, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt auch von der Dosis abhängig sein könnte. Vorgeschlagen wurde, daß der Metabolismus nur bei sehr geringen Dosen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sei, während mit dem Ansteigen der Dosis die Ausscheidung durch die Darmwand eine immer stärkere Rolle spielt, bis schließlich bei tödlichen Dosen der reduzierte Fäzesfluß limitierend für die Ausscheidung mit den Fäzes wird, und durch Schädigungen der Niere die Ausscheidung mit dem Urin stark zunimmt⁴⁹. Das Ansteigen der Abhängigkeit von der Ausscheidung durch die Darmwand bei hohen Dosen wird auch durch die Erhöhung der Ausscheidung einer letalen Dosis mit gleichen Fäzesmengen durch die Gabe von Hexadekan belegt¹³¹. Die niedrigste bei diesen Überlegungen herangezogene Dosis belief sich auf 0,001 µmol oder 324 ng TCDD/kg Körpergewicht in Fischer 344-Ratten. Diese Dosis entspricht etwa dem 40-fachen der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Dosis, und eine vergleichbare Dosis induzierte die hepatische EROD-Aktivität um das 15-fache⁸⁵. Es ist daher möglich, daß bei einer Dosis von 324 ng TCDD/kg Körpergewicht die Autoinduktion des TCDD-Metabolismus bereits eingesetzt hat.

Die leichte Erhöhung der Resorptionsrate von ca. 50 % auf über 60 %, die mit der 24-stündigen Fastenperiode erreicht wurde, konnte die Variabilität der Gewebekonzentrationen zwischen einzelnen Individuen nicht eliminieren. Es bleibt schwierig abzuschätzen, in wie weit die beobachtete Variabilität auf die Unterschiede in der Resorption, den Verunreinigen im ³H-TCDD-Standard, sowie auf der allgemeinen Variabilität biologischer Systeme fußt. Vermutlich wäre aber prinzipiell für die Beobachtung der fäkalen Ausscheidung die intravenöse Gabe des TCDD vorzuziehen gewesen⁹⁹. Die erhöhten Konzentrationen in den lipophilen Geweben könnten dabei ein Nebeneffekt der Fastenperiode sein. Es konnte gezeigt

werden, daß die zuletzt in einer Fettzelle eingebauten Lipide auch die ersten sind, die sie wieder verlassen¹⁶⁷. Das TCDD gelangte mit dem Maisöl über den Transport mit Chylomikronen in das durch die Fastenperiode entleerte Fettgewebe. Anschließend erhielten die ausgehungerten Ratten wieder freien Zugang zu Futter. Dadurch konnten die mit dem Futter in das Fettgewebe gelangenden Lipide die TCDD-haltigen, kurz zuvor eingelagerten Lipide überschichten.

Bei den in Leberproben gemessenen EROD-Aktivitäten wurde wiederum eine Induktion um das 15 – 25fache durch die Dosierung mit 2 µg TCDD/kg Körpergewicht festgestellt, während bei gleichem Futter kein Unterschied zwischen den mit der niedrigeren Dosis und den nicht mit TCDD behandelten Gruppen auffiel. Es zeigte sich jedoch ein Trend zur Erhöhung dieses Parameters durch die Behandlung mit Hexadekan, der aber nur in den nicht mit TCDD behandelten Kontrollen Signifikanz erreichte. Die Werte in der völlig unbehandelten Kontrollgruppe lagen allerdings deutlich unter den üblicherweise in vergleichbar behandelten Tieren gefundenen Aktivitäten. Hierin könnte jedoch eine weitere Möglichkeit der Erklärung für den Unterschied in der Ausscheidung von TCDD unter Gabe von Hexadekan liegen. Hexadekan induziert die hepatische EROD-Aktivität höchstens in sehr geringem Maße. Ein klarer Zusammenhang zwischen der Induktion der EROD-Aktivität und dem Metabolismus von TCDD wurde bisher aber auch nicht identifiziert¹¹. Unter Umständen ist ein anderes, bisher nicht beachtetes Enzym für diese Funktion verantwortlich, welches durch TCDD und Hexadekan induziert werden kann. Dies würde ebenfalls das beobachtete Verhalten der erhöhten Ausscheidung einer niedrigen TCDD-Dosis mit der Gabe von Hexadekan sowie des Ausbleibens eines solchen Effektes bei einer hohen Dosis erklären, kann jedoch als unwahrscheinlich angesehen werden.

4.4.3 Validierung der Ergebnisse zu Halbwertszeiten von TCDD in Sprague-Dawley Ratten unter Gabe von Futterzusätzen

Die unter 3.3.3 dargelegte Ableitung beruht auf mehreren Annahmen. Zunächst wurde angenommen, daß bei der Untersuchung der Ausscheidung des gereinigten Standards die in den Fäzes gemessene ³H-Aktivität nur auf die Ausscheidung von nicht resorbiertem bzw. resorbiertem und wieder ausgeschiedenen ³H-TCDD zurückzuführen war. Dies kann nur dann nicht gelten, wenn der ³H-TCDD Standard noch mit einer weiteren Komponente verunreinigt gewesen wäre, die mittels HPLC Trennung nicht von diesem separiert worden wäre, was aber nahezu ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin mußte angenommen werden, daß die Geschwindigkeitskonstanten der Ausscheidung nicht resorbierten Materials sowie der Verunreinigungen unter den gegebenen Umständen immer gleich waren. Sowohl bei dem Kontrollversuch wie auch dem Experiment unter Zugabe von Hexadekan zum Futter wurde die Dosierung nach einer 24stündigen Fastenperiode durchgeführt, daher kann eine solche Übereinstimmung in diesen beiden Fällen für die nicht resorbierte Komponente in erster Näherung gelten. Der Versuch mit Cholestyramin wurde ohne eine solche Fastenperiode durchgeführt, hieraus könnten Unterschiede resultieren. Weiterhin könnte die Behandlung mit Cholestyramin und/oder Hexadekan die Ausscheidung der Verunreinigungen beeinflußt haben. Auch die etwas unterschiedliche Gewichtsentwicklung der Rattengruppen zwischen den Versuchen könnte diesen Parameter verändert haben. Die durch diese Unbekannten in die Berechnung einfließende Unsicherheit läßt sich nicht quantifizieren.

In dem 10tägigen Kontrollversuch wurde die Halbwertszeit der fäkalen Ausscheidung einer Dosis von 8 ng/ kg Körpergewicht des gereinigten ^3H -TCDD-Standards zu 44 Tagen ermittelt. Sie liegt damit näher bei dem Wert, der für die hypothetisch beschleunigte fäkale Ausscheidung von TCDD unter Gabe von Hexadekan mit 41 Tagen bestimmt wurde, als bei der in den nicht mit Hexadekan behandelten Tieren im gleichen Versuch erhaltenen Halbwertszeit von 71 Tagen. Hierzu ist zu sagen, daß die Halbwertszeit der fäkalen Ausscheidung bei allen durchgeführten Versuchen stets mit der Dauer des Versuchs zunahm, d.h. wenn in den Versuchen mit Hexadekan Halbwertszeiten nur unter Heranziehung von Daten der Ausscheidung aus den ersten 10 Tagen berechnet wurden, deutlich niedrigere Halbwertszeiten resultierten. Ein solches Verhalten läßt sich auch in der Literatur belegen¹¹. Dies bedeutet, daß die terminale Phase der Ausscheidung noch nicht erreicht ist. Der Grund hierfür ist einerseits in der gegebenen Bestimmungsgrenze für TCDD in Fäzes zu sehen, andererseits scheint es im Licht der Informationen zur Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Dosis unwahrscheinlich, daß die Halbwertszeit der Ausscheidung von TCDD überhaupt konstant genannt werden kann. Sie scheint vielmehr eine Funktion der im Körper verbliebenen Restmenge zu sein.

