

# Effekte bromierter Flammschutzmittel auf den Fremdstoffmetabolismus

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades "Doktor der Naturwissenschaften" genehmigte

Dissertation

(D386)

vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemikerin

Silke Germer

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Kaiserslautern 2008

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 08.2007

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08.05.2008

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Stefan Ernst

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Kietzmann

Die vorliegende Dissertation enstand zwischen November 2002 und September 2006 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Technischen Universität Kaiserlautern. Teile der Arbeit wurden am Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Niederlande, (Februar 2003) und an der Nationaluniversität Seoul (SNU), Korea, (April-Oktober 2005) durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

Inh	Inhaltsverzeichnisi			
Ta	bellenve	rzeichnis	.iv	
Ab	bildungs	sverzeichnis	v	
Zu	sammen	fassung	.vi	
Ab	stract		/iii	
Α	Einleit	ung	. 1	
	A.1 F	Flammschutzmittel	. 1	
	A.1.1	Bromierte Flammschutzmittel	. 1	
	A.1.2	Anwendung	. 2	
	A.1.3	Exposition	. 3	
	42 T	TBRP4	⊿	
	A 2 1	Herstellung	. 4	
	A.2.2	Chemische Charakterisierung	. 4	
	A.2.3	Anwendung	. 4	
	A.2.4	Exposition	. 5	
	A.2.5	Kinetik und innere Exposition	. 5	
	A.2.6	Metabolismus und Ausscheidung	. 6	
	A.2.7	Wirkungen	. 6	
	A.3 F	IBCD	8	
	A 3 1	Chemische Charakterisierung	. 0	
	A.3.2	Herstellung	. 8	
	A.3.3	Anwendung	. 9	
	A.3.4	Exposition	. 9	
	A.3.5	Tier	10	
	A.3.6	Biomagnifikation	11	
	A.3.7	Mensch	12	
	A.3.8	Metabolismus und Ausscheidung	12	
	A.3.9	Wirkung	12	
	A.4 F	PBDEs	13	
	A.4.1	Chemische Charakterisierung	13	
	A.4.2	Herstellung	14	
	A.4.3	Anwendung	15	
	A.4.4	Exposition	16	
	A.4.5	Tier	17	
	A.4.6	Nahrungskette	18	
	A.4.7	Mensch	19	
	A.4.8	Toxikokinetik	21	
	A.4.9	Wirkungen	27	
	A.5 F	Fremdstoffmetabolismus	31	
	A.5.1	Phasen des Fremdstoffmetabolismus	31	
	A.5.2	Cytochrom P450 Enzyme	32	
	A.5.3	Kategorisierung der CYPs	33	
	A.5.4	CYP1A Isoenzyme	34	
	A.5.5	CYP2B Isoenzyme	36	
	A.5.6	CYP3A Isoenzyme	39	
	A.6 Z	Ziele der Arbeit	42	

В	Materia	I und Methoden	43
	B.1 M B.1.1 B.1.2 B.1.3 B.1.4 B.1.5	aterialien Geräte Chemikalien Lösungen und Puffer Kits Software	<i>43</i> 44 46 52 52
	B.2 In	<i>vivo Studien</i>	52
	B.2.1	Studiendesign und Tierhaltung	53
	B.2.2	Nekropsie und Versenden der Leber	55
	B.3 In B.3.1 B.3.2 B.3.3 B.3.4 B.3.5 B.3.6 B.3.7 B.3.8	vitro Studien Versuchstiere und Versuchstierhaltung In situ Perfusion und Präparation von Hepatozyten Bestimmung von Zellzahl und Vitalität Herstellung einer Kollagenlösung Kultivierung auf Single-Layer-Kollagenschicht Kultivierung im Sandwich-Kollagen Behandlung der Zellen Zellernte	<i>55</i> 55 57 57 58 58 59 59
	B.4 Au	ufarbeitung der Zellbestandteile	60
	B.4.1	Isolierung der Mikrosomen	60
	B.4.2	Proteinbestimmung	60
	B.4.3	Isolierung der RNA	61
	B.4.4	Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der RNA	62
	B.5 Bi	ochemische Tests	63
	B.5.1	Enzymaktivitäten	63
	B.5.2	Western Blot	66
	B.5.3	Real-Time PCR	68
	B.5.4	Statistische Auswertung	73
С	Ergebn	isse	74
	C.1 TE	BBPA	74
	C.1.1	RNA	74
	C.1.2	Western Blot	74
	C.1.3	Enzymaktivität	75
	C.2 H	BCD	77
	C.2.1	RNA	77
	C.2.2	Western Blot	77
	C.2.3	Enzymaktivität	78
	C.3 Hi	BCD – in vitro	<i>80</i>
	C.3.1	RNA	80
	C.3.2	Western Blot	80
	C.4 Pe	<i>entamix</i>	<i>8</i> 2
	C.4.1	RNA	82
	C.4.2	Western Blot	82
	C.4.3	Enzymaktivität	83
	C.5 Pe	entamix – in vitro	<i>85</i>
	C.5.1	RNA	85
	C.5.2	Western Blot	86
	C.5.3	Enzymaktivität	86
	C.6 Do	ecamix	<i>88</i>
	C.6.1	RNA	88
	C.6.2	Western Blot	89
	C.6.3	Enzymaktivität	89

D	Disk	ussion	91
	D.1	ТВВРА	91
	D.2	HBCD	93
	D.3	Pentamix	
	D.4	Decamix	100
	D.5	Allgemeine Diskussion	
	D.5.1	1 Studiendesign	
	D.5.2	2 CYP-Induktoren und deren Folgen	
	D.5.3	3 Advers und adaptiert	
Е	Liter	aturverzeichnis	106
E F	Liter Anha	ang	106 I
E F	Liter Anha F. 1	raturverzeichnis ang PBDE – Nomenklatur	106 I
E F	Liter Anha F.1 F.2	raturverzeichnis ang PBDE – Nomenklatur Ergebnistabellen	106 I /
F	Liter Anha F.1 F.2 F.2.1	raturverzeichnis ang PBDE – Nomenklatur Ergebnistabellen I TBBPA	106  
E F	Liter Anha F.1 F.2 F.2.1 F.2.2	raturverzeichnis ang PBDE – Nomenklatur Ergebnistabellen TBBPA HBCD in vivo	106  
F	Liter Anha F.1 F.2 F.2.1 F.2.2 F.2.3	raturverzeichnis ang PBDE – Nomenklatur Ergebnistabellen TBBPA HBCD in vivo HBCD in vito	106  //  /V  VII
E F	Liter Anha F.1 F.2 F.2.1 F.2.2 F.2.3 F.2.4	raturverzeichnis ang PBDE – Nomenklatur Ergebnistabellen TBBPA HBCD in vivo HBCD in vitro Pentamix in vivo	106  //  /V  VII VIII
E F	Liter Anha F.1 F.2 F.2.1 F.2.2 F.2.3 F.2.4 F.2.5	raturverzeichnis ang PBDE – Nomenklatur Ergebnistabellen TBBPA HBCD in vivo HBCD in vitro Pentamix in vivo Pentamix in vitro	

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Weltweite Nachfrage einiger Flammschutzmittel	2
Tabelle 2: Expositionsdaten für HBCD in Tieren	
Tabelle 3: Zusammensetzung der PBDEs in kommerziellen Gemischen	15
Tabelle 4: Einsatz von PBDEs in diverse Kunststoffe	15
Tabelle 5: Expositionsdaten für PBDEs	
Tabelle 6: Geräteliste	43
Tabelle 7: Chemikalienliste	45
Tabelle 8: Perfusionslösungen	
Tabelle 9: Gelzusammensetzung	50
Tabelle 10: Puffer für Western Blot	51
Tabelle 11: Antikörperverdünnung in TBS	51
Tabelle 12: PCR-Kits	51
Tabelle 13: Primertabelle	
Tabelle 14: PCR-Produkte	
Tabelle 15: Übersicht der Induktionsergebnisse von TBBPA	
Tabelle 16: Übersicht der Induktionsergebnisse von HBCD	
Tabelle 17: Übersicht über die Induktionsergebnisse vom Pentamix	
Tabelle 18: Übersicht über Induktionsergebnisse vom Decamix	100

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einsatzmengen von BFRs in Anwendungssparten	2
Abbildung 2: Strukturformel von TBBPA	4
Abbildung 3: Strukturformeln von $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -HBCD	8
Abbildung 4: Strukturformel von PBDEs	14
Abbildung 5: CYP abhängige Oxidation	33
Abbildung 6: Induktionsmechanismus von CYP1A über AhR	35
Abbildung 7: Induktionsmechanismus von CYP2B über CAR	38
Abbildung 8: Induktionsmechanismus von CYP3A	40
Abbildung 9: Oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin bzw. 7-Pentoxyresorufin	64
Abbildung 10: Oxidative Debenzylierung von Luciferin-6'-benzylether	65
Abbildung 11: TBBPA im Western Blot	75
Abbildung 12: Einfluss von TBBPA auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in vivo	76
Abbildung 13: HBCD im Western Blot	78
Abbildung 14: Einfluss von HBCD auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in vivo	79
Abbildung 15: HBCD in Primärhepatozyten im Western Blot	81
Abbildung 16: Einfluß von HBCD auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in Primärhepatozyten	81
Abbildung 17: Pentamix im Western Blot	83
Abbildung 18: Einfluss des Pentamix auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in vivo	84
Abbildung 19: Pentamix in Primärhepatozyten im Western Blot	86
Abbildung 20: Einfluss des Pentamix auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in Primärhepatozyte	n
-	87
Abbildung 21: Decamix im Western Blot	89
Abbildung 22: Einfluss des Decamix auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in vivo	90

## Zusammenfassung

Bromierte Flammschutzmittel (BFRs) werden zum Brandschutz in verschieden Kunststoffe eingearbeitet. Da sie auch in Alltagsgegenständen eingesetzt werden und in nahezu allen Kompartimenten der Umwelt, eingeschlossen der Nahrung, detektiert wurden, ist der Mensch täglich diesen Stoffen ausgesetzt. Die Flammschutzmittel Tetrabromobisphenol A (TBBPA), Hexabromocyclododecan (HBCD) und die aus polybromierten Biphenylethern (PBDEs) bestehenden, industriell hergestellten Gemische Pentamix und Decamix stehen aufgrund ihrer verbreiteten Anwendung oder Verteilung in der Umwelt und ihrem bioakkumulierendem Potential unter besonderem Fokus dieser Arbeit.

In subakuten Studien wurden Wistar Ratten (WU-CBP) oral mit verschiedenen Dosen von TBBPA, HBCD, Pentamix oder Decamix über 28 Tage täglich behandelt. Während TBBPA mit Dosen bis zu 300 mg/kg KG/d im Futter vermengt wurde, wurden HBCD und der Pentamix mit jeweils bis zu 200 mg/kg KG/d und der Decamix mit bis zu 60 mg/kg KG/d in Maiskeimöl per Schlundsonde verabreicht. Untersucht wurden anschließend in allen vier Studien die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A in der Leber in der Real-Time-PCR, im Western-Blot und in Enzymaktivitätstests. Induktionseffekte in diesen Enzymfamilien wurden zusätzlich in Primärheptozyten der Ratte bei Behandlung mit HBCD und dem Pentamix ermittelt.

Während für TBBPA *in vivo* bei keinem der drei Enzymfamilien Induktionseffekte weder bei Protein, noch RNA nachzuweisen waren, zeigte sich beim Decamix eine Erhöhung von CYP1A und CYP2B in der Leber von weiblichen und noch stärker von männlichen Ratten. Dies liess sich für RNA, sowie Protein nachweisen. Unabhängig von der Trendanalyse wurden schon signifikante Effekte ab der Dosis von 15 bzw 7,5 mg/kg KG/d für CYP1A bzw. CYP2B berechnet. Für CYP3A wurden weder in den weiblichen noch männlichen Tieren Induktionseffekte ausgemacht.

Durch HBCD-Behandlung wurden *in vitro* CYP1A, CYP2B und CYP3A konzentrationsabhängig induziert, *in vivo* CYP2B und CYP3A ab Dosen von 10 mg/kg KG/d. HBCD zeigte für CYP1A *in vivo* keine Effekte.

Der Pentamix induzierte, dosisabhängig die Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A, wie auf RNA- und Protein- und teilweise auf Aktivitätsebene nachgewiesen werden konnte. Im Falle von CYP2B liegt statistisch signifikant der niedrigste Effektlevel bei 2,47 mg/kg KG/d.

*In vitro* wurde CYP1A mit einer  $EC_{50}$  von etwa 1µM induziert, festgestellt in der RealTimePCR, im Western Blot-Verfahren und im EROD-Assay.

Die bromierten Flammschutzmittel HBCD, Penta- und Decamix konnten somit *in vivo* und, teilweise *in vitro*, als Induktoren für fremdstoffmetabolisierende CYPs der Ratte ausgemacht werden. Implikationen davon sind vermutete endokrine Effekte durch Disbalance der über die CYPs metabolisierten Hormone, aber auch Einwirkungen auf Medikamentenwechselwirkungen. Andere Enzyme, die bei der Transkription über die gleichen Signalwege gesteuert werden wie die vorgestellten Markerenzyme, könnten ebenso durch BFRs induziert werden.

# Abstract

Brominated flame retardants (BFRs) are incorporated into plastics due to fire safety. They are employed in every day items and were detected in nearly all environmental compartiments, even in food. Therefore presumely, the human being is continously exposed to BFRs. The flame retardants tetrabromobisphenol A (TBBPA), hexabromocyclododecane (HBCD) and the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), particularly the commercial mixtures Pentamix and Decamix, are presented in this thesis. The selection of these BFRs is based on their momentous application, spreading in the environment or bioaccumulating potential.

In subacute studies Wistar rats (WU-CBP) were administered a daily oral dose with TBBPA, HBCD, Pentamix or Decamix for 28 days. TBBPA was mixed into feed with doses of up to 300 mg/kg bw/d. HBCD, Pentamix and Decamix were mixed in corn oil and given via gavage up to 200 mg/kg bw/d (HBCD, Pentamix) or 60 mg/kg bw/d (Decamix). In all of these studies the liver enzymes of the xenobiotic metabolism CYP1A, CYP2B and CYP3A were examined in Real Time PCR, Western Blot analysis, and enzyme activity assays. Additionally, inducing effects of these enzyme families were investigated in primary rat hepatocytes under treatment of HBCD and Pentamix.

No inducing effects in these enzyme families were found for treatment with TBBPA neither on RNA, nor protein level. Contrariwise, treatment with the Decamix led to increase of CYP1A and CYP2B in liver of female and yet stronger of male rats, as detected for RNA and protein. Independently of a trend analysis, significant effects were detected already at doses of 15 and 7.5 mg/kg bw/d for CYP1A and CYP2B, respectively. No effects appeared for CYP3A in liver of male or female rats.

Treatment of HBCD led to concentration dependent induction of CYP1A, CYP2B and CYP3A *in vitro*. *In vivo* significant effects occurred at doses of 10 mg/kg bw/d for CYP2B and CYP3A, but not CYP1A.

The enzymes CYP1A, CYP2B, and CYP3A were dose dependently increased through treatment of Pentamix, as shown for RNA, protein and partly for activity level. The lowest effect level for CYP2B was determined at dosage of 2.47 mg/kg bw/d. *In vitro*, 1  $\mu$ M seemed to be the EC<sub>50</sub> concentration for induction of CYP1A on activity level. Also, significant effects at this concentration were shown in Real Time PCR and Western blot analysis. In Real Time

PCR analysis CYP2B was increased. Additionally, on RNA and protein level CYP3A was enhanced due to Pentamix treatment.

Thus, the brominated flame retardants HBCD, Penta- and Decamix were demonstrated to be inducers of CYPs in xenobiotic metabolism in rat liver, *in vivo* and partly *in vitro*. These results implicate probable endocrine effects through disbalances of hormones metabolized by CYPs and, also, impacts on drug-drug-interactions. Other enzymes involved in the same transcriptional signalling pathways might be comparably induced.

# A Einleitung

## A.1 Flammschutzmittel

Fortschritte in der Polymerchemie in den letzten 50 Jahren führten zu einer großen Bandbreite an Kunststoffen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten. Mittlerweile werden Kunststoffe in großem Maße in jeglichen Variationen eingesetzt. Die meisten dieser Polymerprodukte sind brennbar. Um den Feuerschutzbestimmungen nachzukommen, werden Flammschutzmittel in brennbare Materialen, wie Plastik, aber auch Holz, Papier und Textilien eingearbeitet. Sie verlangsamen oder unterdrücken dabei die Flammausbreitung im Falle eines Feuers. (Alaee, 2003)

Flammschutzmittel lassen sich anhand ihrer chemischen Struktur in verschiedene Klassen unterteilen:

- organisch halogenierte (bromierte und chlorierte),
- organisch phosphorbasierte,
- anorganisch phosphorbasierte,
- stickstoffbasierte,
- mineralische
- und sonstige.

Etwa zehn Prozent der in Europa eingesetzten Flammschutzmittel gehören zur Klasse der bromierten Flammschutzmittel (BFR).