Dennoch erscheint der gezeigte Ansatz geeignet, den Befund einer erhöhten Ausscheidung durch Gabe von Hexadekan bei einer niedrigen Dosis sowie das Ausbleiben dieser Erhöhung bei einer höheren Dosis zu validieren. Die sehr gute Übereinstimmung der in Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8 gezeigten, nach Gleichung 15 berechneten Ausgleichskurven mit den experimentellen Werten kann als Indiz für die Validität des Denkansatzes gesehen werden. Es

kann zwar gesagt werden, daß eine Kurvenanpassung stets eine nahezu beliebig gute Übereinstimmung mit experimentellen Daten erreicht wenn nur genügend Exponentialterme verwendet werden. Tatsächlich enthält Gleichung 15 aber nur zwei freie Parameter, namentlich den nicht resorbierten Anteil an der Dosis und die Halbwertszeit von TCDD unter den Versuchsbedingungen.

Weiterhin bestätigt die Ähnlichkeit der mit Gleichung 14 durch Kurvenanpassung berechneten Parametern e (0,29) und g (0,25), entsprechend den im verunreinigten ^3H -TCDD-Standard zu ungefähr gleichen Anteilen vorliegenden Verunreinigungen 1 (15 % Anteil) und 2 – 4 (summiert zu 14 % Anteil) die Richtigkeit der Annahmen. Auch die innerhalb des Kontrollversuchs sehr gute Übereinstimmung des mit Gleichung 15 aus der Ausscheidung des verunreinigten Standards ermittelten Halbwertszeit (44 Tage) mit der sich aus der Ausscheidung des gereinigten ^3H -TCDD durch Kurvenanpassung unter Verwendung von Gleichung 13 ergebenden (44 Tage) zeigt wiederum die Validität des Ansatzes.

5 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer hohen Toxizität, ihrer ubiquitären Verbreitung, und ihres breiten Wirkungsspektrums wird die Bedeutung der Polychlordibenzo-*p*-dioxine und -dibenzofurane (PCDD/F) für Mensch und Umwelt seit nunmehr über 30 Jahren untersucht und diskutiert. Dennoch bleiben viele Aspekte ihrer Toxizität ungeklärt und sind nach wie vor Gegenstand weltweiter Forschungsbemühungen. Diese zielen gerade in letzter Zeit besonders auf den Versuch, die mit der Verbreitung der PCDD/F verbundenen Risiken einschätzen und in regulatorische Maßnahmen einbinden zu können. Auch sind bisher trotz der intensiven Forschung keine allgemein gültigen Maßnahmen bekannt, mit denen die gesundheitliche Verfassung von mit PCDD/F vergifteten Individuen positiv beeinflusst werden kann.

Um eine realistische Risikoabschätzung nicht nur für den Menschen, sondern für ganze Ökosysteme durchführen zu können, bedarf es der gleichzeitigen Verfügbarkeit von Modellen für die toxische Wirkung der PCDD/F sowie der Kenntnis von Gesetzmäßigkeiten, welche die Übertragbarkeit der mit besagten Modellen erhaltenen Ergebnisse auf andere Systeme erlauben. Solche Gesetzmäßigkeiten ließen sich bisher nur für vereinzelte Endpunkte der Toxizität der PCDD/F erkennen, im wesentlichen bleiben die großen Speziesunterschiede in der toxischen Wirkung der PCDD/F ungeklärt. Eine Anzahl von Indizien spricht dafür, daß die biophysikalischen Eigenschaften der PCDD/F, namentlich ihre hohe Resistenz gegenüber biologischem Abbau, ihre hohe Lipophilie und geringe Wasserlöslichkeit sowie ihre spezifischen Bindungseigenschaften an Proteine, einen großen Anteil zu ihrem Toxizitätsprofil und zu den diesbezüglichen Speziesunterschieden beitragen. Diese bedingen wesentlich das Verteilungsverhalten der Substanzen im Körper exponierter Individuen (Toxikokinetik) und damit die am Wirkort bzw. Zielorgan wirksame Dosis. Die Übertragung des Einflusses dieser Größen auf andere Spezies läßt sich besonders gut in Computersimulationen modellieren. Dazu müssen aber auch diejenigen Parameter bekannt sein, welche die Wechselwirkung der PCDD/F mit den biologischen und biophysikalischen Gegebenheiten einer Modellspezies beschreiben.

Auch wenn die Mechanismen der Toxizität und das mit einer bestimmten Dosis verbundene Risiko bekannt ist, so ist mit diesen Aussagen hochexponierten Individuen, die z.B. bei einem Industrieunfall mit großen Mengen der PCDD/F in Kontakt kamen, nicht geholfen. Gerade im Menschen zeigen die PCDD/F eine lange Verweildauer, und wenn auch der Mensch

gegenüber z.B. der letalen Wirkung der PCDD/F relativ unempfindlich erscheint, so ist die Reduktion der Belastung mit PCDD/F doch oberstes Gebot für jede Behandlungsmethode.

Die vorliegende Arbeit hatte daher zwei Ziele. Das erste Ziel bestand in der Fortführung und Erweiterung bestehender Ansätze zur Computermodellierung der toxischen Wirkung der PCDD/F mit besonderer Berücksichtigung der Übertragbarkeit auf andere Spezies. Dieses Ziel wurde in zwei Phasen verfolgt: Zunächst wurde es unternommen für ein bestehendes Modell biophysikalische Parameter, nämlich die Gesetzmäßigkeiten der Verteilung in Blut von Mensch und Ratte, experimentell zu ermitteln. Diese waren in der Vergangenheit stets nur indirekt über mathematische Verfahren erhalten worden. Anschließend wurde die Eignung eines neuen theoretischen Ansatzes für die Beschreibung des Verteilungsverhaltens innerhalb des Säugetierkörpers mit besonderer Eignung für die Übertragung auf andere als die untersuchte Spezies untersucht. Das zweite Ziel der Arbeit war die Prüfung von Methoden, mit denen die PCDD/F-Belastung von menschlichen Individuen reduziert werden könnte, anhand eines tierischen Modells. Dabei wurden zugleich die bestehenden Hypothesen zu den die Eliminierung der PCDD/F aus dem Körper der Modellspezies maßgeblich bestimmenden Gesetzmäßigkeiten überprüft. Als Modellverbindung für die Substanzklasse der PCDD/F wurde deren Vertreter mit der höchsten Toxizität, Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), gewählt. Als Modellspezies dienten, wegen der günstigen Verfügbarkeit von Literaturdaten zur Toxizität von TCDD in dieser Spezies und diesem Stamm, Sprague-Dawley Ratten.

Zu Beginn der Arbeit konnte tatsächlich ein mathematischer Zusammenhang zwischen der im Blut von Mensch und Ratte vorhandenen Menge TCDD und der Zusammensetzung des Blutes etabliert werden. Dabei wurde die Verteilung von TCDD als abhängig von der Verteilung der Cholesterine und Triglyzeride auf die Lipoproteinfraktionen und von der im Blut vorhandenen Gesamtmenge dieser Lipide gefunden. Dieser Zusammenhang steht im Gegensatz zu Literaturangaben, in denen, ohne detaillierte Untersuchungen, eine von der Zusammensetzung des Blutes unabhängige Verteilung postuliert bzw. insinuiert wurde.

Weiterhin wurde ein theoretischer Ansatz für die Beschreibung des toxikokinetischen Verhaltens von TCDD, aber auch anderer Substanzen, erarbeitet, der sich besonders für die experimentelle Bestimmung der in ein computerimplementiertes PBPK-Modell eingehenden Parameter eignet. Damit träte die experimentelle Bestimmung solcher Parameter an die Stelle der indirekten Ermittlung durch Kurvenanpassung an Literaturdaten, wodurch ein wesentlicher Unsicherheitsfaktor in vielen Modellierungen eliminiert werden könnte. Dieser

Ansatz betrachtete Verteilungsgleichgewichte zwischen einer gesättigten Lösung von TCDD in Wasser und wäßrigen Lösungen von Proteinen. Obwohl die experimentelle Umsetzung im Rahmen dieser Arbeit durch die späte Entdeckung der Verunreinigungen im verwendeten TCDD-Standard behindert wurde, so erscheinen weiterführende Versuche zu seiner Validierung doch lohnend.