#### A.1.1 Bromierte Flammschutzmittel

Die mehr als 75 verschiedenen Stoffe der BFRs können wiederum unterteilt werden in polybromierte Biphenyle (PBBs), Diphenylether (PBDEs), Cyclododecane, Phenole und Derivate der Phthalsäure. Diese werden als reaktive oder additive Monomere mit einem Gewichtsanteil von 1-30% in Polymere eingearbeitet. Reaktive BFRs binden vor dem Polymerisationsprozess kovalent an Moleküle des Kunststoffs, während additive in die Polymere eingemischt werden. Zur Hemmung der Flammausbreitung wird die Fähigkeit der Halogene ausgenutzt, reaktive Radikale, die durch das Feuer entstehen und seine Verbreitung fördern, abzufangen. (Leisewitz, 2001; Clariant, 2006)

## A.1.2 Anwendung

Die jährliche weltweite Produktion der BFRs wird nach Recherchen von Arias (2001) auf 300.000 Tonnen geschätzt. Das Bromine Science and Environmental Forum (BSEF) gab für das Jahr 2000 eine Absatzverteilung einzelner BFRs auf den jeweiligen Kontinenten an, wie in Tabelle 1 dargestellt. (BSEF, 2001) Danach spielt Tetrabromobisphenol-A (TBBPA) unter den BFRs weltweit die größte Rolle. Die PBDEs mit ihren industriellen Mixen Penta-, Octaund DecaBDE halten insbesondere auf den amerikanischen Märkten eine herausragende Stellung. Hexabromocyclododecan (HBCD) als nichtaromatisches Flammschutzmittel gewinnt mit 16.700 Tonnen Verbrauch im Jahre 2000 an Bedeutung. Die beeindruckende Absatzmenge von BFRs in Asien lässt sich durch den Einsatz in Elektronikartikeln erklären, dessen Industrie in den letzten 20 Jahren massiv zugenommen hat. Allein in Korea hat sich zwischen 1993 und 2003 die Bedarfsmenge an TBBPA verdreifacht, an HBCD vervierfacht und an DecaBDE versechsfacht. (BSEF, 2004; Chang, 2005)

BFRs	Amerika	Europa	Asien	Rest der We	lt Summe
TBBPA	18.000	11.600	89.400	600	119.700
HBCD	2.800	9.500	3.900	500	16.700
DecaBDE	24.500	7.600	23.000	1.050	56.100
OctaBDE	1.500	610	1.500	180	3.790
PentaBDE	7.100	150	150	100	7.500

Tabelle 1: Weltweite Nachfrage einiger FlammschutzmittelAngaben in Tonnen im Jahr 2000. (BSEF, 2001)



#### Abbildung 1: Einsatzmengen von BFRs in Anwendungssparten

Der Großteil der BFRs wird in Kunststoffe für den Industriezweig von Elektronik- und Elektrotechnik verarbeitet. Mehr als die Hälfte aller BFRs werden hier zu Flammschutzvorkehrungen benötigt, siehe Abbildung 1. Aber auch die Bauindustrie ist mit einem Anteil von 31% an BFRs weltweit starker Nachfrager an BFR-behandelten Kunststoffen, insbesondere wo strenge Brandschutzbestimmungen einen Einsatz von Flammschutzmitteln unerlässlich macht. Einen demgegenüber eher geringen Anteil haben Textilien, z.B. für Matratzen, Möbel in Hotels und Restaurants und der öffentliche Transport, wo ebenfalls Brandschutzbestimmungen zum Einsatz von BFR-behandelten Materialien führen. (BSEF, 2001)

#### A.1.3 Exposition

BFRs konnten in einigen Studien nicht nur in den damit behandelten Materialien, sondern auch in anderen nicht flammgeschützten Gebrauchsgegenständen, wie Hygieneartikel, und in verschiedenen Umweltkompartimenten auf allen Kontinenten nachgewiesen werden. Mit diesem weitverbreiteten Vorkommen der BFRs rücken sie schon in die Nähe von ubiquitären Kontaminanten, wie polychlorierte Biphenyle (PCBs). (Leisewitz, 2001)

Neben der Freisetzung von BFRs bei Herstellung und Verarbeitung erfolgt das Einbringen der BFRs in die Umwelt durch das Herauslösen der additiven Zusätze aus den Produkten. Beim Recycling von Kunststoffen können die BFRs sogar akkumuliert im Nachfolgeprodukt auftauchen. Des Weiteren werden im Brandfall nicht nur kleine Kunststoffteilchen und Moleküle mit Mikroexplosionen und Luftzirkulation in der näheren und weiteren Umgebung verteilt, sondern auch die eingearbeiteten BFRs. Sogar in der Arktis wurden BFRs in biotischen Unden Proben nachgewiesen. (de Wit, 2006; Leisewitz, 2001)

An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass bei hohen Temperaturen, die im Brandfalle und bei der Müllverbrennung entstehen, aus den halogenierten Flammschutzmitteln in Kombination mit anderen Halogenen am Brandort die toxischen mono- oder gemischthalogenierten Dioxine und Furane, z.B. Dibromdichlordibenzo-dioxin (Br<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>DD), entstehen können. (de Wit, 2006)

Den angesprochenen einzelnen BFRs ist mit PCBs und PBBs gemein, dass sie aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften zur Bioakkumulation, der Anreicherung in Organismen, insbesondere im Fettgewebe, neigen. In der Tat wurden diese industriell hergestellten Flammschutzmittel in verschiedenen Organismen und humanen Proben detektiert. Bei der Bioakkumulation liegt ein besonderes Augenmerk auf den über Jahre wachsenden Konzentrationen der biotischen Proben. (de Wit, 2002)

## A.2 TBBPA

## A.2.1 Herstellung

TBBPA wird durch Bromierung von Bisphenol A in bromhaltigen Lösungsmitteln hergestellt. Als Lösungsmittel agieren Halogenkohlenwasserstoffe allein oder in Kombination mit Wasser, 50% iger Bromsäure oder wässrigen Alkylmonoethern. Wässrige Essigsäure mit Natriumacetat soll die Farbe verbessern. Bei Einsatz von Methanol mit Brom entsteht neben TBBPA Bromwasser, welches zu Brommethan weiterreagiert. Nach der Synthese wird TBBPA aus der Lösung gefällt, filtriert, gewaschen, getrocknet und das Pulver verpackt. (WHO, 1995)

### A.2.2 Chemische Charakterisierung

Die empirische Formel von TBBPA lautet  $C_{15}H_{12}Br_4O_2$ . Die Strukturformel ist in Abbildung 2 dargestellt. Der Bromgehalt des farblos-kristallinen oder weiss-pulvrigen Stoffes beträgt 58,7 Masseprozent. TBBPA ist wenig wasserlöslich und stark lipophil. Der dafür aussagekräftige K<sub>ow</sub>-Wert liegt bei 4,5. Es schmilzt bei über 180°C und ist bei Raumtemperatur kaum flüchtig. (WHO, 1995)



Abbildung 2: Strukturformel von TBBPA

## A.2.3 Anwendung

Etwa 90% des hergestellten TBBPAs wird als reaktives Flammschutzmittel bei der Produktion von Epoxy- und Polycarbonatharzen verwendet. Daraus werden zum Großteil elektronische Leiterplatten, die bis zu 25 Gewichtsprozent Brom enthalten, oder Isolierungen für die Bauindustrie hergestellt. Die restlichen 10% TBBPA werden derivatisiert und als Additive - meist in Kombination mit Antimontrioxid als Synergist - in Kunststoffen eingesetzt. Dimethyl-TBBPA wird mit Acrylnitril-Butadien-Styrol(ABS) oder Polystyrol vermischt. ABS findet sich in Gehäusen von Fernsehern, Computern und Zubehör, Handy, Audio- und Videosystemen wieder. Bis(2-hydroxyethylether)-TBBPA wird in und auf Papier und Textilien verarbeitet. (Arias, 2001)

#### A.2.4 Exposition

Im Boden und in Flusssedimenten degradiert TBBPA unter anaeroben und aeroben Bedingungen mit verschiedenen Zerfallsraten. Die daraus geschätzte Halbwertszeit liegt bei zwei Monaten. Im Wasser zerfällt TBBPA, das lichtsensitiv ist, mit einer jahreszeitabhängigen Halbwertszeit von 6-81 Tagen. Hauptabbauprodukte sind Tribromophenol sowie debromierte und hydroxylierte Bisphenole-A. In japanischen Studien wurde TBBPA in Konzentrationen von bis zu 140 µg/kg bzw. 150 µg/kg in Boden und Sedimenten nachgewiesen. (Birnbaum, 2004 und WHO, 1995)

TBBPA wurde in Klärschlamm mit 50 ng/g Schlamm in Schweden und 192 ng/g in Irland detektiert. (Alaee, 2001; Petterson2001; Morris, 2004) Flussabwärts von einem Kunststoffwerk wurde eine neunfache höhere Konzentration von TBBPA im Sediment gefunden im Vergleich zum Sediment flussaufwärts (270 ng bzw. 34 ng/g Trockengewicht). Die Dimethoxyderivate konzentrierten sich sogar um das 60 fache (1500 ng flussabwärts, 24 ng/g flussaufwärts). (Sellstroem, 1995)

In Sedimenten wird nach Arbeli et al. TBBPA durch Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen zu Bisphenol-A debromiert und unter aeroben Bedingungen mineralisiert. Brenner et al. konnten allerdings beim Nachstellen der Bedingungen im Labor keine Biodegradation durch Mikroorganismen finden. (Arbeli, 2006; Brenner, 2006) TBBPA wurde mit einer Konzentration von bis zu 30 ng / m<sup>3</sup> in Luft von Recyclinganlagen detektiert (Pettersson, 2001; Sjoedin, 2001).

#### A.2.5 Kinetik und innere Exposition

Die humane Exposition wurde in einigen, wenigen Studien weltweit untersucht. Erhöhte Werte wurden bei Mitarbeitern in Recyclinganlagen insbesondere im Prozess des Zerteilens der Elektronikgeräte gefunden. Aus norwegischen Studien geht hervor, dass diese Mitarbeiter bis zu 3,8 ng TBBPA je Gramm Fett im Blutplasma aufwiesen. Zusätzlich zum TBBPA konnte noch bis zu 80 ng des TBBPA-Abbauprodukts 2,4,6-Tribromobisphenol je Gramm Fett detektiert werden. (Hagmar, 2001; Thomsen, 2001) In Japan wurden im Blut Werte von bis zu 12 ng TBBPA pro Gramm Fett gefunden. (Nagayama, 2001) Im Serum von Computertechnikern, die durch ihre Arbeit intensiv mit BFR-behandelten Kunststoffen in Kontakt kommen, wurden bis zu 1,8 ng TBBPA je Gramm Fett gefunden. (Jakobsson, 2002)

#### A.2.6 Metabolismus und Ausscheidung

Die Halbwertszeit beträgt im Fisch weniger als einen Tag und in Austern weniger als 5 Tage. (WHO, 1995) In der Ratte wird hochdosiertes TBBPA nach einfacher oraler Gabe in kürzester Zeit unmetabolisiert zu 51-95% im Fäzes aufgefunden. (Szymanska, 2001) Bei intraperitonealer Gabe verteilen sich TBBPA oder deren Metabolite innerhalb einer Stunde in allen Geweben. Die höchsten Konzentrationen wurden in lipidhaltigen Geweben, wie Fettgewebe, Leber, Ischiasnerven, Muskel und Nebenniere erreicht. Ein kleiner Anteil an TBBPA oder seinen Metaboliten wurde noch nach 72 Stunden im Fettgewebe (3-6%) und Muskeln (11-14%) gefunden, was darauf hindeutet, dass TBBPA oder seine Metaboliten akkumulieren können. (Larsen, 1998; Meerts,1999)

Als Hauptmetabolit wurde im Fäzes Tribromobisphenol A ausgemacht, vermutlich durch Debromierung in der Darmflora verursacht. (Szymanska, 2001) In der Gallenflüssigkeit wurden ein Monoglucuronid, Diglucuronide und ein Glucuronidsulfatester gefunden. Im hepatischen Kreislauf werden diese Konjugate in der Darmflora dekonjugiert und im unteren Darmabschnitt reabsorbiert. Letztendlich führt dies in der Ratte zur Elimination von unkonjugiertem TBBPA. (Larsen, 1998)

#### A.2.7 Wirkungen

Bei Nagern ist erst bei überaus hohen Dosen mit akuter Toxizität zu rechnen. Die LD<sub>50</sub>-Werte (lethale Dosis für 50% der Tiere) liegen bei über 2.000 mg/kg KG (Körpergewicht) in Kaninchen, bei über 500 mg/kg KG in Ratten und bei mehr als 20.000 mg/kg KG in Mäusen. Auch in 28- bzw. 90-Tage-Studien mit bis zu 1.000 mg/kg KG/d bzw. 100 mg/kg KG/d wurden bei Nagern keine Beeinträchtigungen bzgl. Verhalten, Aussehen, Futteraufnahme, Körpergewichtszunahme oder Mortalität festgestellt. Studien zur dermalen Toxizität, Inhalationstoxizität, Teratogenität, Haut- und Augenunverträglichkeit zeigen keine toxischen Wirkungen. (WHO, 1995)

Bei neugeborenen Ratten wurden bei oraler Aufnahme von 200 mg TBBPA / kg KG im Alter von 4-23 Tagen polyzystische Läsionen in der Niere gefunden. (Fukuda, 2004)

Als immunotoxisch *in vitro* zeigt sich TBBPA schon bei 2-3 µM in Milzzellen der Maus durch Inhibition der Expression von CD25, einem essentiellen Faktor zur Proliferation von aktivierten T-Zellen, und in den humanen neutrophilen Granulozyten durch eine Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit einer möglichen Aktivierung der Granulozyten. (Pullen, 2003; Reistad, 2005)

Neurotoxische Effekte *in vitro* wurden in Kleinhirnzellen und in den Synaptosomen aus dem Rattenhirn ausgemacht. Die Aufnahme von Dopamin, Glutamat und γ-Aminobuttersäure (GABA) wird inhibiert und oxidativer Stress induziert. (Mariussen, 2003)

#### A.2.7.1 Endokrine Wirkungen

Einige thyroxin- und östrogenartige Wirkungen wurden *in vitro* aufgezeigt. In MCF-7 Zellen konkurriert TBBPA kaum und sein Metabolit Tribromobisphenol A wenig mit Östrogen, dem endogenen Liganden, bezüglich der Bindung an den Östrogenrezeptor. (Samuelsen, 2001, Meerts 2001, Darnerud 2003) Hydroxylierte Metaboliten von TBBPA können *in vitro* die Östrogensulfotransferase-Akivität inhibieren. *In vivo* könnte dies zu einem erhöhten Östrogenlevel führen. (Kester, 2002)

TBBPA konkurriert *in vitro* mit Thyroxin (T4), dem endogenen Liganden, bezüglich der Bindung an Transthyretin (TTR), wie im kompetitiven T4-TTR-Assay nachgewiesen wurde, jedoch konnte *in vivo* kein Bindungseffekt nachgewiesen werden. (Meerts, 2000) Bei oraler Exposition von schwangeren Ratten an den Gestationstagen (GD) 10-16 konnte im fötalen Plasma, nicht jedoch im Muttertier, ein erhöhter Spiegel an TSH, dem Thyroxinstimulierenden Hormon, aufgefunden werden. (Meerts, 1999) Kitamura et al. zeigten *in vitro*, dass die Bindung von Trijodthyronin (T3) an TTR ebenfalls durch TBBPA im Konzentrationsbereich von 1-100  $\mu$ M gehemmt wird. Dadurch wird die Schildrüsenhormonabhängige Produktion vom Wachstumshormon in der GH3-Zelllinie der Rattenhypophyse induziert, was eine erhöhte Proliferationsrate nach sich zieht. (Kitamura, 2005)

Kitamura et al. konnten durch Reportergenassays in der humanen Brustkrebszellline MCF-7 bzw. in der Fibroblastenzelllinie der Maus NIH3T3 eine östrogene ( $EC_{50}$ = 19 µM) und antiandrogene ( $IC_{50}$ >1 mM) Wirkung von TBBPA in hohen Konzentrationsbereichen nachweisen. Im Uterotrophic Assay in Mäusen zeigte sich über drei Tage bereits ab einer Dosis von 20 mg TBBPA je Kilogramm Körpergewicht eine östrogene Wirkung durch Zunahme des Uterusgewichts im Vergleich zur Kontrolle. (Kitamura, 2005b) TBBPA kann in primären Hepatozyten die Aktivität vom Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) inhibieren und die Mitochondrien zerstören. Boecker et al. erklären, dass TBBPA vermutlich die oxidative Phoshporylierung mindert. (Boecker, 2001)

## A.3 HBCD

#### A.3.1 Chemische Charakterisierung

Die empirische Formel für die drei Diastereomere des Hexabromocyclododecan (HBCD)  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -HBCD lautet C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>Br<sub>6</sub>. Für jedes der  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Diastereomere existieren zwei Enantiomere. Die Strukturformeln der Enantiomerenpaare sind in Abbildung 3 dargestellt. HBCD ist wenig wasserlöslich und lipophiler als TBBPA. Der K<sub>ow</sub>-Wert liegt bei 5,6. Es schmilzt bei über 180°C und ist bei Raumtemperatur kaum flüchtig. Über 260°C degradiert HBCD. (Cousins, 2003)



Abbildung 3: Strukturformeln von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -HBCD

## A.3.2 Herstellung

Technisches HBCD wird durch Addition von Brom an cis-trans-trans-1,5,9-Cyclododecatrien hergestellt. Dabei entstehen abhängig vom Reaktionsprozess verschiedene technische Gemische mit  $\gamma$ -HBCD als Hauptbestandteil (75-89%),  $\alpha$ -HBCD (10-13%),  $\beta$ -HBCD(<0.5-12%) und Tetrabromocyclododecan (<4%) als Verunreinigung. Die Isomerenverteilung eines technischen Gemisches mit dem Hauptbestandteil  $\gamma$ -HBCD kehrt sich beim Erhitzen über 160°C um zu 78%  $\alpha$ -, 13%  $\beta$ - und 9%  $\gamma$ -HBCD. Die Halbwertszeit beträgt im Wasser 2-25 Tage und in der Luft drei Tage. (Becher, 2005; Tomy, 2004)

## A.3.3 Anwendung

In Europa werden mehr als die Hälfte des weltweit produzierten HBCD eingesetzt, da es nach der Minderung des Verbrauchs von bestimmten PBDEs in Europa diese in einigen Polymeren ersetzt. Hier ist, gemessen an der Nachfrage, HBCD mit 9.500 Tonnen im Jahre 2001 das zweitwichtigste BFR nach TBBPA geworden. In Japan werden 2.200 Tonnen und somit mehr als die Hälfte der in Asien verbrauchten Menge an HBCD nachgefragt, was wiederum mit den Absichten der Exekutive zur Reduktion von bestimmten PBDEs in Zusammenhang gebracht werden kann. (BSEF, 2001)

HBCD wird als Additiv hauptsächlich in Polystyrol-Schäume (EPS, XPS), meist mit dem Synergisten Dicumylperoxid eingearbeitet. Diese vorbehandelten Kunststoffe werden insbesondere im Baugewerbe als Wärmedämmung eingesetzt. In geringerer Menge wird HBCD meist in Kombination mit Antimontrioxid auf Textilien, wie z.B. Sofas und Bürostühle, aufgebracht. Momentan wird sehr wenig HBCD in HIPS (High Impact Polystyrol) eingearbeitet. Dieser Kunststoff wird im Elektronik- und Elektrotechnikbereich, z.B. für Audiound Videosysteme, benötigt. (BSEF, 2003). Für eine flammhemmende Wirkung muss nur wenig HBCD in die jeweiligen Kunststoffe eingesetzt werden, um eine relativ hohe Schutzwirkung zu erhalten. Für EPS beträgt die Füllmenge meist ein, teilweise bis zu drei Prozent, für HIPS bis zu vier Gewichtsprozente. (BSEF, 2001; Leisewitz, 2001)

## A.3.4 Exposition

HBCD wurde in verschiedenen Kompartimenten nachgewiesen, wie in den nachfolgenden Absätzen detaillierter dargestellt werden soll.

#### A.3.4.1 Sedimente

HBCD wurde in Süß- und Salzwasser auf verschiedenen Kontinenten detektiert. Die Konzentration nahm in der Nähe von Kunststoff- und Textilfabriken, wo HBCD eingesetzt wird, zu. Entlang eines schwedischen Flusses mit mehreren Textilfabriken erhöhte sich die Konzentration im Klärschlamm von HBCD von nicht detektierbar auf bis zu 1,6 µg je Gramm Trockengewicht. (de Wit, 2001) Eine holländische Gruppe zeigte, dass in Sedimenten von Salzwasser in der Nähe von Flussmündungen höhere Gehalte an HBCD (6,9 µg/kg Trockengewicht) zu verzeichnen sind als einige Kilometer von der Küste entfernt (<1 µg/kg Trockengewicht). (Klamer, 2005) In einer europäischen Vergleichsstudie wies Klärschlamm in Irland sogar eine Konzentration von 9,1 mg HBCD pro Kilogramm Trockengewicht auf (Morris, 2004)

#### A.3.4.2 Luft

In einigen amerikanischen Großstädten ermittelten Hoh et al. HBCD-Konzentration in der Luft von bis zu 11 pg je Kubikmeter, allerdings lagen die Mittelwerte bei maximal 4 pg/m3. (Hoh, 2005)

Schwedische Luftproben wiesen einen Gehalt von 5,3-6,1 pg HBCD je Kubikmeter Luft auf. (de Wit, 2001) In einigen Parlamentsgebäuden Europas, wo Möbel mit flammschutzhemmenden Eigenschaften und viele Computer mit Zubehör vorhanden sind, sowie in Firmen, die als Internetprovider fungieren, wurden in Staub HBCD und PBDEs analysiert. Der Gehalt an HBCD reichte von unter 3 bis zu 1400 µg je Kilogramm Staub. Eine orale und dermale Exposition des Menschen ist zu erwarten. (Leonards, 2001)

## A.3.5 Tier

HBCD wurde in mehreren Gewässertieren gefunden. Dabei konnte zumeist gezeigt werden, dass die Exposition flussabwärts von Kunststoff- und Textilfabriken, bzw. an Meeresmündungen erhöhte Werte aufwies. (de Wit, 2001; Stapleton 2006) In Tabelle 2 sind Expositionsmessungen in einigen Tieren und deren Fundorte aufgelistet. Generell wurden in Europa höhere Konzentrationen gefunden als in Amerika, was durch die starke europäische Nachfrage nach HBCD erklärt werden kann.