Zuletzt wurde im Tiermodell etabliert, daß die Erhöhung der Lipophilie des Darminhalts mittels Futterzusätzen wie Hexadekan, und damit die Verschiebung des Verteilungsgleichgewichts für fettlösliche Substanzen zwischen dem restlichen Körper und dem Darmlumen, die fäkale Ausscheidung von TCDD unter bestimmten Umständen erhöhen kann. In der Literatur war bis dahin die Metabolisierung von TCDD als der limitierende Schritt für die Ausscheidung von TCDD bei niedrigen Dosen erachtet worden. Dabei wurden jedoch nie Dosen unterhalb der Grenze für die Induktion hepatischer Monooxygenasen untersucht. Beim Einsatz einer Dosis, welche die bekanntermaßen durch TCDD induzierbare Monooxygenase-abhängige EROD-Aktivität in mikrosomalen Leberisolaten nicht erhöhte, wurde einerseits eine deutlich langsamere Ausscheidung von TCDD gefunden als bei Dosen, welche die EROD-Aktivität induzierten. Gleichzeitig wurde insgesamt eine meßbare Beschleunigung der Ausscheidung von TCDD durch den Zusatz von Hexadekan zum Futter festgestellt. Daraus kann zum einen geschlossen werden, daß in Ratten der Metabolismus von TCDD schon bei niedrigen, nämlich unterhalb der bisher untersuchten, Dosen induzierbar ist. Darüber ist in der Literatur vielfach diskutiert worden. Zum zweiten bedeutet dies, daß die Geschwindigkeit der Ausscheidung von TCDD durch Ratten bei Dosen unterhalb der für die Induzierung des Metabolismus notwendigen Dosis von der direkten Ausscheidung durch die Darmwand ins Darmlumen limitiert wird, und damit durch Veränderungen der physikalischen Bedingungen im Darm beeinflußt werden kann. Diese Situation entspricht aber im wesentlichen der Situation im Menschen, der TCDD nur sehr langsam metabolisiert, und eröffnet neue Möglichkeiten in der Behandlung hochbelasteter menschlicher Individuen.

Die Interpretation der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurde dabei unvorhergesehen und nachträglich erschwert. Bei einem Großteil der durchgeführten Experimente fand ein $^3\text{H}_2$ -markierter TCDD-Standard Verwendung, und wesentliche Schlußfolgerungen basierten auf der Messung der Verteilung der ^3H -assoziierten Radioaktivität. Der Standard sollte zu Beginn der Arbeit auf seine radiochemische Reinheit untersucht werden. Wegen eines Kommunikationsfehler wurde jedoch eine zu spezifische Analysemethode verwendet, welche fälschlicherweise für den verwendeten Standard eine

radiochemische Reinheit von 98 % bestätigte. Die tatsächliche Reinheit des Standards belief sich aber, wie nachträglich ermittelt, nur auf etwa 70 %. Damit erklärten sich insbesondere die schwer interpretierbaren Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung der biophysikalischen Konstanten, welche die Verteilung zwischen Kompartimenten eines Modells beschreiben sollten. Diese sollten auf Ergebnissen beruhen, deren Bestimmung aus Lösungsgleichgewichten von TCDD in wäßrigen Lösungen von Proteinen geplant war. Ein solcher Ansatz ist aber besonders empfindlich für den Einfluß von Verunreinigungen, und die dahingehenden Resultate konnten nicht zielgerecht interpretiert werden.

In der Folge dieser Feststellung wurde noch eine Reihe von Experimenten durchgeführt, welche die Validität der oben beschriebenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen belegen sollte. Dabei wurde zunächst festgestellt, daß der empirisch festgestellte mathematische Zusammenhang zwischen der Verteilung der Cholesterine und Triglyzeride auf die verschiedenen Lipoproteinfraktionen und der Verteilung von TCDD auf diese Fraktionen vermutlich auf einer Kombination der Verteilung der ^3H -enthaltenden Verunreinigungen und des ^3H -markierten Standards zwischen lipidhaltigen wäßrigen Phasen stark unterschiedlicher Volumina beruhte. Diese Ergebnisse bedürfen daher weiterer Überprüfung.

Im Gegensatz dazu konnten die Schlußfolgerungen hinsichtlich der Ausscheidung von TCDD durch Ratten unter dem Einfluß enzyminduzierender bzw. nicht-enzyminduzierender Dosen von TCDD, welche aus den vor der Feststellung der Verunreinigung des Standards durchgeführten Experimenten gezogen worden waren, weitgehend bestätigt werden. Obwohl die getroffenen Aussagen durch weitere Experimente mit einem gereinigten TCDD-Standard überprüft werden sollten, wurde doch ein wichtiger Hinweis auf diesen überraschenden Aspekt des Verhaltens von TCDD geliefert.

6 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind geeignet als Grundlage für Denkanstöße für weitere Arbeiten. Diese sollten zu einer besseren Einschätzung des mit der ubiquitären Verteilung der PCDD/F verbundenen Risikos für Mensch und Umwelt beitragen.

Die beschriebenen Ansätze zu einer verbesserten Modellierung des Verhaltens von TCDD, und insbesondere zur Verbesserung der Übertragbarkeit der Modelle zwischen Säugetierspezies, konnten in dieser Arbeit nicht abschließend überprüft werden. Eine Wiederholung der gezeigten Versuche, deren Methodik hier bereits Großteils ausgearbeitet und validiert wurde, mit einem reinen TCDD-Standard könnte Klärung bringen, ob sie den erwarteten Beitrag zur Risikoabschätzung erbringen werden.

Ebenso kann eine weiterführende Untersuchung zur Ausscheidung von TCDD in Ratten die zugrundeliegenden Mechanismen weiter klären helfen und eventuell gleichzeitig einen Weg zur Verbesserung der Lebensqualität von PCDD/F-exponierten menschlichen Patienten aufweisen. Denkbar ist ein Reihenversuch, bei dem Gruppen von Ratten Dosen zwischen 5 und 500 ng TCDD/kg Körpergewicht appliziert werden, wobei je eine Gruppe pro Dosis normales Futter, eine weitere Futter vermischt mit einer Substanz erhalten würde.

Diese Substanz sollte so beschaffen sein, daß sie das Verteilungsverhalten von TCDD zwischen Blut und Darmlumen zugunsten des Darmlumen beeinflusst. Um dem gesteckten Ziel der Prüfung einer möglichen Entgiftungsmethode für hochbelastete menschliche Individuen nahe zu kommen, sollte diese Substanz gleichzeitig zum menschlichen Verzehr geeignet und möglichst nicht resorbierbar sein. Beispielsweise könnten hierzu die als Nahrungsmittelzusatz teilweise zugelassenen Polyfettsäureester („Olestra“), die im Darm nicht angegriffen werden, dienen.

Mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen läßt sich hypothetisieren, daß bei einem solchen Versuch hohe Halbwertszeiten der fäkalen Ausscheidung sowie eine Beschleunigung der Ausscheidung durch die Zumischung der Substanz zum Futter bei niedrigen Dosen zu beobachten sein sollten. Bei steigender Dosis sollten die Halbwertszeiten der fäkalen Ausscheidung, wie auch der Einfluß der Zumischung der Substanz zum Futter, langsam abnehmen, bis hinsichtlich der Halbwertszeit der fäkalen Ausscheidung ein Plateau erreicht wird, auf dem die Substanz keinen Einfluß mehr zeigt. Damit wäre endgültig

bestätigt, daß der Metabolismus von TCDD in Ratten autoinduzierbar ist, und daß der autoinduzierte Metabolismus erst ab einer gewissen Dosis den limitierenden Schritt darstellt, während bei niedrigeren Dosen die Ausscheidung durch die Darmwand geschwindigkeitsbestimmend wirkt.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Physikalischen Einheiten vorgestellte Buchstaben verstehen sich als Multiplikatoren (z.B. 1 cm = 10⁻² m): k- (kilo-) = 10³; c- (centi-) = 10⁻²; m- (milli-) = 10⁻³; µ- (mikro-) = 10⁻⁶; n- (nano-) = 10⁻⁹; p- (piko-) = 10⁻¹²; f- (femto-) = 10⁻¹⁵.

°C	Grad Celsius
³ H-TCDD	[1,6- ³ H ₂]-2,3,7,8-tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
Abb.	Abbildung
Amidoschwarz	8-Amino-2-benzolazo-7-(4-nitrobenzolazo)-1-naphthol-3,6-disulfonsäure Dinatriumsalz (FG 616,5)
B	Breite
Bromphenolblau	3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulphonphthalein (FG 670,0)
bzw.	Beziehungsweise
Ci	Curie
Chol.	Cholesterine (Cholesterin + Chelesterinester)
CYP450	Cytochrom P450
D	Dalton
DEBS	Diethylbarbitursäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (FG 372,2)
EROD	Ethoxyresorufin- <i>o</i> -deethylase
FG	Formelgewicht
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
Gew. %	von hundert bezogen auf Gewicht
Gew./Gew.-	Anteil des Gewichts am Gesamtgewicht
h	Stunden
HCB	Hexachlorbenzol
HDL	High Density Lipoproteins (Lipoproteine hoher Dichte)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.D.	Innendurchmesser
konz.	Konzentriert
K _{ow}	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
L	Länge
l	Liter
LDL	Low Density Lipoproteins (Lipoproteine niedriger Dichte)
M	Molar
m	Meter
min	Minuten
N	Normal
PBPK (-Modelle)	Physiologisch basierende pharmakokinetische (Modelle)
PCDD	Polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDD/F	Polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine und -dibenzofurane
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane
ppt	parts per trillion (Teile pro 10 ⁹ Teile, gewichtsbezogen)

RS-Albumin	Rinderserumalbumin (FG 65.000)
RT	Raumtemperatur
Sudanschwarz	7-[4-(Benzolazo)-naphthyl-1-azo]-2,2-dimethyl-2,3-dihydropimeridin (FG 456,6)
Tab.	Tabelle
Thimerosal	2-(Ethylmercurimercapto)-benzoesäure Natriumsalz
Trigl.	Triglyzeride
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (FG 121,1)
U	Unit, enzymatische Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
VLDL	Very Low Density Lipoproteins (Lipoproteine sehr niedriger Dichte)
Vol.%	von hundert bezogen auf Volumen
x	Zeichen der Multiplikation
z.RA.	zur Rückstandsanalyse
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorphenol
2,4-D	2,4-Dichlorphenol

7.2 Ableitung der verwendeten physikalisch-chemischen Beziehungen: Verlauf der Konzentrationen bei Dialyse einer gesättigten Lösung, in der die Konzentration des gelösten Stoffes durch überschüssigen Bodenkörper des Stoffes konstant gehalten wird, gegen reines Lösungsmittel

Gegeben sei einem System bestehend aus einer semipermeablen Membran, auf deren einer Seite (hier gekennzeichnet durch Suffix 1) sich eine gesättigte Lösung befindet, in der die Konzentration $[A]_1$ des gelösten Stoffes A durch überschüssigen Bodenkörper des Stoffes konstant gehalten wird, und auf deren anderer Seite (hier gekennzeichnet durch Suffix 2) sich zur Zeit $t=0$ reines Lösungsmittel B befindet. Unter der Voraussetzung, daß die Lösungsgeschwindigkeit von A in B deutlich größer ist als die Geschwindigkeit des Stofftransports von A durch die Membran, gekennzeichnet durch die Geschwindigkeitskonstante k_v , ist $[A]_1$ gleich der Löslichkeit von A in B, $L_{A,B}$, unabhängig von der Zeit t . Damit lassen sich die Änderungen der Konzentrationen $[A]_1$ und $[A]_2$ mit der Zeit wie folgt beschreiben:

$$\frac{d[A]_1}{dt} = \frac{dL_{A,B}}{dt} = 0; \frac{d[A]_2}{dt} = k_v \times [A]_1 - k_v \times [A]_2 = k_v \times L_{A,B} - k_v \times [A]_2$$

Gleichung 21

Umformung und Integration ergibt:

$$\int d[A]_2 = \int k_v \times L_{A,B} dt - \int k_v \times [A]_2 dt$$

Gleichung 22

Damit gilt:

$$[A]_2 = L_{A,B} \times k_v \times t - [A]_2 \times k_v \times t$$

Gleichung 23

Weiteres Umformen ergibt

$$[A]_2 = L_{A,B} - \left(\frac{1}{k_v} \right) \frac{[A]_2}{t}$$

Gleichung 24

Quellennachweis

- ¹ Pohjanvirta, R., Tuomisto, J.; Short term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in laboratory animals: Effects, mechanism and animal models; *Pharm. Rev.* **46**; 483 (1994)
- ² Homberger, E., Reggiani, G., Sambeth, J., Wipf, H.K.; The Seveso accident: Its nature, extent and consequences; *Ann. Occup. Hyg.*, **22**, 327-370 (1979)
- ³ Rozman, K., Stahl, B., Sterzl-Eckert, H.; Polychlorierte Dibenzodioxine und -furane (PCDD/F); in: Greim, H., Deml, E. (Hrsg.); *Toxikologie: eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 451-461 (1996)
- ⁴ Czuczwa, J.M., Hites, R.A.; Airborne dioxins and dibenzofurans: sources and fates; *Env. Sci. Technol.*, **20**, 195- (1986)
- ⁵ Hutzinger, O., Blumich, M.J., Vanden Berg, M., Olie, K.; Sources and fate of PCDDs and PCDFs: an overview; *Chemosphere*, **14**, 581-600 (1985)
- ⁶ Fiedler, H., Hutzinger, O., Timms, C.; Dioxins: Sources of environmental load and human exposure; *Toxicol. Environ. Chem.*, **29**, 157-234 (1990)
- ⁷ Clement, R.E., Suter, S.A., Reiner, E., McCurvin, D., Hollinger, D.; Concentrations of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in effluents and particulates from Ontario pulp and paper mills; *Chemosphere*, **19**, 649-654 (1989)
- ⁸ Fiedler, H.; Formation and sources of PCDD/PCDF; in: Abstracts of the 13th International Symposium on Dioxins and Related Compounds, Sept. 20-24 1993, Wien, Österreich (Organohalogen Compounds, Vol 11), 221-226 (1993)
- ⁹ Norstrom, R.J., Simon, M., Muir, D.C.G., Schweinberg, R.E.; Organochlorine contaminants in arctic food chains: Identification, geographical distribution, and temporal trends in polar bears; *Env. Sci. Technol.*, **22**, 1063-1071 (1988)
- ¹⁰ Report of the meeting to peer review „The inventory of dioxin sources in the United States“; EPA Contract No. 68-D5-0028 Work Assignment No. 98-05, Eastern Research Group, Lexington, USA (1998)
- ¹¹ Van den Berg, M., De Jongh, J., Poiger, H., Olsen, J.R.; The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity; *Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 7-74 (1994)
- ¹² Hardell, L., Eriksson, M., Axelson, O., Hoar Zahm, S.; Cancer epidemiology; in: Schechter, A. (Hrsg.); *Dioxin and Health*, Plenum Press, New York, 525-547 (1994)
- ¹³ Webster, T., Commoner, B.; Overview: The Dioxin debate; in: Schechter, A. (Hrsg.); *Dioxin and Health*, Plenum Press, New York, 1-50 (1994)
- ¹⁴ Marple, L., Brunck, R., Throop, L.; Water solubility of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; *Environ. Sci. Technol.* **20**, 180-182 (1986)
- ¹⁵ Adams, W.J., Blaine, K.M.; A water solubility determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; *Chemosphere*, **15**, 1397-1400 (1986)
- ¹⁶ Marple, L., Berridge, B., Throop, L.; Measurement of the water-octanol partition coefficient of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 379-399 (1986)