Trendanalysen in Seelöwentran (Stapleton, 2003) in Kalifornien und in Eiern von Seetauchern aus der Ostsee (Sellström, 2003) zeigen eine steigende Belastung von HBCD über die letzten 10 bzw. 30 Jahre hinweg mit einer jährlichen Rate von ca. 3% Wachstum. Hingegen konnte eine Analyse in Eiern von Wanderfalken in Grönland diesen Trend nicht bestätigen. (Vorkamp, 2005)

h		1	
Probe	Gehalt an HBCD	Ort	Referenz
	a=je Gramm Fett	1	
	b= je Gramm Nassmasse		
Wanderfalkeneier	34-2400 ng <sup>(a)</sup>	Schweden	de Wit, 2001
Wanderfalkeneier	<0,1-230 ng <sup>(a)</sup>	Südgrönland	Vorkamp, 2005
Wanderfalkeneier	79-2400 ng <sup>(a)</sup>	Südwestschweden	Vorkamp, 2005
Wanderfalkeneier	34-590 ng <sup>(a)</sup>	Nordschweden	Vorkamp, 2005
Alkeier	64-220 ng <sup>(a)</sup>	Ostsee	Sellström, 2003
erwachsener Alk	65 ng <sup>(a)</sup>	Ostsee	Lundstedt-Enkel, 2005
Möwe	0,07-1,24 ng <sup>(b)</sup>	norwegische Arktik	Verreault, 2005
Meerschwalbeneier	0,3-7,1 μg <sup>(a)</sup>	Nordsee	Morris, 2004
Seestern	769 ng <sup>(a)</sup>	Nordsee (UK)	Morris, 2004
Delphin (frischer Tran)	90 ng <sup>(a)</sup>	Japanische Küstengewässer	Marsh, 2005
Delphin (gekochte Leber)	130 ng <sup>(a)</sup>	Japanische Küstengewässer	Marsh, 2005
gestrandeter Wal (zerrissener Speck)	25 ng <sup>(a)</sup>	Japanische Küstengewässer	Marsh, 2005
jugendliche Kegelrobbe	16-177 ng <sup>(a)</sup>	Ostsee	Roos, 2001
Seelöwentran	<0,4-96 ng <sup>(a)</sup>	Kalifornien	Stapleton, 2005
Barbenleber	nd-1172 ng <sup>(b)</sup>	Cinca (Fluss in Spanien)	Eljarrat, 2004
Laube (Karpfenfisch)	nd bis 1643 ng $^{(b)}$	Cinca (Fluss in Spanien)	Eljarrat, 2005
Zwergwal (frischer Tran)	57 ng <sup>(a)</sup>	Japanische Küstengewässer	Marsh, 2005
Kleiner Tümmler (Tran)	6800 ng	Nordsee	Marsh, 2005
Großer Tümmler (geschnittener Speck)	260 ng <sup>(a)</sup>	Japanische Küstengewässer	Marsh, 2005
Kormoran (Leber)	1319 ng <sup>(a)</sup>	United Kingdom	Morris, 2004
Aal	359 ng <sup>(a)</sup>	Tiel (Fluss in Niederlande)	Morris, 2004
Kabeljauleber	50 ng	Nordsee	Morris, 2004
Schweinswaltran	1018 ng <sup>(a)</sup>	Nordsee(UK)	Morris, 2004
Hecht	nd-8'000 ng <sup>(a)</sup>	Viskan (Fluss in Schweden)	de Wit, 2001
Hering	4,9-9,8 ng	nördliche Ostsee	Nyland, 2001
Hering	36 ng <sup>(a)</sup>	südliche Ostsee	Nyland, 2001

Tabelle 2: Expositionsdaten für HBCD in Tieren

#### A.3.6 Biomagnifikation

In der Isomerenverteilung treten im Gegensatz zur industriellen Produktion mit  $\gamma$ -HBCD als Hauptvertreter entscheidende Unterschiede in der abiotischen und biotischen Umwelt auf. Während sich die HBCD-Isomere in den Luft- und Klärschlammproben je nach Region unterschiedlich verteilen, dominiert  $\alpha$  -HBCD in Seelöwentran, Schweinswalen, Aalen, Kormoranen und Delphinen. (Tomy, 2004; Stapleton, 2006; Zegers, 2005; Birnbaum, 2004; Morris, 2004) Zegers et al. leiten aus *in vitro* Metabolismusstudien in Lebermikrosomen aus Seehunden ab, dass  $\alpha$ -HBCD resistenter gegen eine P450-abhängige Biotransformation ist als  $\beta$ -und  $\gamma$ -HBCD. (Zegers, 2005)

Der Akkumulationsfaktor Biota zu Sediment wurde mit etwa 15 berechnet. (Sellstroem 1998) Nordamerikanische Untersuchungen in verschiedenen Spezies in den Großen Seen und holländische in der Nordsee erklärten eine Anreicherung von HBCD über die Nahrungskette. Geschlussfolgert wurde dabei, dass HBCD in fettreichen Geweben akkumuliert. (Tomy, 2004)

### A.3.7 Mensch

Bei einer Studie mit 30 Frauen in Kanada wurden Konzentrationen an HBCD von 0-126 ng/g Fett in der Muttermilch gemessen. (Ryan, 2002) Weitere Studien in Europa zeigen Konzentrationen in Muttermilch und Serum von bis zu 20 ng/g Fett, wobei der Median der untersuchten Proben jeweils im Bereich von ca. 0,3-1,7 ng/g Fett lag. Die Exposition von HBCD beim Menschen erfolgt nach Covaci vermutlich über Luft, inklusive Staub, und die Nahrung. Fisch ist dabei die Hauptaufnahmequelle. Berechnet wurde eine tägliche Aufnahmemenge von etwa 140 ng HBCD. (Covaci, 2006)

#### A.3.8 Metabolismus und Ausscheidung

Nach Industriedaten wird HBCD nach einmaliger oraler Exposition in der Ratte mit einer kurzen Halbwertszeit von zwei Stunden metabolisiert und ausgeschieden. Innerhalb von 72h waren 16% der exponierten Dosis im Urin und 72% im Fäzes nachweisbar. Vier Metabolite unbekannter Struktur wurden gefunden. HBCD wurde in jedem der untersuchten Organe, mit den höchsten Werten in Fettgewebe, Leber, Niere, Lunge und Keimdrüsen nachgewiesen. Ähnliche Resultate waren in einer zweiten Studie eines Herstellers mit einer einmaligen Exposition von 7-9 mg/kg KG gezeigt worden. Im Gegensatz dazu wurden in zwei anderen Studien mit fünftägiger oraler Exposition von 500 mg/kg KG weder HBCD noch ein Metabolit davon im Urin gefunden. Im Fäzes konnten 32-35% der verabreichten Dosis HBCD detektiert werden. HBCD war nur im Fettgewebe, nicht jedoch in Milz, Pankreas, Leber oder Herz nachweisbar. (Hakk, 2003)

#### A.3.9 Wirkung

HBCD wurde bisher nicht als genotoxisch, kanzerogen oder reprotoxisch beschrieben. Der LD<sub>50</sub>-Wert für eine orale Aufnahme ist mit über 6.400 mg/kg KG in Mäusen und mit 10.000

mg/kg KG in Ratten angegeben. In einer 28-Tage-Studie konnte bei überaus hohen Konzentrationen (2.500 mg/kg KG) eine Verminderung der Oogenese beobachtet werden. (BAUA, 2001; Darnerud, 2003)

Es existieren nur wenige toxikologische Daten für den Menschen. In einer Hautstudie mit 10% technischem Gemisch auf der Haut wurden keine dermalen Irritationen beobachtet, in anderen Studien wurde HBCD als leicht irritierend eingestuft. (National Research Council, 2000)

In Mäusen kann HBCD bei neonataler Exposition (0,9 mg/kg KG) Verhaltensstörungen, Lernund Gedächtnisschwächen verursachen und die Anzahl der Nikotinrezeptoren verringern. Exposition von HBCD und PCBs im Gemisch verstärkt diese Effekte über die Einzelkomponenten hinaus. (Eriksson, 2002) Auch *in vitro* Studien verweisen auf das neurotoxische Potential von HBCD, zumindest am Nager. Die Aufnahme von Dopamin in Synaptosomen aus der Ratte wird inhibiert ( $IC_{50}$ =4 µM), die von Glutamat bis zu 50%. Der LD<sub>50</sub> (lethale Dosis) liegt für Kleinhirnzellen bei 3 µM. (Reistad, 2006; Mariussen, 2003) Einer *in vitro* Studie in HeLa-Zellen ist zu entnehmen, dass eine über den Thyroidhormonrezeptor und T3 vermittelte Induktion in Gegenwart von 3 µM HBCD erhöht wird. (Darnerud, 2003) In Ratten konnte bei Dosen von 100 mg/kg KG ein verminderter T4-Level im Blut, eine Schilddrüsenhyperplasie und Erhöhung des Lebergewichts jeweils als reversible Veränderungen ausgemacht werden. (IUCLID-Albemarle, 2005) In Fischstudien inhibiert HBCD als Antagonist die CYP1A-Aktivität und induziert die Katalase-Aktivität. (Ronisz, 2004)

#### A.4 PBDEs

#### A.4.1 Chemische Charakterisierung

Die empirische Formel für die Gruppe der PBDEs mit 209 Kongeneren lautet C<sub>12</sub>H<sub>(10-z)</sub>Br<sub>z</sub>O. Die Strukturformel der über eine Etherbrücke verbundenen Benzolringe mit ihren in ortho-, meta- und / oder para-Position substituierten Bromatomen ist in Abbildung 4 dargestellt. Die 209 Kongenere sind aufsteigend nach ihrer Anzahl und Stellung der Bromsubstitute nummeriert, beginnend mit BDE-1 und seinem einzigen Bromatom in ortho-Position. Maximal können zehn Bromatome substituiert werden, was zum DecaBDE bzw. BDE-209 führt. Eine Liste mit allen Kongeneren geordnet nach deren Nummerierung befindet sich im Anhang. Die PBDEs unterscheiden sich aufgrund ihrer strukturellen Diversifikationen auch in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften. Die Fettlöslichkeit variert mit logK<sub>ow</sub>-Werten von 4-10, wobei die höher bromierten PBDEs tendenziell lipophiler sind. Die Schmelztemperatur liegt bei 80°C für BDE-47, einem TetraBDE, und 300°C für das DecaBDE. Alle Kongenere sind schwer flüchtig, einige liegen bei Raumtemperatur als Öle vor. Der Dampfdruck liegt, wiederum abhängig von der Bromsubstitution, im Bereich von 20 µPa und 20 mPa. (Petterson, 2001) DecaBDE wurde als lichtsensitiv nachgewiesen. Bei Bestrahlung mit UV-Licht degradiert es zu niedrig bromierten PBDEs. (Sjödin, 1998)



Abbildung 4: Strukturformel von PBDEs

## A.4.2 Herstellung

Einige PBDEs werden explizit für den Flammschutz hergestellt. Dazu gehören die technischen Gemische Pentamix, Octamix und Decamix. Durch elektophile Substitution von Brom an Diphenylethern entstehen abhängig von den jeweiligen Friedel-Crafts-Katalysatoren, Temperatureinstellungen und Bromäquivalenten die einzelnen Kongenere bzw. Kongenerengemische. Das technische DecaBDE-Gemisch enthält mehr als 97% DecaBDE. Das technische PentaBDE-Gemisch besteht aus den Hauptkomponenten von TetraBDEs, PentaBDEs und HexaBDEs mit je nach Herstellung variablen Anteilen. Der technische Octamix enthält hauptsächlich HexaBDEs, HeptaBDEs, OctaBDEs und NonaBDEs.

Tabelle 3 zeigt beispielhaft die Kongenerenverteilung einiger industriell hergestellter PBDE-Gemische. (WHO, 1994; EPA, 2006; la Guardia, 2006)

	kommerzielle Produkte (Hersteller)	Bestandteile (Kongenere)
Pentamix	DE-71 (Great Lakes Chemicals) Bromkal 70-5DE (Chemische Fabrik Kalk)	0-1% triBDEs (17,28,33) 24-38% tetraBDEs (47,49,51,66) 50-62% pentaBDEs (85, 99,100,102) 4-12% hexaBDEs (138,139,140,153,154) 0-0,3% heptaBDEs (183,184)
Octamix	DE-79 (Great Lakes Chemicals) Bromkal 79-8DE (Chemische Fabrik Kalk)	0,5% pentaBDEs 12% hexaBDEs (138,144,153,154) 45% heptaBDEs (171,180,183) 33% octaBDEs (196,197,201,203) 10% nonaBDEs (206,207,208) 0,7% decaBDE
Decamix	DE-83R (Great Lakes Chemicals) Bromkal 82-0DE (Chemische Fabrik Kalk) Saytex-102 (Albemarle Corp.) FR-1210 (Dead Sea Bromine Group)	0-1% octaBDEs (196,197,203) 0,3-10% nonaBDEs (206,207,208) 92-99% decaBDEs

Tabelle 3: Z	usammensetzung der PBDEs in kommerziel	len Gemischen

Kunststoffe	Pentamix	Octamix	Decamix
ABS (AcryInitril-Butadien-Styrol)		Х	
Epoxy-Harze			Х
Phenolische Harze	х		Х
PAN (Polyacrylnitril)			Х
PA (Polyamid)		Х	Х
PBT (Polybuthylenterephthalat)		х	Х
PE / XPE (Polyethen)			Х
PET (Polyethylenterephthalat)			Х
PP (Polypropylen)			Х
PS, HIPS (Polystyrol)		х	Х
PVC (Polyvinylchlorid)	Х		Х
PUR (Polyurethan)	х		
UPE (Ungesättigte Polyester)	х		Х
Gummi	х		Х
Lacke / Farben	х		Х
Textilien	Х		Х

Tabelle 4: Einsatz von PBDEs in diverse Kunststoffe

## A.4.3 Anwendung

PBDEs werden additiv und in der Regel in Kombination mit einem anderen flammschutzhemmenden Mittel, wie z.B. Antimontrioxid, in die Kunststoffe eingearbeitet. (Leisewitz, 2001) Tabelle 4 gibt Aufschluss über die Einsatzmöglichkeiten in den verschiedenen Kunststoffen. (BSEF, 2001) Die mengenmäßig wichtigsten Kunststoffe für die Einbringung von PBDEs sind HIPS und ABS, die in Audio- und Videosystemen eingesetzt werden, bzw. letzteres auch für die Gehäuse von Computer und Zubehör. Polyurethanschäume finden Anwendung u.a. in der Möbelbepolsterung, in Matratzen, aber ebenso im Baugewerbe und im Energiemanagement zur Isolation. Polyethylen wird zur Kabelisolierung und Epoxy-Harze für Leiterplatten, z.B. im Computer genutzt. Ein Großteil des Verbrauchs an PBDEs deckt sich mit dem Einsatz in diese Kunststoffe. (WHO, 1994)

#### A.4.4 Exposition

Die Verteilung von PBDEs in der Umwelt ist erstmals 1979 in den USA bei der Analyse von Boden- und Schlammproben und 1981 in Schweden bei Fischanalysen bekannt geworden. (Strandberg, 2001). Seither wurden die anthropogenen Kongenere in einer Vielzahl von Umweltkompartimenten, Säugern und im Menschen detektiert. Die über die nächsten Seiten fortlaufende Tabelle 5 soll einen Ausschnitt aus den weltweit verfügbaren Expositionsdaten zeigen. In den anschliessenden Abschnitten wird auf spezielle Eigenheiten bei der Verteilung in den jeweiligen Kompartimenten eingegangen.

#### A.4.4.1 Luft

In der Luft verteilen sich die einzelnen Kongenere in gasförmiger und Partikel-Phase abhängig von ihrem Dampfdruck, was im Zusammenhang mit dem Bromierungsgrad steht. In der gasförmigen Phase der Luft, so konnten Strandberg et al. zeigen, sind etwa 80% der tetrabromierten und 20% der hexabromierten Homologe verteilt, während sich umgekehrt 30% der tetabromierten und 70% der hexabromierten Homologe in der Partikelphase befinden. BDE-209 wurde nur in der Partikelphase ausgemacht. Zusammengenommen tritt als Hauptkongener mit ca. 50% BDE-47 zu tage, gefolgt von BDE-99. (Strandberg, 2001)

Durch die globalen Luftströme, vermehrt der Gasphase, kommt es auch zu einer Kontamination in Gebieten fernab von Entstehung oder Verarbeitung von PBDEs. Selbst in arktischer Luft konnten PBDEs detektiert werden, siehe Tabelle 5. In Großstädten sind tendenziell höhere Konzentrationen zu finden, als in ländlichen Gebieten. (Strandberg, 2001; Dodder, 2000) Auch ist die Konzentration in Raumluft, insbesondere in Büroräumen größer als in der Außenluft. (Birnbaum, 2006) So konnten 6,9 µg BDE-209 je Gramm Staub in Büros von italienischen Parlamentsgebäuden nachgewiesen werden. (Leonhards, 2001) Auf dem amerikanischen Kontinent wurden im Schnitt höhere Konzentrationen an PBDEs im Staub detektiert als in Europa und Japan, was im Zusammenhang mit vermehrtem Einsatz der Industriegemische in Amerika zu sehen ist. (Sjodin, 2006)

#### A.4.4.2 Sedimente

PBDEs wurden in Sedimenten von Gewässern, Klärschlamm und auch im Oberflächenwasser nachgewiesen. Hohe Konzentrationen von 1,3 µg der BDEs 47,95 und 99 je Gramm Trockengewicht Sediment wurden in Flusssedimenten flußabwärts eines ehemaligen PBDE-Produzenten in Großbritannien gefunden. (Allchin, 1999) Stärkere Kontaminationen an PBDEs konnten mit Produzenten oder Industriezweigen, wo PBDEs eingesetzt werden, in Verbindung gebracht werden, wie z.B. in den Großen Seen in Amerika oder in der Mündung des Scheldtflusses bei Antwerpen in Europa. (Stapleton, 2003; Covaci, 2002) Vom PBDE-Einsatz oder der Produktion weiter entfernt gelegenere Gebiete zeigten geringere Konzentrationen mit bis unter 1 ng je Gramm Trockengewicht auf, wie z.B. auch in dänischen Süßwasserproben. (Christensen, 2001)

Die Verteilung der Kongenere ähnelt der in den Produktionsgemischen der nächstgelegenen Verursacherquelle. Dodder et al. berechneten einen Verteilungsquotienten für BDE-99 zu BDE-100 von etwa 80:20 für Sedimente in den USA, was dem industriellen Bromkal 70-5DE, einem Pentamix, entspricht. (Dodder, 2000) Christensen et al. in Dänemark bestätigten den Verteilungsschlüssel, wiesen aber nach, dass sich die Menge an BDE-47 im Vergleich zu BDE-99 und BDE-100 verringert. Dies wird auf eine vermehrte Aufnahme von BDE-47 in die biotische Umwelt zurückgeführt. (Christensen, 2001; Christensen, 2002)

## A.4.5 Tier

Untersuchungsvergleiche von Meerwasser, Sedimenten und Meerestieren lassen auf eine hohe Aufnahme, Bioakkumulation oder Biodegradationsunterschieden von PBDEs, insbesondere einiger Kongenere schließen. Der Verteilungskoeffizient BDE-99 zu BDE-100 beträgt in den Lebewesen nur noch etwa 30:70. (Christensen, 2002) BDE-47, BDE-99 und BDE-100 machen etwa 90% der Gesamtmenge an PBDEs in aquatischen Organismen aus. (Christensen, 2002; Ramu, 2007) BDE-47 ist mit ca. 60% der Gesamtmenge der Hauptvertreter im biotischen System, während im technischen Gemisch der Anteil nicht über 40% hinausgeht. Bei weiterem Aufsteigen in der Nahrungskette werden sogar Werte von über 90% erreicht. (Christensen, 2002)

Mehrere Arbeiten, wie die von Ikonomou et al., beschreiben ausführlich und beispielhaft Verteilungen einzelner Kongenere abhängig von dem Fundort, der Fundzeit, der Spezies und der Stufe in der Nahrungskette. Dabei wurde auch BDE-49 als ein Hauptkongener (ca. 20%) in Krabben gefunden (0,72-77 ng/g Fett) und lag damit in dieser Spezies bis auf BDE- 47 noch weit vor den Hauptbestandteilen des PentaBDE-Gemisches. (Ikonomou, 2002) BDE-209 aus dem DecaBDE-Gemisch ist im Vergleich zur großen Produktionsmenge im Organismus - wenn überhaupt nachgewiesen - mit wenigen Prozent am PBDE-Gesamtgehalt stark unterrepräsentiert. (Dodder, 2002) Dies lässt sich einerseits mit einer geringen Aufnahme, aber auch mit der Metabolisierung von höherbromierten PBDEs zu geringer bromierten Kongeneren und / oder Methoxymetaboliten bzw. Hydroxymetaboliten erklären. (Tomy, 2004; EPA, 2006) Bei Wanderfalken ist die Debromierung zu geringer bromierten Kongeneren weniger ausgeprägt, sodass deren Eier eine höhere Konzentration an höher bromierten PBDEs, wie BDE-99 und BDE-153, im Vergleich zu anderen Vogeleiern und im Vergleich zu BDE-47 aufweisen. (Herzke, 2003; Sellstroem, 2003)

Untersuchungen in den Großen Seen Nordamerikas und an der Nordseeküste bestätigen den Trend der anderen Umweltkompartimente, sodass in Wasserlebewesen in entfernteren Gebieten von industriellen PBDE-Quellen die Konzentration an PBDEs abnimmt. Beispielsweise wurde in der Schwimmkrabbe in der belgischen Nordseeküste etwa 1 ng Gesamt-PBDE je Gramm Nassmasse und in der belgischen Scheldtmündung mit seinen flussaufwärts gelegenen PBDE-verwendenden Industriezweigen knapp die 30 fache Menge detektiert. (Voorspoels, 2002; Dodder, 2000).

Bei Hering und Sprotte steigt die PBDE-Belastung mit dem Alter. (Darnerud, 2001)

#### A.4.6 Nahrungskette

In Studien über die Anreicherung von PBDEs über die Nahrungskette konnten Stapleton et al. in den Großen Seen Nordamerikas und Gandhi et al. in einem norwegischen See nachweisen und berechnen, dass sich einige PBDE-Kongenere in den Organismen über mehrere Stufen in der Nahrungskette anreichern, bzw. im Falle von BDE-47 sich die Konzentrationen in der trophischen Reihe auch durch eine Bioformation aus höher bromierten Kongeneren erhöhen. (Stapleton, 2003; Gandhi, 2006). Die Anreicherung erfolgt bei tetra- und pentabromierten Kongeneren etwa gleich stark, während tri- und hexabromierte Kongenere eine geringere Anreichung über die Nahrungskette erfahren. (Darnerud, 2001) Die Bioakkumulation wurde ebenso in Lachsfarmen mit PBDE-haltigem Futter genährten Lachsen beobachtet (Jacobs, 2002)

Analysen von Tiermaterial über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten zeigen eine wachsende Belastung im Weißwal und der Ringelrobbe aus der kanadischen Arktik (1982-2001), in Eiern von Silbermöwen und der Seeforelle in den Großen Seen(1978-1998) und in Eiern von Seetauchern in der Ostsee (1969–2000). Bis 1990 hat sich innerhalb von 5 Jahren

die Konzentration an Gesamt-PBDE verdoppelt. Allerdings scheint das exponentielle Wachstum später gedämmt und bei nichtarktischen Lebewesen sogar teilweise umgekehrt worden zu sein. (Law, 2003)

Studien in den Großen Seen Nordamerikas zeigten bis zu 300 fache Konzentrationsanstiege in Seeforellen (3 ng vs. 945 ng/g Fett) und 60 fache Anstiege in Eiern von Silbermöwen 9 ng vs. 509 ng/g Nassgewicht) über einen Zeitraum von zwei Dekaden. (Moisey, 2001; Luross, 2000) Arktische Lebewesen werden voraussichtlich erst in einigen Jahren einen Rückgang der PBDE-Konzentration erfahren. Für Eier von Trottellummen in der schwedischen Ostsee wurde der Wachstumspeak für PBDEs - im Gegensatz zu HBCD - bereits Ende der 80er Jahre überschritten. Die nachfolgende Verringerung der Konzentration in diesen Eiern ist sicherlich auf die verringerte industrielle Produktion und Verwendung vom PentaBDE-Gemisch in Europa zurückzuführen. (Law, 2003; Sellstroem, 2003)

#### A.4.7 Mensch

PBDEs wurden in Muttermilch, Fettgewebe und Blutproben detektiert. Hierbei zeigten sich starke globale Unterschiede in der Höhe der Belastung, wie auch in der Zusammenstellung der Kongenere. In den USA und Kanada wurden die höchsten PBDE-Konzentrationen in Muttermilch mit bis zu 600 ng je Gramm Fett gefunden. (Schechter, 2003; Ryan, 2002) In Europa, Asien und Australien liegen die Konzentrationen in Muttermilch mit Medianen und Mittelwerten der untersuchten Proben von unter einem bis etwa zwölf Nanogramm je Gramm Fett um etwa um ein bis zwei Zehnerpotenzen unter denen der US-amerikanischen Daten. (Tanabe, 2005; Harden, 2005; Meironyte, 1998) Die gleichen Verhältnisse sind im Fettgewebe und Serum zu finden. (Schecter, 2003; Meironyte, 2001; Sjödin, 2001; Petreas, 2003) Für Schweden publizierten Meironyte et al. 4-8 ng und 5-18 ng je Gramm Fett im Fettgewebe und in der Leber. (Meironyte, 2001) In deutschen Blutproben wurden durchschnittlich 5 ng je Gramm Fett detektiert. (Schröter-Kermani, 2002) PBDEs sind in gleichem Ausmaße im fötalen Blut wie im Blut der Mutter zu finden. (Mazdai, 2003)

Die recht große Streuung von bis zu zwei Zehnerpotenzen in den Belastungen der einzelnen Individuen der verschiedenen Studien wurde anders als bei anderen persistenten Substanzen, wie PCBs, bisher nicht durch ethnische oder Altersunterschiede bei Erwachsenen erklärt. (Schecter, 2003; Sjodin, 2006; Thomsen, 2002) Einzig She et al. deuten aus ihren Untersuchungen an Brustfettgewebe eine leichte inverse Relation zum Alter. (She, 2002) Expositionen durch Arbeitsplatzbelastungen zeigen ebenso nur marginale Unterschiede. (Sjoedin, 2006; Chang, 2005)

Einleitung

Signifikante Unterschiede ergeben sich durch die Ernährungsweise. Eine deutliche Erhöhung des PBDE-Levels im Serum weisen im Vergleich zu Erwachsenen Säuglinge und Kleinkinder auf. Durch das Trinken der belasteten Muttermilch werden weitaus höhere Dosen oral zugeführt als beim Erwachsenen. (Chang, 2005; Thomsen, 2002; Schecter, 2006, Zuurbier, 2006) Prädestiniert für erhöhte Dosen an PBDEs sind Nichtvegetarier im Vergleich zu Vegetariern (Paepke, 2006; Raab, 2007) und erhöhter Fischkonsum (Chang, 2005; Sjödin, 2003; Ohta, 2002). In Kalkulationen für die Exposition über die Nahrung berechneten Voorspoels et al. in Belgien, Ryan et al in Kanada und Sjödin et al. in Schweden unabhängig voneinander eine tägliche Aufnahme von 23-48 ng, was sich zu 40% bzw. 50% auf Fisch und Fischprodukte, 30% auf Fleischprodukte und zu weniger als 30% auf Milch- und Eiprodukte verteilt. (Voorspoels, 2007; Sjödin, 2003; Ryan, 2001) Auf dem USamerikanischen Markt scheint die Aufnahme von täglich etwa 1-2 ng PBDEs pro Kilogramm Körpergewicht vordergründig durch Fleischprodukte zu erfolgen. Nachrangig erscheinen zu gleichen Teilen Fisch und Milchprodukte. (Schecter, 2006) Bei Säuglingen liegt die tägliche Aufnahme bei ca.150 ng PBDE je Kilogramm Körpergewicht in den USA und 20 ng in Taiwan (Schecter, 2006; Chao, 2007)

Konträr zeigten Darnerud et al. keine Korrelation für den human PBDE-Level mit dem Fischkonsum. (Darnerud, 2001) Aus einigen, aber nicht allen Studien darüber geht hervor, dass Frauen eine geringere Belastung an PBDEs aufweisen als Männer, was teilweise mit einer geringeren Exposition über die Nahrung begründet wird bzw. auf eine stärkere Exkretion durch das Stillen. (Chang, 2005; Paepke, 2006; Schecter, 2006; Thomsen, 2002) Allein die Nahrung scheint aber die humane Exposition nicht erklären zu können. Wu et al. zeigten eine starke Korrelation der PBDE-Konzentrationen in Muttermilch mit den gemessenen Konzentrationen im Hausstaub der betroffenen Mütter. (Wu, 2007) Einhergehend mit den Daten für Expositionsverläufe in Tieren stieg im Laufe der letzten Jahrzehnte die humane Belastung von PBDEs, wie in Amerika und Europa gezeigt wurde, exponentiell. In Schweden wurde ab Mitte der 1990er und in Norwegen Ende der 1990er eine Reduktion der Belastung festgestellt, begründet mit dem Rückgang der industriellen Verarbeitung von PBDEs. Bis dahin wurden Verdopplungszeiten von etwa 5 Jahren berechnet. (Thomsen, 2002; Thomsen, 2007; Schecter, 2005; Meironyte, 1999)

In den humanen Proben wurden als Hauptkongenere BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154 und BDE-209 detektiert, die auch Bestandteile der kommerziellen Produkte Penta-, Octa- bzw. DecaBDE-Gemisch sind. Innerhalb der Kongenere des PentaBDE-Gemisches machte BDE-47 im Menschen meist 40-60% des Gesamtgehaltes aus, gefolgt von BDE-99 in Amerika und BDE-153 in Europa und Asien. (Schecter, 2005; Paepke, 2006). Im

Zeitverlauf über die letzten beiden Dekaden stieg der Anteil an BDE-153 am Gesamtgehalt PBDEs. In einigen neueren Proben überflügelte BDE-153 den Gehalt von BDE-47. (Thomsen, 2007) Beim Heranziehen der kongeneren Aufnahme aus der Nahrung, fällt auf, dass in Fisch- und Milchprodukten BDE-47 dominiert und in Fleischprodukten BDE-99. (Hites, 2004; Ohta, 2002; Schecter, 2004; Huwe, 2002)

BDE-209 wurde in humanen Proben, wenn überhaupt, nur in geringen Konzentrationen gefunden. In den stark belasteten Proben Nordamerikas trägt es nur zu einem geringen Prozentsatz zum Gesamt-PBDE-Gehalt bei, während es in den weniger belasteten Proben Europas und Asiens teilweise sogar als Hauptkongener detektiert wurde. (Schecter, 2003)

Beim Vergleich von Blut und Muttermilch fällt auf, dass die niedriger bromierten Kongenere in der Muttermilch mit einer bis zu anderthalbfach höheren Konzentration (bezogen auf den Fettgehalt) auftauchen als im Blut. Für die höher bromierten Kongenere zeigt sich umgekehrtes. (Paepke, 2006)

#### A.4.8 Toxikokinetik

PBDEs verteilen sich nach oraler Aufnahme in den fetthaltigeren Organen des Körpers, was mehrere Studien an Ratten und Mäusen belegen. Insbesondere waren Leber, Nebenniere, Eierstöcke, Lunge und Gehirn neben dem eigentlichen Fettgewebe betroffen. Studien an tragenden Mäusen zeigten im Gegensatz zum Menschen eine geringe fötale Aufnahme der Kongenere. Jedoch wurden die PBDEs nach der Geburt auf den murinen Nachwuchs per Muttermilch übertragen. In dieser reicherten sich aufgrund des hohen Lipidanteils PBDEs in hohem Maße an. Bis zu 40% der oral aufgenommenen Menge des Muttertieres fand sich nach vier Tagen im gesäugten Jungtier wieder. Der Plasmalevel stieg auf mehr als das Doppelte im Vergleich zur Mutter. (de Wit, 2002)

PBDEs können teils metabolisiert über den Fäzes (14%) und zu sehr geringem Teil über den Urin (0,5%) ausgeschieden werden, was durch Studien mit BDE-47 an Ratten erkannt wurde. Hierbei lag der Anteil der metabolisierten zu den nichtmetabolisierten Ausscheidungen bei 79% zu 21%. In einer anderen Studie mit Mäusen und oraler Exposition von BDE-47 wurde jedoch berechnet, dass diese zu einem größeren Teil Hyxdroxymetabolite und nur zu 15% das ursprüngliche PBDE ausscheiden. Ausserdem wurden kovalent gebundene PBDE-Metabolite in Leber, Lunge und Niere detektiert. Das höher substituierte BDE-99 wurde in einer weiteren Rattenstudie zu einem höheren Anteil im Fäzes (43%) wiedergefunden, wobei davon 10% als Metabolite vorlagen. Das zehnfach bromierte BDE-209 wird nur in geringem Maße in der Ratte aufgenommen und zu 90-99% mit dem Fäzes ausgeschieden. Ein geringer Anteil akkumulierte in fetthaltigem Gewebe. Intravenös verabreichtes BDE-209 wurde zu 74% mit dem Fäzes ausgeschieden, wobei hiervon 63% als Metabolite auftraten. In den verschiedenen Studien wurden hydroxylierte und kovalent gebundene Metabolite detektiert. (de Wit, 2002) Höher bromierte Kongenere, wie BDE-209, werden in der Ratte zu geringer bromierten Kongeneren oder seinen Metaboliten metabolisiert. (Huwe, 2005) Neugeborene können im Gegensatz zu adulten Mäusen PBDEs nur schlecht ausscheiden, sodass die Konzentration in Blut, Gehirn und Niere nach einmaliger Gabe von BDE-47 innerhalb von 5 Tagen stetig anstieg, während in den adulten Mäusen die Gewebekonzentration der originären PBDEs und Metabolite innerhalb von fünf Tagen abfiel und ein Großteil über den Urin

ausgeschieden wurden. (Staskal, 2005) Es wurde in Mausstudien auch nachgewiesen, dass die Toxikokinetik der Kongenere nicht nur altersabhängig, sondern auch dosisabhängig ist mit einer relativ sinkenden Exkretion bei steigender Dosis. Es wurde gezeigt, dass BDE-47 nach oraler, intratrachealer und intraperitonealer Verabreichung zu mehr als 80% aufgenommen wird, während die dermale Absorption unter 60% liegt. (Birnbaum, 2006)

In Ratten beträgt die Halbwertszeit 19-30 Tage für TetraBDEs, 42-52 Tage für PentaBDEs und 50-105 Tage für HexaBDEs. Im Menschen wurden für BDE-47, BDE-99, BDE-100 und BDE-154 auf der Grundlage von Körperlast und Nahrungsaufnahme Halbwertzeiten von 2-3 Jahren und für BDE-153 von 4-6 Jahren berechnet. Die Halbwertszeiten für höherbromierte Kongenere sollen mit 11-18 Tagen für BDE-209, 18-39 Tagen für NonaBDEs und 37-91 Tagen für OctaBDEs deutlich kürzer sein. Durch Serenbestimmung exponierter Arbeiter wurden Halbwertszeiten von 86 Tagen für BDE-183 und ca. 7 Tagen für BDE-209 ermittelt. (de Wit, 2002; Birnbaum, 2006)

Im Unterschied zu den Säugern liegt die Aufnahmerate von PBDEs in Fischen deutlich höher. 90% des verabreichten BDE-47, 62% des BDE-99 und 40% des BDE-153 wurden über den Gastrointestinaltrakt in den Körper vom Hecht aufgenommen. Für die stärkere Aufnahme von niedriger bromierten PBDEs werden als Ursache Kotransporte mit anderen Lipiden oder Proteinen durch einen aktiven Transportmechanismus postuliert. In den verschiedenen Fischstudien wurden hydroxylierte und methoxylierte Metabolite detektiert. (de Wit, 2002)