-
- ¹⁷ Jackson, J.A., Diliberto, J.J., Birnbaum, L.; Estimation of octanol-water partition coefficients and correlation with dermal absorption for several polyhalogenated hydrocarbons; *Fundam. Appl. Toxicol.*, **21**, 334-344 (1993)
- ¹⁸ Schroy, J.M., Hileman, F.D., Cheng, S.C.; Physical/chemical properties of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; in: Bahner, R.C., Hansen, D.J. (Hrsg.); *Aquatic toxicology and hazard assessment: Eight Symposium*; American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 409-421 (1985)
- ¹⁹ Podoll, R.T., Jaber, H.M., Mill, T.; Tetrachlorodibenzodioxin: rates of volatilization and photolysis in the environment; *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 490-492 (1986)
- ²⁰ Boer, F.P., van Remortere F.P., Muelder, W.W.; The preparation and structure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 2,7-dichloro-*p*-dioxin; *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1006-1007 (1972)
- ²¹ Pohland, A.E., Yang, G.C.; Preparation and characterization of chlrinted dibenzo-*p*-dioxins; *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 1093-1099 (1972)
- ²² Schroy, J.M., Hileman, F.D., Cheng, S.C.; Physical/chemical properties of 2,3,7,8-TCDD; *Chemosphere*, **14**, 877-880 (1985)
- ²³ Rordorf, B.F.; Thermal properties of dioxins, furans and related compounds; *Chemosphere*, **15**, 1325-1332 (1986)
- ²⁴ Kearney, P.C., Woolson, E.A., Isensee, A.R., Helling, C.S.; Tetrachlorodibenzodioxin in the environment: sources, fate, and decontamination; *Environ. Health Perspect.*, **5**, 273-277 (1973)
- ²⁵ Stehl, R.H., Papenfuss, R.R., Bredeweg, R.A., Roberts, R.W.; The stability of pentachlorophenol and dioxins to sunlight, heat and combustion; in: Blair, E.H. (Hrsg.); *Chlorodioxins: Origin and fate*; *Advances in Chemistry Series 120*, American Chemical Society, Washington D.C., 119-125 (1973)
- ²⁶ McConnell, E.E., Moore, J.A., Haseman, J.K., Harris, M.W.; The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in mice and guinea pigs; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **44**, 335-356 (1987)
- ²⁷ Pohjanvirta, R., Unkila, M., Tuomisto, J.; Comparative acute lethality of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin in the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant strain; *Pharmacol. Toxicol.*, **73**, 52-56 (1993)
- ²⁸ Wilson, C.L., Safe, S.; Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses; *Toxicol. Pathol.*, **26**, 657-671 (1998)
- ²⁹ Nebert, D.W., Goujon, F.M., Gielen, J.E.; Aryl hydrocarbon hydroxylase by polycyclic hydrocarbons: simple autosomal dominant trait in the mouse; *Nature New Biol.*, **236**, 107-110 (1972)
- ³⁰ Poland, A., Glover, E.; Stereo-specific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is a receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase; *J. Biol. Chem.*, **251**, 4936-4946 (1976)
- ³¹ Henry, E.C., Rucci, G., Gasiewicz, T.A.; Characterization of multiple forms of the Ah-receptor: comparison of species and tissues; *Biochemistry*, **28**, 6430-6440 (1989)

-
- ³² Carlstedt-Duke, J.M.B.; Tissue distribution of the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat; *Cancer Res.*, **39**, 3172-3176 (1979)
- ³³ Heath-Pagliuso, S.; Rogers, W.J.; Tullis, K.; Seidel, S.D.; Cenijn, P.H.; Brouwer, A.; Denison, M.S.; Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites; *Biochemistry*, **37**, 11508-15 (1998)
- ³⁴ Phelan, D., Winter, G.M., Rogers, W.J., Lam, J.C., Denison, M.S.; Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin; *Arch. Biochem. Biophys.*, **357**, 155-63 (1998)
- ³⁵ Safe, S.H.; Development validation and problems with the toxic equivalency factor approach for risk assessment of dioxins and related compounds; *J. Anim. Sci.*, **76**, 134-41 (1998)
- ³⁶ Chang, C.Y., Puga, A.; Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor; *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 525-35 (1998)
- ³⁷ Denison, M.S., Phelan, D., Elferink, C.J.; The Ah receptor signal transduction pathway; in: Denison, M.S., Helferich, W.G. (Hrsg.); *Toxicant receptor interactions: modulation of signal transduction and gene expression*; Target Organ Toxicology Series, Taylor and Francis, Philadelphia, 3-33 (1998)
- ³⁸ Hankinson, O., Reyes, H., Hoffman, E.C., Brooks, B.A., Johnson, B., Nanthur, J., Watson, A.J., Weir-Brown, K.; A genetic analysis of Ah receptor action; *Chemosphere*, **25**, 37-40 (1992)
- ³⁹ Voorman R., Aust, S.D.; TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) is a tight binding inhibitor of cytochrome P-450d; *Biochem. Toxicol.*, **4**, 105-109 (1989)
- ⁴⁰ Grady, A.W., Fabacher, D.L., Frame, G., Steadman, B.L.; Morphological deformities in brown bullheads administered dietary β -naphthoflavone; *Journal of Aquatic Animal Health*, **4**, 7-16 (1992)
- ⁴¹ Holsapple, M.P., Morris, D.L., Wood, C., Snyder, N.K.; 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-*p*-dioxin induced changes in immunocompetence: possible mechanisms; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **31**, 71-100 (1991)
- ⁴² Rozman, K.; A critical view of the mechanism(s) of toxicity of 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxin: Implications for human safety assessment?; *Dermatosen in Beruf und Umwelt*, **37**, 81-92 (1989)
- ⁴³ DeVito, M.J., Birnbaum, L.S.; Toxicology of dioxins and related chemicals; in: Schecter, A. (Hrsg.); *Dioxin and Health*, Plenum Press, New York, 525-547 (1994)
- ⁴⁴ Pohjanvirta R., Vartiainen, T., Uusi-rauva, A., Monkkonen, J., Tuomosto, J.; Tissue distribution, metabolism, and excretion of [¹⁴C]-TCDD in a TCDD susceptible and a TCDD-resistant strain; *Pharmacol. Toxicol.*, **66**, 93-100 (1990)
- ⁴⁵ Rose, J.Q., Ramsey, J.C., Wentzler, T.H., Hummel, R.A., Gehring, P.J.; The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin following single and repeated oral doses to the rat; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **36**, 209-226 (1976)
- ⁴⁶ Peterson, R.E., Seefeld, M.D., Christian, B.J., Potter, C.L., Kellin, C.K., Keesey, R.E.; The wasting syndrome in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity: Basic features and their interpretation; *Banbury Report*, **18**, 291-308 (1984)

-
- ⁴⁷ Stahl, B.U., Kettrup, A., Rozman, K.; Comparative toxicity of four chlorinated dibenzo-*p*-dioxins (CDDs) and their mixture. Part I. Acute toxicity and toxic equivalence factors; Arch. Toxicol., **66**, 471-477 (1992)
- ⁴⁸ Beatty, P.W., Vaughn, W.K., Neal, R.A.; Effect of alteration of rat hepatic mixed-function-oxidase (MFO) activity on the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD); Toxicol. Appl. Pharmacol., **45**, 513-519 (1978)
- ⁴⁹ Weber, L.W.D., Ernst, S., Stahl, B.U., Rozman, K.; Tissue distribution and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats after intravenous injection; Fund. Appl. Toxicol., **21**, 523-534 (1993)
- ⁵⁰ Vos, J.G., Van Loveren, H., Schuurmann, H.-J.; Immunotoxicity of dioxin: Immune function and host resistance in laboratory animals and humans; Banbury report **35**, 79-93 (1991)
- ⁵¹ Benjamini, E., Leskowitz, S.; Immunology: A short course; 2. Aufl., Wiley-Liss, New York, 26 (1991)
- ⁵² Tucker, A.N., Vore, S.J., Luster, M.I.; Suppression of B-cell differentiation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; Mol. Pharmacol. **29**, 372-377 (1986)
- ⁵³ Vos, J.G., Kreftenberg, J.G., Engel, H.W.B., Minderhoud, A., van Noorle Jansen, L.M.; Studies on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced immune suppression and decreased resistance to infection: Endotoxin hypersensitivity, serum zinc concentration and effect of thymosin treatment; Toxicology, **9**, 75-84 (1978)
- ⁵⁴ Vos, J.G., Moore, J.A.; Suppression of cellular immunity in rats and mice by maternal treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **47**, 777-791 (1974)
- ⁵⁵ Luster, M.I., Boorman, D.R., Dean, J.H., Harris, M.H., Luebke, R.W., Padarathigh, M.L., Moore, J.A.; Examination of bone marrow, immunologic parameters and host susceptibility following pre- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD); Int. J. Immunopharmacol., **2**, 310-320 (1980)
- ⁵⁶ Eisenbrand, G., Metzler, M.; Toxikologie für Chemiker: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 92 (1994)
- ⁵⁷ Mocarelli, P., Marocchi, A., Brambilla, P., Gerthoux, P.M., Colombo, L., Mondonico, A., Meazza, L.; Effects of dioxin exposure in humans at Seveso, Italy, Banbury report **35**, 95-100 (1991)
- ⁵⁸ Burlison, G.R., Lebec, H., Yang, Y.G., Ibanes, J.D., Pennington, K.N., Birnbaum, L.S.; Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice; Fundam. Appl. Toxicol., **29**, 40-47 1996
- ⁵⁹ Schrenk, D.; WHO setzt Werte für die tolerierbare tägliche Aufnahme an Dioxinen neu fest; Nachr. Chem. Techn. Lab., **47**, 313-316 (1999)
- ⁶⁰ Fan, F., Wierda, D., Rozman, K.K.; Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on humoral and cell-mediated immunity in Sprague-Dawley rats; Toxicology, **106**, 221-228 (1996)