Ducho			0.4	Defense
Probe		BDE-Kongenere	Ort	Referenz
	a=je Gramm Fett			
	b= je Gramm Nassgewi	cnt		
	c= je Gramm Trockenge	ewicht		
Luft			De alemanata a a la Variala	
Büroluft (Staub)	6900 ng <sup>°</sup>	BDE-209	Parlamentsgebäude, Italien, 2000	Leonards, 2001
Büroluft (Staub)	89 ng <sup>c</sup>	BDE-47	Parlamentsgebäude, Italien, 2000	Leonards, 2001
Büroluft (Staub)	59 ng°	BDE99	Parlamentsgebäude, Italien, 2000	Leonards, 2001
Büroluft (Staub)	15 ng°	BDE100	Parlamentsgebäude, Italien, 2000	Leonards, 2001
Büroluft (Staub)	330 ng°	BDE-209	Parlamentsgebäude, Dänemark, 2000	Leonards, 2001
Büroluft (Staub)	39 ng <sup>c</sup>	BDE-47	Parlamentsgebäude, Dänemark, 2000	Leonards, 2001
Büroluft (Staub)	40 ng <sup>c</sup>	BDE99	Parlamentsgebäude, Dänemark, 2000	Leonards, 2001
Büroluft (Staub)	8,3 ng <sup>c</sup>	BDE100	Parlamentsgebäude, Dänemark, 2000	Leonards, 2001
Autoscheibe	152-1772 ng/m <sup>2</sup>	11 Kongenere	. ,	Gearhart, 2006
Innenraumluft	$36 \text{ ng/m}^3$	BDE-209	Elektronikindustrie	Sjödin 2001
Innenraumluft	1.2 ng/m <sup>3</sup>	BDE-47	Elektronikindustrie	, Siödin 2001
Freiluft	$2.6 \text{ pg/m}^3$	BDE-47	Eriesee, USA, 1999	Strandberg, 2001
Freiluft	$< 0.1 \text{ pg/m}^3$	BDE-209	Eriesee USA 1999	Strandberg 2002
Freiluft	$4.8 \text{ pg/m}^3$	7 Kongenere (47,99,	Eriesee USA 1999	Strandberg, 2002
Freihuft	24 n n /m <sup>3</sup>	100,153,154,190,209)		Strendherr, 2004
	21 pg/m <sup>-</sup>	BDE-47	Chicago, USA, 1999	Strandberg, 2004
Freiluft	0,34 pg/m°	BDE-209	Chicago, USA, 1999	Strandberg, 2005
Freiluft	33 pg/m <sup>3</sup>	7 Kongenere (47,99, 100,153,154,190,209)	Chicago, USA, 1999	Strandberg, 2006
Freiluft	1-28 pg/m <sup>3</sup>	di- bis neaxbromierte Kongenere	Arktik, 1994	de Wit, 2002
Freiluft	7,1-21 pg/m <sup>3</sup>	hexabromierte Kongenere	Japan	de Wit, 2002
Freiluft	1-8 pg/m <sup>3</sup>	3 Kongenere (47,99,100)	Ostseeküste, Schweden, 1990	de Wit, 2002
Freiluft	7-69 pg/m <sup>3</sup>	3 Kongenere (47.99.100)	Nordwestengland, Gros sbritannien, 1997	de Wit, 2002
Arktische Luft	14-424 pg/m <sup>3</sup>		Arktik	de Wit, 2006
Gewässer				
Oberflächenwasser	>70% von total PBDE	BDE-47,BDE-99	Ontariosee, USA	Luckey, 2001
Oberflächenwasser	4-13 pg/l	6 Kongenere (47, 99, 100, 153, 154, 183)	Ontariosee, USA	Luckey, 2001
Wasser	0,1-4 pg/l	BDE209	North Sea, Niederlande, 1999	Booij, 2002
Sedimente in	0,07-10,6 ng <sup>c</sup>	5 Kongenere (47 99 100 153 209)	5 Seen und 1 Fluss in Dänemark 2000	Christensen, 2001
Sedimente in Salzwasser	0,06-24,7 ng $^{\circ}$	5 Kongenere (47,99,100,153,209)	Dänische Ostseeküste, 2000	Christensen, 2001
Klärschlamm	38 ng/g	Tetra-, Penta-BDEs	Gothenburg, Schweden, 1988	Nylund,1992
Sedimente	16,6 ng °	3 Kongenere (47,95,99)	Avenmouth, Grossbritannien	Allchin, 1999
Sedimente	3 ng °	BDE-47	Avenmouth, Grossbritannien	Allchin, 1999
Sedimente	1271 ng °	3 Kongenere (47,95,99)	Teemündung, Grossbritannien	Allchin, 1999
Sedimente	368 ng <sup>°</sup>	BDE-47	Teemündung, Grossbritannien	Allchin, 1999
Sedimente	0,79 ng <sup>c</sup>	Penta-BDE	Ostsee, Finnland, 1994	Hartonen, 1997
Sedimente	85-270 ng $^\circ$	9 Kongenere (ohne BDE-209)	Scheldt Mündung , Belgien	Covaci, 2002
Sedimente	bis zu 500 ng $^{\circ}$	BDE-209	Scheldt Mündung , Belgien	Covaci, 2002
Sedimente	2,9 ng/g	Tetra-, Penta-BDEs	Ostsee, Schweden, 1992	Nylund, 1992

#### Einleitung

Probe	Gehalt an PBDEs	BDE-Kongenere	Ort	Referenz
11000	a=ie Gramm Fett	BBE-Rongenere		Referenz
	h= ie Gramm Nassgewi	cht		
	c= ie Gramm Trockenge	wicht		
Biotisch		wiont		
Krabbe	1 02 ng <sup>b</sup>	7 Kongenere (28, 47,	Belaische Nordsee	Voorspoels 2002
Krabba	0,66 ng <sup>b</sup>	99, 100, 153, 154, 183)	Delgiache Nordese	Veereneele, 2002
KIADDe	0,00 Hg	DUE-47 7 Kongenere (28, 47	Scheldt Mündung	voorspoels, 2002
Krabbe	29,92 ng <sup>⊳</sup>	99, 100, 153, 154, 183)	Belgien	Voorspoels, 2002
Krabbe	20,21 ng <sup>b</sup>	BDE-47	Scheldt Mündung, Belgien	Voorspoels, 2002
Krabbe	4-480 ng <sup>a</sup>	14 Kongenere	Pazifikküstet, Kanada, 1991-2000	Ikonomou, 2002
Seestern	0,27 ng <sup>b</sup>	7 Kongenere (28, 47, 99, 100, 153, 154, 183)	Belgische Nordsee	Voorspoels, 2002
Seestern	0,18 ng <sup>b</sup>	BDE-47	Belgische Nordsee	Voorspoels, 2002
Seestern	546 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Teemündung, Grossbritannien	Law, 2003
Muscheln	110 pg <sup>b</sup>	4 Kongenere (47,99,100,153)	Südliches Grönland, 2000	Christensen, 2002
Muscheln	0,08-0,81 ng <sup>b</sup>	4 Kongenere (47,99,100,153)	Dänische Ostseeküste, 2000	Christensen, 2001
Kegelrobbe (Tran)	308 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Ostseeküste, Schweden, 1981-1988	Haglund, 1997
Kegelrobbe (Tran)	54 ng <sup>ª</sup>	BDE-99	Ostseeküste t, Schweden, 1981-1988	Haglund, 1997
Kegelrobbe (Tran)	11 ng ª	BDE-153	Ostseeküste, Schweden, 1981-1988	Haglund, 1997
Ringelrobbe (Tran)	300 ng <sup>a</sup>	total PBDE	Westkanada, 1992	Ikonomou, 2000
Ringelrobbe (Tran)	280 ng <sup>ª</sup>	BDE-47	Westkanada, 1992	Ikonomou, 2000
Vögel				
Wanderfalke (Eier)	28-430 ng <sup>a</sup>	BDE-209	Schweden	Law, 2003
Wanderfalke (Eier)	56-1300 ng <sup>a</sup>	BDE-183	Schweden	Law, 2003
Wanderfalke (Eier)	15-3800 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Schweden	Law, 2003
Wanderfalke (Eier)	110-9200 ng <sup>a</sup>	BDE-99	Schweden	Law, 2003
Wanderfalke (Eier)	77-5200 ng <sup>a</sup>	BDE-100	Schweden	Law, 2003
Wanderfalke (Eier)	270-16000 ng <sup>a</sup>	BDE-153	Schweden	Law, 2003
Wanderfalke (Eier)	50-4400 ng <sup>a</sup>	BDE-154	Schweden	Law, 2003
Wanderfalke (Eier)	230 ng <sup>b</sup>	sum PBDEs	Norwegen, 1991-1997	Herzke, 2001
Hühnerfett	1,8-39,4 ng <sup>a</sup>	17 Kongenere	Südstaaten, USA	Huwe, 2002
Hühnerfleisch	0,006 <sup>b</sup>	6 Kongenere	Japan	Ohta, 2002
Seeadler	410 ng <sup>b</sup>	sum PBDEs	Norwegen, 1991-1997	Herzke, 2001
Uhu (Eier)	510 ng <sup>b</sup>	sum PBDEs	Norwegen, 1991-1997	Herzke, 2001
Sperber (Eier)	740 ng <sup>b</sup>	sum PBDEs	Norwegen, 1991-1997	Herzke, 2001
Star	5,7-13 ng <sup>a</sup>	3 Kongenere	Schweden	Law, 2003
Kormoran (Leber)	1,8-140 ng <sup>b</sup>	14 Kongenere	Großbritannien	Law, 2003
Kormoran (Leber)	25 µg <sup>b</sup>	BDE-47	Rheindelta	Law, 2003
Kormoran (Leber)	4 μg <sup>ь</sup>	BDE-99	Rheindelta	Law, 2003
Broho	Coholt on DRDEo	PDE Kongonoro	Ort	Poforon7
------------------------	----------------------------	--	--	-----------------------------
PIODE	a=ie Gramm Fett	BDE-Kongenere		Referenz
	b= ie Gramm Nassgewi	cht		
	c= je Gramm Trockenge	wicht		
Fisch		, wicht		
	•	<b>00</b> 1/	Ontariosee.	
Seeforelle	3 ng "	23 Kongenere	Nordamerika, 1978	Luross, 2000
Seeforelle	171 ng <sup>a</sup>	23 Kongenere	Ontariosee, Nordamerika, 1988	Luross, 2000
Seeforelle	945 ng <sup>a</sup>	23 Kongenere	Ontariosee, Nordamerika, 1998	Luross, 2000
Seeforelle	550 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Nordamerika, 1998	Luross, 2000
Regenbogenforelle	297 ng <sup>b</sup>	5 Kongenere (47,99,100,153,154)	Spokane River, Washington State, USA, 1997	Johnson, 2001
Weissfisch	1250 ng ⁵	5 Kongenere (47,99,100,153,154)	Spokane River, Washington State, USA, 1999	Johnson, 2001
Stint	150 ng <sup>a</sup>	7 Kongenere (47,99, 100,153,154,190,209)	Lake Superior, USA	Dodder, 2002
Karpfen	2500 ng <sup>a</sup>	7 Kongenere (47,99, 100,153,154,190,209)	Hadley Lake, USA	Dodder, 2002
Seezunge	12-340 ng <sup>ª</sup>	14 Kongenere	Pazifikküste, Kanada, 1991-2000	Ikonomou, 2002
Kleiner Tümmler (Tran)	nd-6900 ng <sup>b</sup>	14 Kongenere	Grossbritannien, 1996- 2000	Law, 2002
Kleiner Tümmler (Tran)	800 ng <sup>a</sup>	total PBDE	Westkanada, 1993	Ikonomou, 2000
Kleiner Tümmler (Tran)	760 ngª	BDE-47	Westkanada, 1993	Ikonomou, 2000
Kleiner Tümmler	350-2300 ng <sup>a</sup>	14 Kongenere	Pazifikkuste t, Kanada, 1991-2000	Ikonomou, 2002
Brasse	420 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Hadley Lake, USA (Nähe PBDE-Fabrik)	Dodder, 2000
Brasse	1900 ng <sup>ª</sup>	6 Kongenere (47,99, 100,153,154,190)	Nähe PBDE-Fabrik)	Dodder, 2000
Brasse	200 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Lake of Ozarks, USA	Dodder, 2000
Brasse	390 ng <sup>a</sup>	6 Kongenere (47,99, 100,153,154,190)	Lake of Ozarks, USA	Dodder, 2000
Gründling	0,63 ng <sup>b</sup>	7 Kongenere (28, 47, 99, 100, 153, 154, 183)	Belgische Nordsee	Voorspoels, 2002
Gründling	0,44 ng <sup>b</sup>	BDE-47	Belgische Nordsee	Voorspoels, 2002
Lachs	773-8120 ng <sup>ª</sup>	6 Kongenere (47,60, 99,100,153,154)	Lake Michigan, USA, 1996	Manchester-Neesvig, 2001
Lachs	1-85 ng <sup>ª</sup>	9 Kongenere (28,71,47,75,66,100,99 ,154,153)	Grossbritannien, 1999	Jacobs, 2002
Lachs (Fleisch)	167 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Umea Fluss, Schweden, 1991	Haglund, 1997
Lachs (Fleisch)	52 ng <sup>a</sup>	BDE-99	Umea Fluss, Schweden, 1991	Haglund, 1997
Lachs (Fleisch)	4,2 ng <sup>a</sup>	BDE-153	Umea Fluss, Schweden, 1991	Haglund, 1997
Lachsfutter	8-24 ng <sup>a</sup>	9 Kongenere (28,71,47,75,66,100,99 ,154,153)	Grossbritannien, 1999	Jacobs, 2002
Fischöl	nd-13 ng <sup>a</sup>	(28,71,47,75,66,100,99 154 153)	Grossbritannien, 1999	Jacobs, 2002
Essbare Fische	0,02-1,6 ng <sup>b</sup>	6 Kongenere	Japan	Ohta, 2002
Sonstiges	b			
Rentier	0,5-1,7 ng <sup>o</sup>	3 Kongenere	Schweden	Law, 2003
Elch	0,5-1,7 ng°	3 Kongenere	Schweden	Law, 2003
Kuhmilch	2,5-4,5 ng <sup>a</sup>	(47,99,100,153,154)	Deutschland	Darnerud, 2001
Kuhmilchprodukte	0,36 ng <sup>a</sup>	5 Kongenere (47,99,100,153,154)	Schweden	Darnerud, 2001
Rindfleisch	0,016 <sup>°</sup>	6 Kongenere	Japan	Ohta, 2002
Schweinefleisch	0,063	6 Kongenere	Japan	Ohta, 2002
Gemüse	0,04-0,134 ng <sup>⊳</sup>	6 Kongenere	Japan	Ohta, 2002

Probe	Gehalt an PBDEs	BDF-Kongenere	Ort	Referenz
11000	a=ie Gramm Fett	BBE Rongenere		
	b= ie Gramm Nassgewi	cht		
	c= je Gramm Trockenge	ewicht		
Mensch				
Fettgewebe	2,2 - 11,7 ng <sup>a</sup>	5 Kongenere (28, 47, 99, 100, 153)	Belgien, 2000	Covaci, 2002
Fettgewebe	3,8-7,7 ng <sup>a</sup>	9 Kongenere (3–6 Bromatome)	Schweden, 1994	Meironyte, 2001
Fettgewebe	1,7-4,0 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Schweden, 1994	Meironyte, 2001
Fettgewebe	8,6 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Kalifornien, late 90ies	She, 2000
Fettgewebe	4,9 ng <sup>a</sup>	BDE-99	Kalifornien, late 90ies	She, 2000
Fettgewebe	2,2 ng <sup>a</sup>	BDE-153	Kalifornien, late 90ies	She, 2000
Fettgewebe	8,8 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Schweden, 1994	Haglund, 1997
Fettgewebe	1,1 ng <sup>a</sup>	BDE-99	Schweden, 1994	Haglund, 1997
Fettgewebe	1,7 ng <sup>a</sup>	BDE-153	Schweden, 1994	Haglund, 1997
Muttermilch	6,2-419 ng <sup>a</sup>	13 Kongenere	Texas, USA, 2002	Schecter, 2003
Muttermilch	73,9 ng <sup>a</sup>	13 Kongenere	Texas, USA, 2002	Schecter, 2003
Muttermilch	11 ng <sup>ª</sup>	15 Kongenere	Australien, 2004	Harden, 2005
Muttermilch	0,7-2,8 ng <sup>a</sup>	6 Kongenere	Japan,	Ohta, 2002
Muttermilch	1,75 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Kanada	Ryan, 2002
Muttermilch	16,24 ng <sup>a</sup>	6 Kongenere (28,47, 99,100,153,183)	Kanada, 1992	Ryan, 2002
Muttermilch	0,21 ng <sup>a</sup>	99,100,153,183)	Kanada, 1981-2	Ryan, 2002
Muttermilch	1,31 ng "	BDE-47 4 Kongenere	Finnland, 1994-1998	Strandman, 2000
Muttermilch	2,25 ng <sup>-</sup> 0.07 ng <sup>a</sup>	(28,47,99,153) 7 Kongenere (28,47	Finnland, 1994-1998	Strandman, 2000
Muttermilch	o,o:g	66,85,99,100,153,154) 7 Kongenere (28,47	Schweden, 1972	Meironyte, 1999
Muttermilch	4,02 ng <sup>a</sup>	66,85,99,100,153,154) 6 Kongenere (47,66	Schweden, 1997	Meironyte, 1999
Muttermilch	0,44 ng <sup>a</sup>	85,99,100,153,154)	Norwegen, 1977	Thomsen, 2002
Muttermilch	3,3 ng <sup>ª</sup>	85,99,100,153,154)	Norwegen, 1999	Thomsen, 2002
Blut	2,4 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Deutschland, 1985	2000 Schröter-Kermani,
Blut	3,1 ng <sup>ª</sup>	8 Kongenere (28,47, 66,85,99,100,153,154)	Deutschland, 1985	Schröter-Kermani, 2000
Blut	2,8 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Deutschland, 1990	Schröter-Kermani, 2000
Blut	3,9 ng <sup>ª</sup>	8 Kongenere (28,47, 66,85,99,100,153,154)	Deutschland, 1990	Schröter-Kermani, 2000
Blut	2,3 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Deutschland, 1995	Schröter-Kermani, 2000
Blut	3,9 ng <sup>a</sup>	8 Kongenere (28,47, 66,85,99,100,153,154)	Deutschland, 1995	Schröter-Kermani, 2000
Blut	3 ng <sup>a</sup>	BDE-47	Deutschland, 1999	Schröter-Kermani, 2000
Blut	4,7 ng <sup>a</sup>	8 Kongenere (28,47, 66,85,99,100,153,154)	Deutschland, 1999	Schröter-Kermani, 2000
Blut	17 ng <sup>a</sup>	13 Kongenere	Korea, 2002	Chang, 2005
Fötales Blut	14-460 ng <sup>a</sup>	6 Kongenere (47,99, 100,153,154,183)	Indiana, USA, 2002	Mazdai, 2003
Maternales Blut	15-580 ng <sup>a</sup>	6 Kongenere (47,99, 100 153 154 183)	Indiana, USA, 2002	Mazdai, 2003
Serum	37 pmol <sup>a</sup>	5 Kongenere (47,153,154,183,209)	Electronikindustrie, Schweden	Sjödin, 1999
Serum	5,4 pmol <sup>ª</sup>	5 Kongenere (47,153,154,183,209)	Arbeiter,Schweden	Sjödin, 1999
Serum	7,3 pmol <sup>a</sup>	5 Kongenere	Reinigungskräfte, Schwedon	Sjödin, 1999
Plazenta	1.01 ng <sup>a</sup>	(+7,100,104,100,209) BDE-47	Finnland 1994-1998	Strandman 2000
Plazenta	2,07 ng <sup>a</sup>	4 Kongenere	Finnland, 1994-1998	Strandman, 2000

 Tabelle 5: Expositionsdaten für PBDEs

 (fortlaufende Tabelle über vier Seiten)

# A.4.9 Wirkungen

Für PBDEs sind in den letzten Monaten und Jahren viele Einflüsse auf die Regulation von endokrinen Funktionen, das Nervensystem, die Immun- und Leberfunktionen beschrieben worden. Teilweise sind die Effekte für einzelne Kongenere, teilweise für die industriellen Gemische untersucht worden.

Im akuten oralen Toxizitätstest in der Ratte wurden LD<sub>50</sub>-Werte (Lethale Dosis, bei der 50% der Testtiere sterben) von mehr als 5.000 mg, 5.000 mg bzw. 2.000 mg je Kilogramm Körpergewicht für den kommerziellen Penta-, Octa, bzw. Decamix beschrieben. (CEPA, 2004).

# A.4.9.1 Wirkungen auf die Leber

Die Effekte auf die Leber reichen von Enzyminduktionen im Fremdstoffmetabolismus und Lebervergößerungenen hin zu degenerativen histologischen Veränderungen. In Nagern führten tägliche orale Dosen von 5-10 mg/kg KG zu Lebervergrößerung mit oder ohne degenerativen Veränderungen. Dabei sind die männlichen Tiere stärker betroffen als die weiblichen. Die Penta- und Octamixe haben eine stärkere Wirkung als der Decamix. Für ältere Decamix-Chargen mit weitaus mehr Verunreinigungen wurden auch Effekte auf das Thyroidsystem ausgemacht. (EPA, 2006)

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit PCBs wurden auch Wirkungen auf die Isoenzyme des Cytochrom P450 1A und 2B untersucht. Ab Dosen von 18 und 30 mg/kg KG Körpergewicht pro Tag sind in Ratten jeweils erhöhte EROD-Aktivitäten (7-Ethoxyresorufin-O-dealkylase) als Maßstab für CYP1A-Aktivität und PROD-Aktivitäten (7-Pentoxyresorufin-O-dealkylase) als Maßstab für CYP2B-Aktivität bei industriellen Pentamixen nachgewiesen worden. (Hallgren, 2001; Stoker, 2004) BDE-47 zeigte keine CYP1A-Induktion bis zu Dosen von 100 mg/kg KG Körpergewicht in der Maus. (Staskal, 2005) *In vitro*-Daten verschiedener Gruppen deuten darauf hin, dass mehrere PBDEs an den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), der für die Induktion von CYP1A und anderen Enzymen verantwortlich ist, binden. Allerdings werden sowohl antagonistische, insbesondere der niedrig bromierten Kongenere, als auch agonistische Bindungen gefunden, konzentrationsabhängig teilweise sogar beides. (Hamers, 2006; Peters, 2006; Rice, 2007; de Wit, 2002) Die jeweiligen Kongenere sind im Bereich von 0,1-10 µM aktiv. Jedoch liegen die untersuchten Kongenere in Effizienz und Wirkpotential weit (56.000 fach) unter dem von Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), dem stärksten

bekannten AhR-Aktivierer (Hamers, 2006) Für BDE-209 konnte erst nach Photolyse eine Aktivierung des AhR ausgemacht werden. (Rice, 2007)

## A.4.9.2 Endokrine und reprotoxische Wirkungen

Neueste Daten zeigen, dass einige Kongenere mit dem Thyroidsystem zu interagieren scheinen. *In vitro* wurde eine inhibitorische Bindung von einigen Kongeneren an Transthyretin in höheren Konzentrationsbereichen (10-25  $\mu$ M) gezeigt. Die höchste Potenz in diesen Versuchen besaßen hydroxylierte PBDEs, insbesondere 6-OH-BDE-47 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert (Konzentration, bei der die Maximalwirkung durch Hemmung halbiert wird) von 0,18  $\mu$ M (Hamers, 2006; Meerts, 2000) In Ratten wurden reduzierte T4-Level bei einer täglichen Dosis von 3 mg (Stoker, 2004) bzw. 10 mg (Zhou, 2002) je Kilogramm Körpergewicht detektiert. Den Säugerdaten ähnlich wurde beschrieben, dass das Thyroidhormon T4 und der Vitamin A-Status in Vögeln negativ mit der inneren Exposition von BDE-47, BDE-99 und BDE-100 korreliert. (Fernie, 2005)

Hohe Dosen des Decamixes führen zu Schilddrüsenhyperplasien und –adenomen. (de Wit, 2002) Arbeiter, die mit Decamix und PBBs exponiert wurden, hatten eine höhere Inzidenz für Schilddrüsenverkleinerung. (ATSDR, 2002)

Durch *in vitro*-Studien wurde belegt, dass einige PBDE-Kongenere in den Hormonstatus, insbesondere von Östrogenen, Androgenen und Progesteronen eingreifen könnten. (Rice, 2007; Hamers, 2006; Stoker, 2004) Auch Methoxy- und Hydroxymetabolite interagieren mit dem Metabolismus von Steroidhormonen. (Rice, 2007)

Die Berliner Gruppe um Talsness und Chahoud zeigte Effekte auf die Nachkommen (60 µg/kg KG) und sogar auf die Nachkommen der zweiten Generation (300 µg/kg KG) durch einmalige Dosen von BDE-99 bei der weiblichen Ratte. In der ersten Generation waren Veränderungen im Uterus und den Ovarien sichtbar bzw. die Spermienproduktion verringert, während in der zweiten Generation Skelettverformungen gehäuft auftraten. (Talsness, 2005; Kuriyama, 2005) In einer Nachfolgestudie konnten ähnliche Effekte mit BDE-47 beobachtet werden. (Talsness, 2006) Bei Verabreichung von BDE-99 über neun Tage zeigten Lilienthal et al. bei den männlichen Nachkommen der Ratte verringerte Sexualhormone. Sie schlussfolgerten aus einem verringertem Anogenitalabstand und einer verstärkten Süßpräferenz eine leichte Feminisierung der männlichen Nachkommen. (Lilienthal, 2006)

Selbst im Menschen lässt eine epidemiologische Studie in Taiwan auf Einflüsse auf das Reproduktionssystem schließen. Während in den meisten *in vitro*-Studien für BDE-209 kein

Einfluss auf endokrine Faktoren nachgewiesen werden konnte, wurde in dieser Studie für BDE-209, genauso wie für BDE-47, BDE-99 und BDE-100 die Konzentrationen in der Muttermilch negativ korreliert mit dem Geburtsgewicht,- länge, und -brustumfang des Säuglings. (Chao, 2007)

## A.4.9.3 Nervensystem

In *in vitro*-Studien wurden apoptotische Wirkungen auf Nervenzellen, wie Astrogliazellen und Granulazellen ausgemacht. (Madia, 2004; Reistad, 2006) Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Dopaminaufnahme in Synaptosomen und Vesikel inhibiert wird, die Freisetzung von Arachidonsäure in Granulazellen stimuliert wird und Wege der Signaltransduktion durch Verschiebung der Calciumhomöostase und Translokation der Proteinkinase C (PKC) in Granulazellen gestört werden. (Mariussen, 2003; Kodavanti, 2002; Kodavanti, 2005)

*In vivo*-Studien in Nagern zeigten eine Verschlechterung des Lern-, Erinnerungs- und Reaktionsverhaltens ab einer einmaligen Dosis von 0,8 mg PBDE-99 je Kilogramm Körpergewicht in verschiedenen Säuglingsaltern. (Dufault, 2005; Viberg, 2002; Viberg, 2003; Viberg, 2004; Eriksson, 2002) Die Signalweiterleitung über cholinerge Rezeptoren wird vermindert. (Viberg, 2002) Bei den Versuchen zeigte reines BDE-209 keinen Einfluss, wohl aber dessen Metabolite und Kongenere im industriellen Decamix BDE-206 und BDE-203. (Viberg, 2007)

Bemerkenswert ist die Arbeit einiger Wissenschaftler, die bei einer Koexposition mit anderen Neurotoxen synergistische Wirkungen feststellen konnten und somit auch unter dem Wirklevel der Einzelsubstanzen Effekte nachvollziehen konnten, z.B. zusammen mit PCBs, perfluorierten organischen Substanzen und Quecksilberverbindungen (Fischer, 2006; Eriksson, 2006a; Eriksson, 2006b)

## A.4.9.4 Immunsystem

Bei Kurzzeitstudien in Mäusen verringerte sich die Immunglobulin G (IgG)-Produktion, das Thymusgewicht und es wurde die Antikörperreaktion unterdrückt durch orale Exposition von 18-72 mg Pentamix je Kilogramm Körpergewicht und Tag (mg/kg KG/Tag). Lymphozyten und Monozyten werden bei der oralen Exposition von BDE-47 vermindert. In der Milz entstehen Läsionen bei chronischer Verabreichung hoher Dosen von 2240 mg/kg KG/Tag. (EPA, 2006)

## A.4.9.5 Kanzerogenität

Aus chronischen Studien mit dem kommerziellen Decamix geht hervor, dass hohe Dosen von 1.120 mg bzw. 2.550 mg/kg KG/Tag in männlichen bzw. weiblichen Ratten zu hepatischen Präneoplasien führen. Eine erhöhte Inzidenz für Adenome und Karzinome wurden ab Dosen von 3.200 mg/kg KG/Tag gesehen. Gentoxizitätstest zeigten für den Decamix keine Effekte. Für BDE-47 wurde der Rekombinationstest positiv bewertet, was schlussfolgern lässt, dass BDE-47 durch nichtmutagene Mechanismen zu Krebs führen kann. (EPA, 2006; Helleday, 1999)

# A.5 Fremdstoffmetabolismus

Der Körper nimmt eine Vielzahl von Fremdstoffen auf, die er selbst nicht verwerten kann oder die nach Verwertung wieder ausgeschieden werden müssen. Die Ausscheidung erfolgt über den Fäzes, die Muttermilch, die Luft oder die wässrigen Ausscheidungen Urin und Schweiß. Insbesondere die biläre und renale Ausscheidung erfordern eine ausreichende Wasserlöslichkeit der zu eliminierenden Substanz durch eine metabolische Transformation. Die Umwandlung erfolgt durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme, die sich zum großen Teil in Leber, Darm und Niere und zum geringeren Teil in Lunge, Gehirn, Haut und Muskeln befinden.

Einige Aspekte im Bereich des Fremdstoffmetabolismus sind von großer Wichtigkeit für das Verständnis der Wechselwirkungen der Fremdstoffe und Enzyme, die hier erwähnt werden sollen. Erstens werden über die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus nicht nur Fremdstoffe, wie Medikamente, Umwelt- und Pflanzengifte metabolisiert und dadurch der Körper vor schädlichen Wirkungen geschützt, sondern auch körpereigene Hormone oder deren Vorstufen. Zweitens kann es bei der Biotransformation auch zur Entstehung schädigender Stoffe kommen, die sogenannte metabolische Aktivierung. Drittens können Fremdstoffe auf die Metabolisierung anderer Stoffe einwirken. Dies ist beispielsweise bei Wechselwirkungen verschiedener Medikamente von großem Interesse. Viertens führen Polymorphismen innerhalb einer Spezies zu unterschiedlicher Sensibilität auf die Fremdstoffe. Fünftens lassen speziesabhängige Unterschiede in der Gen- und Proteinregulierung bedingt Rückschlüsse auf eine andere Spezies zu. (Marquard, 2004; Ioannides, 2002)

# A.5.1 Phasen des Fremdstoffmetabolismus

Die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus sind in drei Phasen unterteilt. In der ersten Phase, der Funktionalisierungsreaktion, sind Enzyme zur aromatischen und aliphatischen Hydroxylierung, Epoxidation, Dealkylierung, Nitroreduktion, oxidativen und reduktiven Dehalogenierung, Azoreduktion und Hydrolyse aktiv. Zu dieser Phase gehören die Gruppe der Oxidoreduktasen der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP), Flavinabhängigen Monooxygenasen (FMO), Monoaminooxidasen (MAO), Cyclooxygenasen(COX), Dihydroldioldehydrogenasen, NADP(H)-Chinon-Oxidoreduktasen (NQO), Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen (ADH, ALDH) und die Gruppe der Hydrolasen als Esterasen, Amidasen, Glucuronidasen und Epoxyhydrolasen. In der zweiten Phase wird der funktionalisierte Stoff in der Konjugationsreaktion mit hydrophilen Substraten durch Sulfotransferasen (SULT), Glucuronosyltransferasen (UGT), Glutathiontransferasen (GST), Methyltransferasen (MT) oder Aminoacetyltransferasen (NAT) stark hydrophilisiert.

In der dritten Phase wird der stark hydrophile Metabolit aus der Zelle heraustransportiert und kann in den wässrigen Medien der Gallenflüssigkeit, Blut, Harn oder Schweiß bis zum Aussscheidungsort gelangen. Die Transportsysteme dieser Phase sind u.a. ABC-Transporter und die große Gruppe der löslichen Carriersysteme (SLC), wie organische Anion- und Kation-Transporter (OAT, OCT) und organischen Anion-Transport-Polypeptide (OATP). (Marquard, 2004; Ioannides, 2002; Mizuno, 2003)

# A.5.2 Cytochrom P450 Enzyme

Die Cytochrom-P450-abhängigen Monoxygenasen (CYPs) werden ubiquitär in verschiedenen Organismen exprimiert. Kommen die CYPs der Säuger zwar in verschiedenen Organen, wie Niere, Lunge, Gehirn vor, so liegt ihr Hauptanteil doch in der Leber. (Hukkanen, 2000)

Sie bilden eine Superfamilie von strukturell verwandten membranständigen Enzymen, die bei Eukaryonten am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert teilweise am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind. Ihnen ist gemein, dass sie die prosthetische Gruppe Hämin besitzen, das über ein Cystein im aktiven Zentrum des Enzyms verankert vorliegt. Nach Reduktion zum Häm bindet es Sauerstoff oder Kohlenmonoxid. Letzterer Komplex besitzt ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei der Wellenlänge von 450 nm. Diesem Fakt verdankt die Enzymgruppe seinen Namen. (Marquard, 2004)

Die enzymatische Aktivität von CYP resultiert aus dem Transfer eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff auf ein Akzeptormolekül, z.B. den Fremdstoff, wobei das zweite Sauerstoffatom unter Verbrauch von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) zu Wasser reduziert wird. Abbildung 5 gibt einen Einblick in die mehrstufigen, mechanistischen Vorgänge der Redoxreaktionen. Dabei wird mithilfe der assozierten NADPH-abhängigen CYP-Reduktase das komplex gebundene Eisen(III)-Ion des Hämin zu Eisen(II) reduziert. Das resultierende Häm kann molekularen Sauerstoff binden. Ein weiteres Elektron wird von der CYP-Reduktase oder löslichem Cytochrom-b<sub>5</sub> transferiert. Der entstandene, hochreaktive [Fe<sup>2+</sup>-O<sup>2</sup>-]-Komplex kann nun über instabile Zwischenstufen Sauerstoff auf das Substratmolekül übertragen, wobei Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert wird. Nach Abdissoziation

des oxygenierten Substratmoleküls liegt das Hämin wieder im Ausgangsstadium vor. (Marquard, 2004; Guengerich, 2007)



**Abbildung 5: CYP abhängige Oxidation** (Guengerich, 2007)

# A.5.3 Kategorisierung der CYPs

Die Enzyme der Superfamilie der CYPs werden in Familien und Unterfamilien eingeteilt. Sind Enzyme zu mindestens 40% in ihrer Aminosäuresequenz identisch, werden sie zu einer Familie gezählt und erhalten in ihrer Nomenklatur eine arabische Zahl von 1 bis über 700 nach der Abkürzung CYP, z.B. CYP2-Familie. Bei einer Homologie von 55% gehören sie einer Untergruppe an und erhalten als Kennzeichnung einen lateinischen Buchstaben angehängt, z.B. CYP2B. Die Isoenzyme, die durch eine weitere arabische Zahl markiert werden, unterscheiden sich zu mindestens 3% voneinander, z.B. CYP2B6. Die einzelnen Variationen oder Mutationen eines Isoenzyms werden mit Asterisk und arabischen Zahlen unterschieden, z.B. CYP2B6\*9. Die in den jeweiligen Spezies orthologen CYPs werden teilweise mit den gleichen Isoenzymen benannt, z.B. CYP1A1 in Ratte und Mensch, teilweise erfolgt eine speziesunabhängige Durchnummerierung, z.B. CYP3A1 in der Ratte und CYP3A4 im Menschen. Zu den fremdstoffmetabolisierenden CYPs zählen die Familien

CYP1-4. Die anderen behaupten sich in der Synthese körpereigener Stoffe, wie Steroiden, Fettsäuren und vor allem Cholesterol. (Marquard, 2004; CYP-Homepage; Szklarz, 1998; Guengerich, 2007)

# A.5.4 CYP1A Isoenzyme

Die CYP1A-Unterfamilie besteht bei Mensch und Nager aus den Isoenzymen CYP1A1 und CYP1A2. Während das humane CYP1A1 hauptsächlich im außerhepatischen Gewebe exprimiert wird, wurde das CYP1A2-Protein bisher nur in der Leber gefunden. CYP1A2 ist mit 13% eines der Hauptvertreter der CYPs in der Leber. CYP1A1 wird nur zu sehr geringem Teil konstitutiv exprimiert. (Hukkanen, 2000)

## A.5.4.1 Struktur

Das humane CYP1A1 Gen ist auf dem Chromosom 15 beheimatet. Das exprimierte Protein besteht aus 512 Aminosäuren. Das humane CYP1A2, ebenfalls auf Chromosom 15, besitzt im Protein 515 Aminosäuren. Das CYP1A1 der Ratte mit 524 Aminosäuren unterscheidet sich zu 20%, das CYP1A2 mit 513 Aminosäuren zu 25% vom humanen Orthologen. (Genbank-Eintrag, DNAMAN-Vergleich). Für CYP1A1 bzw. CYP1A2 sind beim Menschen sieben bzw. sechs Variationen bekannt, die sich teilweise in ihrer Induktionspotenz unterscheiden. (Hukkanen, 2000; CYP-Allele-Homepage)

## A.5.4.2 Induktion über den AhR-Signaltransduktionsweg

Charkteristisch für CYP1A1 und CYP1A2 ist die Induzierbarkeit durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) und halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK). Dabei spielt der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) eine herausragende Rolle. Er ist im inaktiven Zustand mit einem Proteinkomplex dissoziert, der sich aus einem Dimer des Heatshock-Proteins 90 (hsp90), dem Cochaperon p23, dem Hepatitis-B-Virus-X-assoziertem Protein 2 (XAP-2) und der Proteinkinase c-Src zusammensetzt. Nach Binden einer Substanz an den AhR transloziert dieser samt Ligand bei Abdissoziation des Proteinkomplex in den Zellkern. Dort bindet er an den AhR nukleären Translokator (ARNT). Dieser Ligand-AhR-ARNT-Komplex bindet mit hoher Affinität an spezifische Enhancer-Sequenzen der DNA, die sogenannten "xenobiotic responsive elements" (XRE) mit der wesentlichen Nukleotidabfolge 5'-CGTG-3'. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der Chromatinstruktur in dieser Region und der Möglichkeit der Transkriptionsfaktoren, mit dem Promotor zu interagieren. Es schließt sich die Transkription des Strukturgens an. In Abbildung 6 ist der Signaltransduktionsweg über AhR schematisch dargestellt. Als Strukturgene, die durch AhR reguliert werden können, sind außer CYP1A-Isoenzyme auch noch einige andere Enzyme des Fremdstoffmetabolismus bekannt oder werden diskutiert, z.B. CYP1B1, CYP2S1, GST-Ya, ALDH3 und UGT1A6. (Denison, 2003; Whitlock, 1999)

Als Liganden, die an den AhR agonistisch binden und somit den Signaltransduktionsweg hin zur Transkription aktivieren, sind vor allem die anthropogenen PAKs und HAKs bekannt. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) ist einer der potentesten Liganden für AhR. Aber auch natürliche Liganden wie Indol- oder Tryptophanderivate, Metaboliten der Arachidonsäure und der Carotinoide werden diskutiert. (Denison, 2003) Im Speziesvergleich zeigt sich, dass die CYP1A-Isoenzyme des Menschen mit starken Induktoren wie TCDD und PCBs wesentlich schwächer induzierbar sind als die der Ratte. (Xu, 2000; Zeiger, 2001)



Abbildung 6: Induktionsmechanismus von CYP1A über AhR

## A.5.4.3 Wirkungen

Da CYP1A über den AhR aktiviert wird, wird es oftmals als Markerenzym für Toxizitätsuntersuchungen, die über den AhR-Transkriptionsweg verlaufen herangezogen. Die Wirkungen verschiedener CYP1A-Induktoren, deren Aktivierung über den AhR laufen, sind zahlreich und nicht nur auf die Leber beschränkt. Aus Studien in AhR-Knockout-Mäusen ist bekannt, dass AhR für die Toxizität verschiedener wichtiger physiologischer Paramter verantwortlich ist. AhR- / - -Mäuse waren gegen TCDD-toxische Wirkungen geschützt, z.B. Thymusatrophie, Lebervergrößerung, Lungenschädigungen, Immuntoxizität, Teratogenese und Kanzerogenese. Andererseits gab es in AhR -/- -Mäusen auch Störungen in einigen lebensnotwendigen Schritten, bspw. unterdrückte Apoptose und Zellzyklusstörungen, abnormaler Retinoidmetabolismus und abnormale Stimulierung der B-Lymphozyten. (Rifkind, 2006)

Die kanzerogene Wirkung insbesondere in der Leber wird mit der metabolischen Aktivierung von Fremdstoffen und der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht, wonach das Gleichgewicht von metabolischer Aktivierung und Detoxifizierung gestört werden könnte. Beispielsweise wird Benz[a]-pyren (BaP) durch CYP1A1 zum genotoxischen Diol-Epoxid metabolisiert und 2-Acetaminofluoren(2-AAF) durch CYP1A1 und CYP1A2 aktiviert. Aber auch nichtgenotoxische Kanzerogenese wird mit CYP1A in Verbindung gebracht. So verursachte nach 12-18 Monaten eine Infektion mit Helicobacter hepaticus eine CYP1A2-Induktion in Mäusen, die zu Tumorbildung in der Leber führte. Allerdings wurde hier nicht ausreichend geklärt, ob CYP1A2 nur adaptierte oder in der Krebsentstehung beteiligt war. Durch Polymorphismus-Untersuchungen konnten einige CYP1A-Varianten mit höherer Krebsinzidenz ausgemacht werden. Der Mechanismus im Zusammenhang von CYP1A-Induktion und Krebsentstehung ist allerdings bis dato noch nicht hinreichend erklärt. (Rifkind, 2006; Whitlock, 1999; Nebert, 2002; Gonzales, 2003).