-
- ⁶¹ Kociba, R.J., Keller, P.A., Park, C.N., Gehring, P.J.; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): Results of a 13-week oral toxicity study in rats; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **35**, 553-574 (1976)
- ⁶² Barsotti, D.A., Abrahamson, L.J., Allen, J.R.; Hormonal alterations in female rhesus monkeys fed a diet containing 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **211**, 463-469 (1987)
- ⁶³ Umbreit, T.H., Hesse, E.J., McDonald, G.J., Gallo, M.A.; Effects of TCDD-estradiol interactions in three strains of mice; *Toxicol. Lett.*, **40**, 1-9 (1987)
- ⁶⁴ Chahoud, I., Krowke, R., Schimmel, A., Merker, H., Neubert, D.; Reproductive toxicity and pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. I. Effects of high doses on the fertility of male rats; *Arch. Toxicol.*, **63**, 432-439 (1989)
- ⁶⁵ Gray, L.E., Ostby, J.S., Kelce, W.R.; A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **146**, 11-20 (1997)
- ⁶⁶ Egeland, G.M., Sweeney, M.H., Fingerhut, M.A., Halperin, W.E., Wille, K.K., Schnorr, T.M.; Serum 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin's (TCDD) effect on total serum testosterone and gonadotropins in occupationally exposed men, Society of Epidemiological Research, Minneapolis (1992)
- ⁶⁷ Moore, R.W., Parsons, J.A., Bookstaff, R.C., Peterson, R.E.; Androgenic deficiency in male rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **79**, 9-111 (1985)
- ⁶⁸ Sharpe, R.M., Skakkebaek, R.E.; Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?; *Lancet*, **341**, 1392-1395 (1993)
- ⁶⁹ Schrenk-Bergt, C., Steinberg, C.; Endokrine Substanzen in der aquatischen Umwelt; in: Steinberg, C., Calmano, W., Klapper, H., Wilken, R.-D. (Hrsg.); *Handbuch Angewandte Limnologie*, 6. Erg. Lfg, ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg Lech (1998)
- ⁷⁰ Birnbaum, L., Developmental toxicity of TCDD and related compounds: Species sensitivities and differences; *Banbury Report* **35**, 51-68 (1991)
- ⁷¹ Couture, L.A., Abbott, B.D., Birnbaum, L.S.; A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Recent advances toward understanding the mechanism; *Teratology*, **42**, 619-632 (1990)
- ⁷² Mably, T.A., Bjerke, D.L., Moore, R.W., Gendron-Fitzpatrick, A., Peterson, R.E.; In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**, 118-126 (1992)
- ⁷³ Gray, L.E. Jr, Kelce, W.R., Monosson, E., Ostby, J.S., Birnbaum, L.S.; Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **131**, 108-118 (1995)
- ⁷⁴ Yamashita, F., Hayashi, M.; Fetal PCB syndrome: clinical features, intrauterine growth retardation and possible alteration in calcium metabolism; *Environ. Health. Perspect.*, **59**, 41-45 (1985)

-
- ⁷⁵ Huff, J.; 2,3,7,8-TCDD: A potent and complete carcinogen in experimental animals; *Chemosphere*, **25**, 173-176 (1992)
- ⁷⁶ Wassom, J.S., Huff, J.E., Lotriano, N.A.; A review of the genetic toxicology of chlorinated ibenzo-*p*-dioxins; *Mutat. Res.*, **47**, 141-160 (1977)
- ⁷⁷ Turteltaub, K.W., Felton, J.S., Gledhill, B.L., Vogel, J.S., Southon, J.R., Caffee, M.W., Finkel, R.C., Nelson, D.E., Proctor, I.D., Davis, J.C.; Accelerator mass spectrometry in biomedical dosimetry: relationship between low-level exposure and covalent binding of heterocyclic amine carcinogens to DNA; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 5288-5292 (1990)
- ⁷⁸ Pitot, H.C., Goldsworthy, T., Campbell, H.A., Poland, A.; Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine; *Cancer Res.*, **40**, 3616-3620 (1980)
- ⁷⁹ Lakshmanan, M.R., Campbell, B.S., Chirtel, S.J., Ekarohita, N., Ezekiel, M.; Studies on the mechanism of absorption and distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **239**, 673-677 (1986)
- ⁸⁰ Allen, J.R., VanMiller, J.P., Norback, D.H.; Tissue distribution, excretion and biological effects of [¹⁴C]-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats; *Food Cosmet. Toxicol.*, **13**, 501-505 (1975)
- ⁸¹ Piper, W.N., Rose, J.Q., Gehring, P.J.; Excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat; *Environ. Health Perspect.*, **5**, 241-244 (1973)
- ⁸² Curtis, L.R., Kerkvliet, N.I., Baecher-Steppan, L., Carpenter, H.M.; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin pretreatment of female mice altered tissue distribution but not hepatic metabolism of a subsequent dose; *Fundam. Appl. Toxicol.*, **14**, 523-531 (1990)
- ⁸³ Olson, J.R., Gasiewicz, T.A., Neal, R.A.; Tissue distribution, excretion and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the Golden Syrian hamster; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 78-85 (1980)
- ⁸⁴ Poiger, H., Schlatter, C.; Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in man; *Chemosphere*, **15**, 1489 (1986)
- ⁸⁵ Abraham, K., Krowke, R., Neubert, D.; Pharmacokinetics and biological activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Dose dependent tissue distribution and induction of hepatic ethoxyresorufin-*O*-deethylase in rats following a single injection; *Arch. Toxicol.*, **62**, 359-368 (1988)
- ⁸⁶ Mohammed, A., Eklund, A., Östlund-Lindqvist, A.-M., Slanina, P.; Distribution of toxaphene, DDT, and PCB in rat and human plasma; *Arch. Toxicol.*, **64**, 567-571 (1990)
- ⁸⁷ Spindler-Vomachka, M., Vodcnik, M.J., Lech, J.J.; Transport of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by lipoproteins in vivo; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **74**, 70-77 (1984)
- ⁸⁸ Henderson, L.O., Patterson, D.G. Jr.; Distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in human whole blood and its association with, and extractability from, lipoproteins; *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **40**, 604-611 (1988)
- ⁸⁹ Marinovich, D.G., Sirtori, C.R., Galli, C.L., Paoletti, R.; The binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to plasma lipoproteins may delay toxicity in experimental hyperlipidemia; *Chem.-Biol. Interactions*, **45**, 393-399 (1983)

-
- ⁹⁰ Gillner, M., Haldosén, L.-A., Gustafsson, S.A., Gustafsson, J.-Å.; Detection of specific binding of [1,6-³H]2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin ([³H]TCDD) in human leukocytes using electrofocusing in polyacrylamide gel; *Toxicol. Letters*, **47**, 41-51 (1989)
- ⁹¹ McKinney, J.D., Chae, K., Oatley, S., Blake, C.C.; Molecular interactions of toxic chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans with thyroxine binding prealbumin; *J. Med. Chem.*, **28**, 375-381 (1985)
- ⁹² Becker, M.M., Gamble, W.; Determination of the binding of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by low density lipoprotein and bovine serum albumin; *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 225-234 (1982)
- ⁹³ Mühlebach, S., Wyss, P.A., Bickel, M.H.; The use of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl (6-CB) as an unmetabolizable lipophilic model compound; *Pharm. Toxicol.*, **69**, 410-415 (1991)
- ⁹⁴ Eisenberg; Plasma lipoprotein conversions; in: Albers, J.J., Segrest, J.P. (Hrsg.); *Methods in enzymology; Plasma Lipoproteins, Part B; Characterization, Cell Biology and Metabolism*; Vol. 129, 347-366 (1986)
- ⁹⁵ Buckley-Kedderis, L.B., Diliberto, J.J., Linko, P., Goldstein, J.A., Birnbaum, L.S.; Disposition of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat: Biliary excretion and induction of cytochromes CYP1A1 and CYP1A2; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **111**, 163-172 (1991)
- ⁹⁶ Stahl, B.U., Rozman, K.; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) -induced appetite suppression in the Sprague-Dawley rat is not a direct effect on feed intake regulation in the brain; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 158-162 (1990)
- ⁹⁷ Ramsey, J.C., Hefner, J.G., Karbowski, R.J., Braun, R.J., Gehring, P.J.; The in vivo biotransformation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the rat; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **65**, 180-184 (1982)
- ⁹⁸ Rozman, K.; persönliche Mitteilung
- ⁹⁹ Kedderis, L.B., Diliberto, J.J., Birnbaum, L.S.; Disposition and excretion of intravenous 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin (TBDD) in rats; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 397-406 (1991)
- ¹⁰⁰ Wroblewski, V.J., Olson, J.R.; Effect of monooxygenase inducers and inhibitors on the hepatic metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat and hamster, *Drug Metab. Dispos.*, **16**, 43-51 (1988)
- ¹⁰¹ Olson, J.R., McReynolds, J.H., Kumar, S., McGarrigle, B.P., Bigliotti, B.P.; Uptake and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) in rat hepatocytes and liver slices, *Proc. 11th Int. Symp. on Dioxins and Related Compounds*, 145-, Research Triangle Park, NC (1991)
- ¹⁰² Poiger, H., Buser, H.R.; The metabolism of TCDD in the dog and rat, In: Poland, A., Kimbrough, R.D. (Hrsg.); *Biological mechanisms of dioxin action*, Banbury Report **18**, 39-47, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)
- ¹⁰³ Andersen, M.E., Clewell, H.J., Gargas, M.L., Smith, F.A., Reitz, R.H.; Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment for methylene chloride; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **87**, 185-205 (1987)

-
- ¹⁰⁴ Ramsey, J.C., Andersen, M.E.; A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 159-175 (1984)
- ¹⁰⁵ D'Souza, R.W., Francis, W.R., Andersen, M.E.; Physiological model for tissue glutathione depletion and increased resynthesis after ethylene dichloride exposure; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 563-568, (1988)
- ¹⁰⁶ Chen, H.-S.G., Gross, J.F.; Estimation of tissue-to-plasma partition coefficients used in physiological pharmacokinetic models; *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **7**, 117-125 (1979)
- ¹⁰⁷ Teorell, T.; Kinetics distribution of substances administered to the body; *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **57**, 205-240 (1937)
- ¹⁰⁸ Bischoff, K.B., Brown, R.G.; Drug distribution in mammals; *Chem. Eng. Prog. Symp. Ser.*, **66**, 33-45 (1966)
- ¹⁰⁹ Balant, L.P., Gex-Fabry, M.; Physiological pharmacokinetic modelling; *Xenobiotica*, **20**, 1241-1257 (1990)
- ¹¹⁰ Arms, A.D., Travis, C.C.; Reference physiological parameters in pharmacokinetic modeling; U.S. EPA 600/6-88/004 Final report; Erhältlich bei NTIS, PB88-196019 (1988)
- ¹¹¹ Roth, W.L., Weber, L.W., Rozman, K.K.; Incorporation of first-order uptake rate constants from simple mammillary models into blood-flow limited physiological pharmacokinetic models via extraction efficiencies; *Pharm Res*, **12**, 263-9 (1995)
- ¹¹² Lin, J.H., Sugiyama, Y., Awazu, S., Hanano, M; In vitro and in vivo evaluation of the tissue-to-blood partition coefficient for physiological pharmacokinetic models; *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **10**, 637-647 (1982)
- ¹¹³ Pang, K.S., Rowland, M.; Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well stirred" model and "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance; *J. Pharmacokin. Biophar.*, **5**, 625-653 (1977)
- ¹¹⁴ Jone, D.R., Hall, S.D., Branch, R.A., Jackson, E.K., Wilkinson, G.R.; Plasma binding and brain uptake of diazepines; in: J.-P. Tillement; E. Lindenlaub (Hrsg.); Protein binding and drug transport, Symposium Medica Hoechst, Vol. 20, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 311-324 (1986)
- ¹¹⁵ Pardridge, W.M.; Transport of plasma protein drugs into tissues in vivo; in: Tillement, J.-P., Lindenlaub, E. (Hrsg.); Protein binding and drug transport, Symposium Medica Hoechst, Vol. 20, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 277-292 (1986)
- ¹¹⁶ Wilkinson, G.R.; Prediction of in vivo parameters of drug metabolism and distribution from in vitro studies; in: *Pharmacokinetics in Risk Assessment*, Vol. 8, National Academy Press, Washington, D.C., pp. 80-95 (1987)
- ¹¹⁷ Sultatos, L.G., Kim, B., Woods, L.; Evaluation of estimations in vitro of tissue/blood distribution coefficients for organothiophosphate insecticides; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **103**, 52-55 (1990)
- ¹¹⁸ Freeman, R.A., Rozman, K., Wilson, A.G.E.; Physiological pharmacokinetic model of hexachlorobenzene in the rat; *Health Physics*, **57**, Sup. 1, 139-147 (1989)

-
- ¹¹⁹ Lam, G., Chen, M.L., Chiou, W.; Determination of tissue to blood partition coefficients in physiologically-based pharmacokinetic studies; *J. Pharm. Sc.*, **71**, 454-456 (1982)
- ¹²⁰ Schary, W.L., Rowland, M.J.; Protein binding and hepatic clearance: studies with tolbutamide, a drug of low intrinsic clearance, in the isolated rat liver preparation; *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **11**, 225-243 (1983)
- ¹²¹ Dixon, J.L., Ginsberg, H.N.; Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells; *J. Lipid Res.*, **34**, 167-179 (1993)
- ¹²² Buckley, L.A.; Biologically-based models of dioxin pharmacokinetics; *Toxicology*, **102**, 125-31 (1995)
- ¹²³ Kurz, H., Fichtl, B.; Binding of drugs to tissues; *Drug Metab. Rev.*, **14**, 467-510 (1983)
- ¹²⁴ Scheufler, E., Rozman, K.; Effect of hexadecane on the pharmacokinetics of hexachlorobenzene, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **75**, 190 (1984)
- ¹²⁵ Rozman, K., Rozman, T., Greim, H., Nieman, I.J., Smith, G.S.; Use of aliphatic hydrocarbons in feed to decrease body burdens of lipophilic toxicants in livestock; *J. Agri. Food Chem.*, **30**, 98-100 (1982)
- ¹²⁶ Rozman, T., Rozman, K., Williams, J., Greim, H.; Enhanced fecal excretion of mirex in rhesus monkeys by 5 % mineral oil in diet; *Drug Chem. Toxicol.*, **4**, 251-262 (1981)
- ¹²⁷ Rozman, K., Ballhorn, L., Rozman, T.; Mineral oil in the diet enhances fecal excretion of DDT in the rhesus monkey; *Drug Chem. Toxicol.*, **6**, 311-316 (1983)
- ¹²⁸ Rozman, K.K., Rozman, T.A., Williams, J., Greim, H.A.; Effect of mineral oil and/or cholestyramine in the diet on biliary and intestinal elimination of 2,4,5,2',4',5'-hexabromobiphenyl in the rhesus monkey; *J. Toxicol. Environm. Health*, **9**, 611-618 (1982)
- ¹²⁹ Iida, T., Hirakawa, H., Matsueda, T., Fukamachi, K., Tokiwa, H., Tsuji, H., Hori, Y.; Clinical trial of a combination of rice bran fiber and cholestyramine for promotion of fecal excretion of retained polychlorinated dibenzofuran and polychlorinated biphenyl in Yusho patients; 12th International Symposium on Dioxins and related compounds, Tampere, Finland August 24.-28., 1992
- ¹³⁰ Iida, T., Hirakawa, H., Matsueda, T., Hamamura, K., Nakagawa, R., Morita, K., Nakayama, J., Hori, Y., Guo, Y.L., Chang, F.M., et al.; Clinical trial of a combination of rice bran fiber and cholestyramine for promotion of fecal excretion of retained polychlorinated dibenzofuran and polychlorinated biphenyl in Yu-Cheng patients; *Organohalogen Compounds*, **21**, 57-62 (1994)
- ¹³¹ Rozman, K.; Hexadecane increases the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): is brown adipose tissue the primary target in TCDD-induced wasting syndrome?; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **125**, 996-1004 (1984)
- ¹³² McGrath, L., Cooper, K., Georgopoulos, P., Gallo, M.; Alternative models for low-dose analysis of biochemical and immunological endpoints for tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; *Reg. Tox. Pharm.*, **21**, 381-396 (1995)
- ¹³³ Leung, H.W., Poland, A., Paustenbach, D.J., Murray, F.J., Andersen, M.E.; Pharmacokinetics of [125I]-2-iodo-3,7,8-trichlorodibenzo-*p*-dioxin in mice: analysis with a physiological modeling approach; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **103**, 411-419 (1990)