# A.5.5 CYP2B Isoenzyme

Die CYP2B-Unterfamilie besteht in der Ratte aus den Isoenzymen CYP2B1, CYP2B2, CYP2B3, CYP2B12, CYP2B15, CYP2B21 und CYP2B31, wobei die Isoenzyme CYP2B1 und CYP2B2 von größerer Bedeutung sind. Im Menschen existieren die Gene CYP2B6 und das Pseudogen CYP2B7 innerhalb der CYP2B-Unterfamilie. CYP2B –Isoenzyme werden hauptsächlich in der Leber exprimiert, eine CYP2B6-Expression wurde aber auch in extrahepatischen Geweben wie, Niere, Lunge, Gehirn, Kolon- und Brusttumoren und bei Nagern zusätzlich im Dünndarm nachgewiesen. (Guengerich,2007; Martignoni, 2006; CYP-Allele-Homepage; CYP-Homepage)

## A.5.5.1 Struktur

Das 1988 / 89 identifizierte *CYP2B6* Gen liegt auf Chromosom 19 und kodiert für ein ca. 50 kDa großes Protein mit 491 Aminosäuren. Es sind mittlerweile über 50 Variationen beim Menschen bekannt, die sich auch in ihrer Enzymaktivität unterscheiden. Die Ratten-Isoenzyme sind auf Chromosom 1 lokalisiert. CYP2B1 und CYP2B2 kodieren jeweils für ein Protein gleicher Größe. Die Identität der Menschen- und Ratten-Homologe liegt bei ca. 75%. Die beiden Ratten-Isoenzyme unterscheiden sich nur zu ca. 3% voneinander. Dennoch handelt es sich um zwei verschiedene Gene mit eigener Gen-Regulation. (CYP-Allele-Homepage).

## A.5.5.2 Transkription

Die konstitutive Expression von CYP2B in der Leber ist geschlechtsspezifisch. In Lebern von Frauen wurden höhere CYP2B-Konzentrationen gefunden als bei Männern, während in der weiblichen Ratte geringere Expressionsraten gemessen wurden als bei den männlichen Tieren. Diese Unterschiede werden durch hormonelle Einflüsse auf die Transkription erklärt. (Martignoni, 2006) Aber auch ethnische Einflüsse sind bei der CYP2B-Familie zu finden. Die CYP2B6-Proteinmenge in Leberproben von Kaukasiern ist im Durchschnitt zehnfach höher als von Japanern. (Code, 1997)

Beim Induktionsmechanismus, der noch nicht vollständig geklärt ist, spielen die nukleären Rezeptoren (NR) Pregnane X Receptor (PXR) und Constitutive Androstane Receptor (CAR) eine Schlüsselrolle. Während die Rezeptoren eine Reihe an gleichen Liganden besitzen und sich ebenfalls im Muster der regulierten Gene überschneiden, variieren ihre Induktionswege erheblich. CAR befindet sich im Cytoplasma von nichtexponierten Hepatozyten, während PXR bereits im Nukleus vorhanden ist. Beim Vergleich der beiden NRs wird CAR im Induktionsmechanismus von CYP2B die größere Rolle zugesprochen und PXR bei CYP3A. Beim Signalweg über CAR werden augenscheinlich mindestens zwei Schritte durchlaufen, die unterschiedlich reguliert werden; die nukleäre Translokation und die Rezeptoraktivierung im Zellkern, vgl. Abbildung 7.(Sueyoshi, 2001; Handschin, 2005)

Zur Translokation muss CAR aus einem gebundenen Proteinkomplex u.a. mit hsp90 und dem "cytoplasma CAR retention protein" (CCRP) durch Dephosphorylierung mittels Protein Phosphatase 2A herausgelöst werden. Die den Schritt aktivierenden Substanzen, z.B. Phenobarbital, sind nicht zwangsläufig Liganden. Durch Protein Phosphatase Inhibitoren, z.B. Okadasäure, kann dieser Schritt auch behindert werden. (Sueyoshi, 2001; Yoshinari, 2003, Yamada, 2006)

Die Rezeptoraktivierung im Zellkern erfolgt über Koregulatoren, die CAR für eine Bindung an den "retinoic X receptor" (RXR) vorbereiten. Die Ca<sup>2+</sup> / Calmodulin-abhängige Kinase scheint für die Aktivierung von CAR eine Schlüsselrolle zu spielen. Das Heterodimer CAR-RXR bindet an Enhancer-Sequenzen der DNA, sogennannte PBREs oder PBREMs (phenobarbital responsive element modules). Es schließt sich nach der Veränderung der Chromatinstruktur in dieser Region die Transkription des Strukturgens an. (Tzameli, 2001; Sueyoshi, 2001; Kakizaki, 2003; Marc, 2000)



Abbildung 7: Induktionsmechanismus von CYP2B über CAR

## A.5.5.3 Wirkungen

CYP2B6 ist an der Verstoffwechselung von ca. 25% der Medikamente des heutigen Marktes beteiligt. Eine veränderte Transkriptionsrate von CYP2B kann somit zu einer erhöhten oder verminderten Medikamentenwirkung führen und klinische Symptome hervorrufen. (Martignoni, 2006) Daneben werden Prokarziogene wie Aflatoxin B1 und Dibenzo-[a,h]- anthracen, die Designerdroge Ecstasy, Nikotin und das endogene Substrat Testosteron von CYP2B6 metabolisiert. (Richter, 2005)

Das Enzym CYP2B1 hat bei der Verstoffwechselung einiger Substrate eine deutlich höhere katalytische Aktivität als das CYP2B2, so ca. fünffach höher bei der Metabolisierung von Benzphetamin und Testosteron, sowie zweifach höher in der des polyzyklischen Aromaten BaP. Bekannt ist ein pathophysiologischer Zusammenhang des CYP2B1 mit dem Leberzellkarzinom bei Exposition gegenüber Aflatoxinen. (Rachidi, 2002)

Schon seit längerem wird ein Zusammenhang von CYP2B-Induktion und Tumorpromotion diskutiert. Dabei wird vor Augen geführt, dass viele der bekannten CYP2B-Induktoren auch promovierende Eigenschaften besitzen. Beispielsweise kommt es durch Phenobarbital und andere CYP2B-Induktoren zu verminderter Produktion von Connexin32, welches für die Formation von "gap junctions" erforderlich ist, und zu verstärkter Apoptose. Ueda et al. zeigten in einem Microarray-Experiment mit CAR-knockout- und –Wildtyp-Mäusen, dass eine Vielzahl von Genen über CAR und Phenobarbital reguliert wird und somit wahrscheinlich eine CAR-Aktivierung die Korrelation von CYP2B-Induktoren und Tumorpromotoren begründet. (Yamada, 2006; Ueda, 2002)

# A.5.6 CYP3A Isoenzyme

In der Ratte existieren die Isoenzyme CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18 und CYP3A62. Diese Isoenzyme scheinen geschlechtsspezifisch exprimiert zu werden. CYP3A2 und CYP3A18 werden bei den männlichen Tieren stärker exprimiert und CYP3A9, sowie CYP3A62 bei den weiblichen. Die Isoenzyme konnten bisher vorrangig in Leber und Darm, aber auch in anderen Geweben, wie Gehirn, Lunge und Niere nachgewiesen werden. (Martignoni, 2006; Robertson, 1998; CYP-Allele-Homepage)

CYP3A4 ist neben CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 und den beiden Pseudogenen CYP3A5 p1 und CYP3A5 p2 Mitglied der beim Menschen einzigen Subfamilie 3A der CYP3 Familie. Es wird hauptsächlich in der Leber und im Darm exprimiert. In der Leber macht es mengenmäßig zwischen 30 und 60% des gesamten P450 Gehaltes aus und stellt im Darm ebenfalls das am stärksten exprimierte P450 Enzym dar. Die Expression und Enzymaktivität von CYP3A4 in der Leber variiert interindividuell erheblich um bis zu zwei Größenordnungen, jedoch wurden bisher keine deutlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede gefunden. (Guengerich, 2007; Gibson, 2002;Waxman, 1999)

# A.5.6.1 Struktur

Die humane CYP3A-Genbatterie ist auf dem Chromosom 7 beheimatet und kodiert für die ca. 50 kDa großen Isoenzyme mit 502 bzw. 503 Aminosäuren. Vom CYP3A4 sind mittlerweile 24 Variationen bekannt, von denen einige erhöhte oder verminderte katalytische Aktivitäten besitzen. Die Isoenzyme der Ratte mit Größen von 497-502 Aminosäuren werden auf dem Chromosom 12 kodiert. (CYP-Allele-Homepage; CYP-Homepage)

# A.5.6.2 Induktion über PXR

Bei der Regulation der Transkription von CYP3A spielt der Pregnane X Receptor (PXR) eine ganz wesentliche Rolle. Dieser nukleäre Rezeptor, der von drei Forschergruppen fast gleichzeitg entdeckt wurde, wird auch Pregnane-activated Receptor (PAR) oder Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) bezeichnet. (Bertilsson, 1998; Blumberg, 1998) Die DNA-Bindungsdomänen der PXR Orthologen der Säugetiere sind mit mehr als 95% Identität in der Aminosäuresequenz hochkonserviert. Die Ligandenbindungsdomänen zeigen dagegen im Vergleich mit anderen Kernrezeptoren eine weitaus größere Interspeziesdivergenz. (Gibson, 2002)



Abbildung 8: Induktionsmechanismus von CYP3A

PXR befindet sich konstitutiv im Zellkern und wird durch Ligandenbindung aktiviert, um mit RXR ein Heterodimer zu bilden. Dieses bindet an Sequenzen des "xenobiotic responsive element module" (XREM) in den distalen oder / und proximalen Promoterregionen der CYP3A-Isoenzyme. Die für das Heterodimer in Betracht kommenden Sequenzen sind DR-3 (direct repeat), DR-4, ER-6 (everted repeat) und ER-8 –Elemente. Die Interaktion des Heterodimers mit weiteren Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren wie SRC-1(steroid hormone receptor coactivator-1), RIP140 (receptor interacting protein 140) und TRIP1 (thyroid hormone receptor interacting protein 1) führt letztendlich zur Transkription der Strukturgene, vgl. Abbildung 8. Der Glucocorticoidrezeptor (GR) beeinflusst im Menschen die Transkription von CYP3A direkt und indirekt. Zum einen kann der aktivierte Rezeptor an ein GR-responsives Element in der Promoterregion von CYP3A binden und somit die PXR-vermittelte Induktion verstärken, zum anderen besitzt das PXR-Gen ein GR-responsives Element in seiner Promoterregion und erhöht somit bei Aktivierung des GR die Transkriptions- und Expressionsrate von PXR. (Kliewer, 2002; Gibson, 2002)

So wie PXR als Heterodimer mit RXR an die Promoterregion von CYP2B binden kann, führt eine Bindung des Heterodimers CAR-RXR an die Promoterregion von CYP3A zur Expressionssteigerung von CYP3A-Isoenzymen. (Pascussi, 2003)

## A.5.6.3 Wirkungen

Bei der Suche nach Polymorphismen im CYP3A4 Gen wurden inzwischen 24 Allelvarianten identifiziert, von denen mehrere mit unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten assoziiert sind. Zusätzlich führen interindividuelle Belastungen mit CYP3A-Induktoren / Inhibitoren zu einer großen Breite an CYP3A Expressionsraten. (Gibson, 2002; CYP-Allele-Homepage)

Beinahe 60% aller gegenwärtig eingesetzten Medikamente werden zumindest teilweise durch CYP3A verstoffwechselt. Möglicherweise ist CYP3A darüber hinaus an der Entstehung von Prostatakrebs und Leukämie durch eine Bioaktivierung von Procarcinogenen wie Aflatoxin B, polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs), N-Nitrosaminen und 6-Aminochrysen beteiligt. Neben dieser zentralen Rolle im Xenobiotikametabolismus ist CYP3A4 auch am Stoffwechsel endogener Steroide wie Testosteron und Progesteron, aber auch Gallensäuren und deren Metabolite beteiligt. (Wolbold, 2004; Nebert, 2002)

# A.6 Ziele der Arbeit

Aufgrund des hohen Verbrauchs und der mittlerweile ubiquitären Verteilung von bromierten Flammschutzmitteln (BFRs) soll das Risiko dieser für Mensch und Umwelt innerhalb des F.I.R.E. (Flame retardants Integrated Risk assessment for Endocrine disruption) -Projekts abgeschätzt werden können. F.I.R.E. ist ein Projekt, das von der Europäischen Kommission innerhalb des 5. Rahmenprogramms gefördert wurde. Dabei untersuchen europäische Projektpartner verschiedene Einflussbereiche von BFRs. Im Gesamtprojekt soll eine Risikoabschätzung von ausgewählten BFRs durch Bewertung von Daten aus Expositionsanalysen, ökotoxikologischen Studien, Studien an der Ratte und toxikokinetischen Untersuchungen ermöglicht werden. Als Teilprojekt von F.I.R.E. sollen die BFRs hinsichtlich ihres Einflusses auf ausgewählte Leberenzyme der Ratte untersucht werden.

Innerhalb des Fremdstoffmetabolismus nehmen die Cytochrom P450 Enzyme eine wichtige Position ein. Zum einen sind sie Metabolisierer einer großen Klasse von Fremdstoffen und dementsprechend aus der Entgiftung nicht wegzudenken. Andererseits spielen im Fremdstoffemtabolismus auch den Körper schädigende Reaktionen eine Rolle. Hinzukommend dienen die Enzymfamilien CYP1A, CYP2B und CYP3A als Markerenzyme zur Detektion von AhR, CAR oder PXR regulierten Transkriptionsmechanismen.

In der vorliegenden Arbeit soll somit im Bereich der Phase I des Fremdstoffmetabolimus geklärt werden, ob die Expression der Cytochrom P450 Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A durch die ausgewählten BFRs beeinflußt wird.

Auf RNA und Proteinebene, sowie erweitert auf Enzymaktivitätsebene sollen für die Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A *in vivo* Dosisprofile in der Leber erstellt werden. Dazu sollen männliche und weibliche Ratten subakut mit den Flammschutzmitteln TBBPA, HBCD, Pentamix und Decamix behandelt werden.

Weitere Untersuchungen für HBCD und den Pentamix dürfen sich *in vitro* anschliessen. Dabei sollen *in vivo*-ähnliche Bedingungen mit Primärhepatozyten der Ratte geschaffen werden, um eine Beziehung von subakut *in vivo* und Kurzzeit *in vitro* zu ermöglichen.

# **B** Material und Methoden

# **B.1** Materialien

# B.1.1 Geräte

Für die Experimente wurden die folgend aufgeführten Geräte benutzt.

Gerät	Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav 500	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Brutschrank	Heraeus B 5060 E CO2	Heraeus, Hanau, D
Brutschrank	Köttermann 2737	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, D
Eagle Eye	Eagle Eye II	Stratagene, Heidelberg, D
Gelkammern	PROTEAN II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Gelkammern	Easy-CastTM Model ,B1A	AGS, Heidelberg, D
Gelkammern	Horizon 11-14	Gibco BRL, Eggenstein, D
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf, D
Homogenisator	RZ R2100	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, D
iCycler	iCycler Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Lumilmager	Lumilmager	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Luminometer	Luminat LB 9507	EG&G Berthold, D
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, D
Microplate Reader	Model 450	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mikroskop	Leica DM IRB	Leica, Wetzlar, D
Nanodrop	ND-7000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Photometer	Uvikon Spectrophotometer 930	Kontron, München, D
Schüttelinkubator	INFORS H T	INFORS AG, Bottmingen/Basel, CH
Schüttler	Edmund Bühler TH 30	Johanna Otto GmbH, Hechingen, D
Spannungsgeräte	Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Spannungsgeräte	Power Supply ST 305	Gibo BRL, Eggenstein, D
Sterilbank	UVF 6 125	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, D
Transillumintator	2020E UV/white	Stratagene, Heidelberg, D
Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery 90 SE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ultrazentrifuge	Optima TL	Beckman, München, D
UV-Tisch	Biometra FLX 20M	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee Cedex 1, F
Waage	BP 2105	Sartorius AG, Goettingen, D
Waage	BP 4105	Sartorius AG, Goettingen, D
Wasserbad	GFL	Fischer/ Merck, Frankfurt, D
Zentrifuge	Kühlzentrifuge (JA-14)	Beckman, München, D
Zentrifuge	Kühlzentrifuge (JA-2550)	Beckman, München, D
Zentrifuge	Microfuge R	Beckman, München, D
Zentrifuge	Zentrifuge GS-6R	Beckman, München, D

Tabelle 6: Geräteliste

# B.1.2 Chemikalien

Die Flammschutzmittel wurden industriell für Anwender hergestellt und wurden über das BSEF (The Bromine Science and Environmental Forum) bezogen. Sie entsprechen nicht analytisch reinen Anforderungen. Der Deca- und der Pentamix wurden in der Gruppe von Prof. Åke Bergman am Karolinska-Institut (Stockholm, Schweden) aufgereinigt. TBBPA enthält laut HPLC-Analyse der Gruppe um Bergman 99,17% TBBPA und Kontaminationen mit tribromo-BPA. HBCD enthält 10,3% alpha-, 8,7% beta und 81,0% gamma –HBCD.

Der Pentamix enthält 42% BDE-47, 34% BDE-99, 9% BDE-100, 2% BDE-153, und 2% BDE-15. Als Kontaminanten wurden bei Oekometric (Bayreuth) zusätzlich noch 0,053 ng 2,3,7,8-Tetrabromodibenzofuran in einem Milliliter einer 100 mM Pentamixlösung in DMSO gefunden, was einer Verunreinigung von ca. 0,0001% entspricht.

Andere verwendete Chemikalien sind in folgender Liste zusammengetragen.