-
- ¹³⁴ Roth, W.L., Ernst, S., Weber, L.W.D, Kerecsen, L., Rozman, K.; A pharmacodynamically responsive model of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) transfer between liver and fat at low and high doses; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127**, 151-62 (1994)
- ¹³⁵ Roth, W.L., Weber L.W., Stahl, B.U., Rozman, K.; A pharmacodynamic model of triglyceride transport and deposition during feed deprivation or following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **120**, 126-37 (1993)
- ¹³⁶ Geyer, H.J., Schramm, K.W., Scheunert, I., Schughart, K., Buters, J., Wurst, W., Greim, H., Kluge, R., Steinberg, C.E., Kettrup, A., Madhukar, B., Olson, J.R., Gallo, M.A.; Considerations on genetic and environmental factors that contribute to resistance or sensitivity of mammals including humans to toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. Part 1: Genetic factors affecting the toxicity of TCDD; *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **36**, 213-30 (1997).
- ¹³⁷ Poulin, P., Krishnan, K.; An algorithm for predicting tissue:blood partition coefficients of organic chemicals from n-Octanol:water partition coefficient data; *J. Toxicol. Environm. Health*, **46**, 101-113 (1995)
- ¹³⁸ Jepson, G.W., Hoover, D.K., Black, R.K., McCafferty, J.D., Mahle, D.A., Gearhart, J.M.; A partition coefficient determination method for nonvolatile chemicals in biological tissues; *Fund. Appl. Toxicol.*, **22**, 519-524 (1994)
- ¹³⁹ Canberra Packard Inc., telefonische Auskunft des Kundendiensts
- ¹⁴⁰ Bradford, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein.dye binding; *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
- ¹⁴¹ Bachorik, P.S.; Collection of blood samples for lipoprotein analyses; *Clin. Chem.*, **28**(6), 1375-1378 (1982)
- ¹⁴² Harris, W.; Persönliche Mitteilung
- ¹⁴³ Gordon, A.H.; Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels; in: Work, T.S.; Work, E (Edrs.); *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 1, Part I, 100
- ¹⁴⁴ Alcohols; Union Carbide Chemicals, 1961
- ¹⁴⁵ Burke, M.D., Mayer, R.T.; Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene; *Drug. Metab. Dispos.*, **2**, 583-588 (1974)
- ¹⁴⁶ Lubert, R.A., Nims, R.W., Mayer, R.T., Cameron, J.W., Schechtmann, L.M.; Measurement of cytochrome P-450 dependent dealkylation of alkoxyphenoxazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates: effects of dicoumarol; *Mutat. Res.*, **142**, 127-131 (1985)
- ¹⁴⁷ Dutton, D.R., Parkinson, A.; Reduction of 7-alkoxyresorufins by NADPH-cytochrome P450 reductase and its differential effects on their O-dealkylation by rat liver microsomal cytochrome P450; *Arch. Biochem. Biophys.*, **268**, 617-629, (1989).
- ¹⁴⁸ Dutton, D.R., Reed, G.A., Parkinson, A.; Redox cycling of resorufin catalysed by rat liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase; *Arch. Biochem. Biophys.*; **268**(2), 605-616, (1989)

-
- ¹⁴⁹ Goldstein, A.; Biostatistics: An introductory text; The MacMillan Co., New York, USA, 146 (1964)
- ¹⁵⁰ Harris, W.; persönliche Mitteilung
- ¹⁵¹ Naito, H.K., Wada, M., Ehrhart, L.A., Lewis, A.L.; Polyacrylamide-gel disc-electrophoresis as a screening procedure for serum lipoprotein abnormalities; Clin. Chem., **19**, 228-234 (1973)
- ¹⁵² Chapman, J.M., Goldstein, S., Lagrange, D., Laplaud, P.M.; A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum; J. Lipid Res., **22**, 339 - 358 (1981)
- ¹⁵³ Harris, W.; Persönliche Mitteilung
- ¹⁵⁴ Buckley Kedderis, L., Andersen, M.E., Birnbaum, L.S.; Effect of dose, time, and pretreatment on the biliary excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat; Fund. App. Toxicol., **21**, 405-411 (1993)
- ¹⁵⁵ Fernandez, J.D., Cook, P.M., Butterworth, B.C., Bradbury, S.P.; Temporal changes in purity and specific activity of tritium-labelled 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin: Radiopurity model for toxicology; Environ. Sci. Technol., in press
- ¹⁵⁶ Needham, L.L., Patterson, D.G. Jr., Pirkle, J.L., Henderson, L.O., Burse, V.W.; The basis for measuring 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in serum; Chemosphere, **18**, 425-430 (1989)
- ¹⁵⁷ Chapman, M.J.; Comparative Analysis of mammalian plasma lipoproteins; Methods Enzymol., **128**, 70-143 (1986)
- ¹⁵⁸ Harris, W.; Persönliche Mitteilung
- ¹⁵⁹ Chapman, M.J.; Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects; J. Lipid Res., **21**, 789-852 (1980)
- ¹⁶⁰ Poli, A., Franceschini, G., Puglisi, L., Sirtori, C.R.; Increased total and high density lipoprotein cholesterol with apoprotein changes resembling streptozotocin diabetes in tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) treated rats; Biochem. Pharmacol., **29**, 835-838 (1980)
- ¹⁶¹ DeJongh, J.; Verhaar, H.J.; Hermens, J.L.; A quantitative property-property relationship (QPPR) approach to estimate in vitro tissue-blood partition coefficients of organic chemicals in rats and humans; Arch. Toxicol., **72**, 17-25 (1997)
- ¹⁶² Barton, P., Davis, A.M., McCarthy, D.J., Webborn, P.J.; Drug-phospholipid interactions. 2. Predicting the sites of drug distribution using n-octanol/water and membrane/water distribution coefficients; J. Pharm. Sci., 86(9):1034-9 1997
- ¹⁶³ Poulin, P., Krishnan, K.; A tissue composition-based algorithm for predicting tissue:air partition coefficients of organic chemicals; Toxicol. Appl. Pharmacol., **136**, 126-30 (1996)
- ¹⁶⁴ Poulin, P., Krishnan, K.; A biologically based algorithm for predicting human tissue:blood partition coefficients of organic chemicals; Human Exp. Toxicol., **14**, 273-280 (1995)
- ¹⁶⁵ Poulin, P., Krishnan, K.; A mechanistic algorithm for predicting blood:air partition coefficients of organic chemicals with the consideration of reversible binding in hemoglobin; Toxicol. Appl. Pharmacol., **136**, 131-7 (1996)

¹⁶⁶ Diliberto, J.J., Kedderis, L.B., Birnbaum, L.S.; Acute oral exposure to 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin (TBDD); In: Hutzinger, O., Fiedler, H., Hrsg.; Organohalogen Compounds, Vol. I, Dioxin 90-SEMINAR Toxicology, Environment, Food, Exposure-Risk Ecoinforma Press, Bayreuth, 309-311 (1990)

¹⁶⁷ Kerpel, S., Shafrir, E., Shapiro, B.; Mechanism of fatty acid assimilation in adipose tissue; Biochim. Biophys. Acta, **46**, 495-504 (1961)