Chemikalie	Hersteller/Bezieher
Acetonitril	Merck, Darmstadt, D
Acrylamid-Mix (rotiphorese 30)	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein, D
Amidoschwarz	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, D
APS	Merck, Darmstadt, D
Bradfordlösung (Dye reagent concentrate Protein assay)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
BSA (Bovin Serum Albumin)	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt/Main, D
Butanol	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Collagenase Typ IV	Sigma, Deisenhofen, D
DEPC (Diethyl Pyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen, D
Desoxyribonucleotide (dNTP's)	Pharmacia, Freiburg, D
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm, D
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Dinatrium-EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Dinatrium-NADPH	Sigma, Deisenhofen, D
DMEM-Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EDTA (Ethylen-Diamin-Tetraacetat)	Merck, Darmstadt, D
EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- N,N,N'N'-tetraacetat)	Sigma, Deisenhofen, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, D
Ethoxyresorufin	Sigma, Deisenhofen, D

FKS (Fötales Kälberserum)	Gibco BRL, Eggenstein, D
Fluorescamin	AppliChem, Darmstadt, D
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt, D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Formamid	Merck, Darmstadt, D
Glukose	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Sigma, Deisenhofen, D
Ham's F12 Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Heparin	Serva, Heidelberg, D
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-	Both Karlaruba D
N'-2-hydroxy-propan-3-sulfonsäure)	Roti, Ransiule, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, D
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH, Gelsenkirchen, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, D
Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg, D
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt, D
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Merck, Darmstadt, D
NADP+	Sigma, Deisenhofen, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natrium-Kalium-Tartrat	Merck, Darmstadt, D
Natrium-Resorufin	Sigma, Deisenhofen, D
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Pentobarbital	Sigma, Deisenhofen, D
Pentoxyresorufin	Sigma, Deisenhofen, D
Phenobarbital	Sigma, Deisenhofen, D
Phenol	Roth, Karlsruhe, D
Phenolrot	AppliChem, Darmstadt, D
Primer (verschiedene)	MWG-Biotech AG, Ebersberg, D
SDS (Natriumdodecvlsulfat)	Merck. Darmstadt. D
TCDD	Ökometric, Byreuth, D
TEMED	Serva, Heidelberg, D
Tris (Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe, D
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, D
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, D

Tabelle 7: Chemikalienliste

# B.1.3 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer sind soweit nicht anders angegeben in Wasser gelöst. Dafür wurde nur bidestilliertes Wasser benutzt. Für Versuche unter sterilen Bedingungen wurde das Wasser vor Einsatz sterilisiert.

# B.1.3.1 In vitro Studien

0,9% ige NaCI-Lösung: 0,9% (m/m) NaCI in H<sub>2</sub>O (entspricht ca. 0,15 mM NaCI)

Pentobarbitallösung:

33 mg/ml in H<sub>2</sub>O Ansatz frisch vor Gebrauch

Heparinlösung:

Heparin 1000 U / ml in steriler 0,9 %iger NaCl Lagerung bei 4°C

Perfusionslösung I	Perfusionslösung II	Waschpuffer
0,1 m NaCl	10 mM Hepes (pH 7,4)	10 mM Hepes (pH 7,4)
4 mM KCl	1% Penicillin (10000 U) /	1% Penicillin (10000 U) /
1 mM MgSO₄	Streptomycin (10 mg/ml)	Streptomycin (10 mg/ml)
$1 \text{ mM KH}_{2 p}O_4$		10% FKS
20 mM NaHCO₃		
15 mM Hepes	ad 500 ml	ad 500 ml
8 mM Glukose	DMEM / Ham's F12 (1:1)	DMEM / Ham's F12 (1:1)
1 mM EGTA		

Tabelle 8: Perfusionslösungen

Kollagenlösungen:

Gebrauchslösung für Single-Layer:0,5 mg/ml Protein in 0,1%ig EssigsäureGebrauchslösung für Sandwich:1,65 mg/ml Protein in 0,1%ig Essigsäure

Neutralisierungspuffer:

Lösung 1:

0,164 m Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,036 M NaH₂PO₄ 1,5 M NaCl 50 mg / I Phenolrot pH 7,4 Sterilfiltration und Lagerung bei 4°C Lösung 2: 1 M NaOH Frisch vor Gebrauch Mischung der Lösung 1 : Lösung 2 im Verhältnis 5:1

#### Serumfreies Nährmedium:

DMEM

1% Penicillin1% StreptomycinLagerung bei 4°CVor Gebrauch Erwärmung auf 37°C

#### Serumhaltiges Nährmedium:

DMEM 10 Vol% FKS 1% Penicillin 1% Streptomycin Lagerung bei 4°C Vor Gebrauch Erwärmung auf 37°C

### B.1.3.2 Mikrosomen

50 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer(pH 8,0): 47,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 2,6 mM NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O pH 8,0 Lagerung bei 4°C

50 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH 7,6): 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O pH 7,6

M-Puffer:

50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7,6) 1 mM Na₂EDTA pH 7,6

#### Proteinbestimmungen

Lowry A:

180 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
1,3 mM Na-K-Tartrat
0,6 μM CuSO<sub>4</sub>
Frische Herstellung der Lösung vor Gebrauch

Lowry B: 50 Vol% Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz in Wasser

## B.1.3.3 RNA

75% ige Ethanollösung: 75 Vol% EtOH in H<sub>2</sub>O

DEPC-H<sub>2</sub>O: 0,1% DEPC in H<sub>2</sub>O Rühren über Nacht, anschließende Autoklavierung

50\*TAE-Lösung:

1,5 M Tris-HCl 55 Vol% Essigsäure 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA pH 8,5

Gelladepuffer:

50 Vol% Glycerol 10 Vol% 50xTAE 40 Vol% DEPC-H<sub>2</sub>O Zur Färbung Spatelspitze Bromphenolblau Lagerung bei 4°C

#### 10xMOPS:

200 mM MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) 50 mM Natriumacetat 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA pH 7,4 Sterile Filtration und lichtgeschützte Lagerung bei Raumtemperatur

1xMOPS: Verdünnung der 10xMOPS-Lösung 1:10 in DEPC-H<sub>2</sub>O

Denaturierungspuffer:

345 μl Formamid
120 μl Formaldehyd
35 μl 10xMOPS
11,5 μl DEPC-H<sub>2</sub>O
5,5 μl Ethidiumbromid
Frische Herstellung vor Gebrauch

## B.1.3.4 Enzymaktivität

50 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer(pH 8,0): 47,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 2,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O pH 8,0 Lagerung bei 4°C

#### Fluorescaminlösung:

150 μg / ml Fluorescamin in Acetonitril Frische lichtgeschützte Herstellung

#### NADPH-Lösung:

11,2 mg/ml Na₄-NADPH in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0)Lagerung der aliquotierten Lösung lichtgeschützt bei -20°C

#### ER-Lösung:

253 μg / ml Ethoxyresorufin in MeOH
Lagerung der aliquotierten Lösung lichtgeschützt bei -20°C
Vor Gebrauch Verdünnung in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0)
90 μl ER in MeOH in 2,61 ml NaP<sub>i</sub>

#### PR-Lösung

μg / ml Pentoxyresorufin in MeOH
 Lagerung der aliquotierten Lösung lichtgeschützt bei -20°C
 Vor Gebrauch Verdünnung in 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0)
 90 μl PR in MeOH in 2,61 ml 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0)

BSA-Standardlösung:

2 mg/ml in 50 mM NaPi (pH 8,0)

Lagerung der aliquotierten Lösung bei -20°C

Resorufin-Standardlösung (140 µM):

33 mg / I Na-Resorufin in MeOH
Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
Vor Gebrauch Verdünnung in 50 mM NaPi (pH 8,0)
25 µl Resorufin in MeOH in 975 µl 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8,0)

2xNADPH / KPO<sub>4</sub>-Lösung:

2,6 mM NADP<sup>+</sup>
6,6 mM Glucose-6-Phosphat
6,6 mM MgCl<sub>2</sub>
400 mM KPO<sub>4</sub> (pH 7,4)
Lagerung bei Raumtemperatur
Frisch vor Gebrauch Zugabe von 0,4U / ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Aus dem P450 Glo-Kit (Promega) wurden folgende Reagentien benutzt:

Luciferin-Benzylether (5 mM) Luciferin-Detektionsreagenz (lyophilisiert) P450-Glo-Puffer

Luciferin-Detektionsreagenz:

Lösung des Pulvers nach Anweisung des Herstellers im P450-Glo-Puffer

4xSubstrat-Reaktionsmix: 200 µM Luciferin-Benzylether in H<sub>2</sub>O

## B.1.3.5 Western Blot

Trenngel (15%)	Sammelgel (6%)
2,3 ml H <sub>2</sub> O	2,7 ml H <sub>2</sub> O
2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml Tris (0,5 M, pH 6,8)
5 ml Acrylamid / Bis 30:0,8	1 ml Acrylamid / Bis 30:0,8
100 µl 10%iges SDS	50 µl 10%iges SDS
100 µl 10%iges APS	50 µl 10%iges APS
4 µl TEMED	2 µÎ TEMED
Taballa O. Oslava and a stava a	

Tabelle 9: Gelzusammensetzung

3xLämmli-Puffer:

160 mM Tris (pH6,8)

0,4 M SDS

12,5 Vol% Glycerin

Zur Färbung Spatelspitze Bromphenolblau

Lagerung bei -20°C

direkt vor Gebrauch Zugabe von 1 Vol% Mercaptoethanol in die Lösung

Elektrophoresepuffer	TBS	TBS-T
100 mM Glycin	130 mM NaCl	130 mM NaCl
12,5 mM Tris	20 mM Tris	20 mM Tris
0,05 Vol% SDS	pH 7,4	pH 7,4
рН 8,3		0,1Vol% Tween-20

Anoden-Puffer I	Anoden-Puffer II	Kathoden-Puffer
300 mM Tris	25 mM Tris	40 mM Glycin
10 Vol % MeOH	10Vol% MeOH	25 mM Tris
pH 10,4	pH 10,4	20 Vol% MeOH
		0,005 Vol% SDS
		pH 9,4

#### Tabelle 10: Puffer für Western Blot

5% ige Milchpulverlösung: 5% (m / m) Milchpulver in TBS gelöst

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
anti-rat CYP1A	1:5'000	anti	1:10'000
anti-rat CYP2B	1:5'000	anti	1:10'000
anti-rat CYP3A	1:5'000	anti	1:10'000

Tabelle 11: Antikörperverdünnung in TBS

## B.1.3.6 Real Time PCR

Aus den Kits wurden folgende Reagenzien benutzt.

iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad)	Reverse-iT 1st Strand Synthesis Kit(ABgene)
5x iScript Reaktionsmix	Random Decamers (400 ng / µl)
nukleases freies H <sub>2</sub> O	dNTP Mix (5 mM pro Nukleotid)
iScript Reverse Transkriptase	DTT(100 mM)
	Reverse-iT RTase Blend (50U / µl)

#### Tabelle 12: PCR-Kits

Die Kits iQSupermix (Biorad) und ABsolute QPCR SYBR Green Mix (ABgene) enthielten nur das SYBR Green enthaltende Röhrchen mit dem vollständigen Reaktionsgemisch ohne cDNA.

# B.1.4 Kits

P450 Glo CYP3A4 Assay	Promega
iScript cDNA Synthesis	Biorad
iQ Supermix	Biorad
Reverse-iT 1st Strand Synthesis	ABgene
ABsolute QPCR SYBR Green Mix	ABgene

# B.1.5 Software

Graph Pad InStat v.3.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Graph Pad Prism v.4.03	GraphPad Software, San Diego, USA
Origin Pro v.7.5	OriginLab, Northampton, USA
Chem Draw v.10.0	CambridgeSoft, Cambridge, USA
DNAMAN v.5.1.5	Lynnon, Vaudreuil-Dorion, Kanada
GenBank	National Library of Medecine, Bethesda, USA
Entrez	National Library of Medecine, Bethesda, USA
Beacondesigner v.3.0	PREMIER Biosoft, Palo Alto, USA
iCycler IQ v.3.1	Biorad, Hercules, USA
Ascent Software v.2.6	Thermo Labsystems, Waltham, USA

Die Datenverwaltung und Berechnung erfolgte mithilfe der MS-Office-Anwendung Excel. Teilweise wurden für Berechnungen die Softwares Origin und Prism herangezogen. Statistische Auswertungen erfolgten mittels InStat. Zur Sequenzrecherche und Primersuche wurden die Programme Beacondesigner, DNAMAN und die Internetanwendung Entrez benutzt. Auf den öffentlichen Teil der Gendatenbank GenBank wurde über Entrez zugegriffen.

Mittels der gerätesteuernden Programme wurden die Parameter für die Versuche am Fluoroskan, iCycler bzw. Lumi-Imager festgelegt und die Rohdaten aus den Versuchen abgelesen.

# B.2 In vivo Studien

Da diese Studien innerhalb des von der EU geförderten F.I.R.E.-Projekts angelegt wurden, beteiligten sich an der Analyse der einzelnen Rattenorgane mehrere Arbeitsgruppen in Europa. Die Tierhaltung, Behandlung und Nekropsie der Ratten fand teils unter meiner Beobachtung in den Einrichtungen des Rijksinstituut voor Volkesgezondheid en Milieu (RIVM) in Bilthoven (Niederlande) statt. Die Organe wurden nach Entnahme den einzelnen Arbeitsgruppen zur weiteren Analyse gesendet.

# B.2.1 Studiendesign und Tierhaltung

Für die Studien wurden männliche und weibliche Ratten des Stammes WU (CBP) eingesetzt. Dies sind Albino-Ratten des Stammes Wistar, die am Central Institute for Breeding of Laboratory Animals in den Niederlanden via Inzucht weiter gezüchtet wurden. Die Studien wurden gemäß der OECD-Richtlinie 407 "Wiederholte Dosis – 28 Tage- Orale Toxizitätsstudie in Nagern" durchgeführt. Die Ratten waren zum Startpunkt der Studien etwa acht Wochen alt und gesund. Sie hatten bei 12h / 12h Tag-Nacht-Rhythmus unter künstlichem Licht freien Zugang zu Wasser und Standardfutterpellets mit Soja (Hope Farms / Arie Blok Diervoeding, Niederlande). Die Ratten wurden geschlechtsgleich, zu zweit in Makrolonkäfigen gehalten. In subakuten Toxizitätsstudien wurde den Ratten über 28 Tage die bromierten Flammschutzmittel TBBPA, HBCD, Pentamix oder Decamix in verschiedenen Dosen oral verabreicht.

## B.2.1.1 TBBPA-Studie

Bei der TBBPA-Studie wurde TBBPA in verschiedenen Dosen dem Standardfutter zugemischt. Der Vorteil dieser Form der oralen Verabreichung liegt in der Vermeidung von Stress für die Ratten. Außerdem mussten keine Lösungsmittel eingesetzt werden. Durch den freien Zugang zum Futter findet die Aufnahme von TBBPA über einen längeren Zeitraum verteilt statt. Dieser Versuchsansatz ist dem natürlichen Aufnehmen der Fremdstoffe über die Nahrung nachempfunden. Nachteilig ist, dass für die Ratten nur durchschnittliche Verbrauchsmengen des TBBPA-haltigen Futters berechnet werden konnte und die Ratten unterschiedlich viel Futter zu sich nahmen. Somit entsprach die Einteilung der Dosisgruppen anhand des vermuteten täglichen Futterverbrauchs nicht exakt der aufgenommenen Menge an TBBPA. Die unbehandelten männlichen und weiblichen Kontrollgruppen von je zehn Tieren erhielten Standardfutter ohne Zusatz. Die anderen weiblichen und männlichen Gruppen à zehn Tieren erhielten dem Standardfutter zugemischtes TBBPA in den vorkalkulierten Dosen 30, 100 bzw. 300 Milligramm je Kilogramm Körpergewicht pro Tag (mg/kg KG/d).

## B.2.1.2 HBCD-Studie

Bei der HBCD-Studie wurde HBCD in Aceton und dann in verschiedenen Dosen in Maiskeimöl gelöst, das Aceton evaporiert und die HBCD-Lösung den Ratten oral per Schlundsonde in den Magen gespritzt. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge an Maiskeimöl. Die Dosisgruppen von 0 / 0,3 / 1 / 3 / 10 / 30 / 100 bzw. 200 mg HBCD/kg KG/d wurden von je fünf weiblichen und männlichen Ratten besetzt. Vorteil dieser oralen Verabreichung ist die exakte Dosierung des Flammschutzmittels. Allerdings muss dafür in Kauf genommen werden, dass die erhöhte Energiezufuhr mit hochkalorischem Fett mit einer überdurchschnittlichen Gewichtszunahme einhergeht. Ebenso bedenkenswert ist, dass die punktuelle Aufnahme der ganzen Tagesration an HBCD am frühen Morgen eine vollständige Aufnahme von HBCD in den Körper im Vergleich zur Aufnahme in kleinen Portionen erschweren könnte.

## B.2.1.3 Pentamix-Studie

Der industriell hergestellte Pentamix bestehend aus den Hauptkomponenten BDE-47, BDE-99, BDE-153 und BDE-154 wurde in der Gruppe von Prof. Åke Bergman am Karolinska-Institut (Stockholm, Schweden) aufgereinigt, um einen Einfluss der Kontaminanten (Furane, Dioxine) auf die Versuchsergebnisse zu unterbinden. Dieser aufgereinigte Pentamix wurde in Maiskeimöl gelöst - den weiblichen und männlichen Ratten in verschiedenen Dosen per Schlundsonde verabreicht. Jede Dosisgruppe mit 0 / 0,27 / 0,82 / 2,47 / 7,4 / 22,2 / 66,7 bzw. 200 mg Pentamix pro kg KG pro Tag enthielt fünf Tiere. Die Dosisgruppe 0 mg/kg KG enthielt im verabreichten Maiskeimöl keinen Pentamix und wurde bei den weiblichen und männlichen Gruppen als jeweilige Kontrollgruppe geführt.

## B.2.1.4 Decamix-Studie

Der industriell hergestellte Decamix besteht zu 99,9% aus dem zehnfach bromierten Diphenylether BDE-209. In der Gruppe von Prof. Åke Bergman wurde dieser - gleichfalls wie der Pentamix aufgereinigt und in Maiskeimöl gelöst - den weiblichen und männlichen Ratten oral per Schlundsonde verabreicht. Die Dosisverteilung für jede Gruppe mit fünf weiblichen bzw. männlichen Tieren gestaltete sich wie folgt. Sechs weiblichen und männlichen Gruppen wurde eine tägliche Portion Maiskeimöl mit 0 / 1,87 / 3,75 / 7,5 / 15 bzw. 30 mg Decamix pro kg Körpergewicht verabreicht. Je eine weibliche und männliche Gruppe erhielt zweimal täglich eine Portion Maiskeimöl mit je 30 mg Decamix/kg KG, also insgesamt 60 mg/kg KG/Tag, und je einer weiteren männlichen und weiblichen Gruppe wurde zum Vergleich ebenfalls zweimal täglich Maiskeimöl, aber ohne Decamix verabreicht. Insgesamt waren acht Gruppen je Geschlecht à fünf Tiere in die Studie eingeschlossen.

# **B.2.2** Nekropsie und Versenden der Leber

Die Ratten wurden nach 28 Tagen Behandlung mit den jeweiligen Flammschutzmitteln mit CO<sub>2</sub> narkotisiert und anschließend die jeweiligen Gewebe entfernt. Die Nekropsie wurde für weibliche Ratten auf einen Tag der Diöstrus-Phase gelegt. Damit wird ein Einfluss des natürlichen zyklisch schwankenden Hormonspiegels der Geschlechtshormone auf die Bestimmung von Enzymen oder anderen Zell- und Körperbestandteilen, die über den Hormonzyklus reguliert werden, vermieden.

Mindestens zwei Gramm eines Leberlappens wurden in kleine Aluminiumbehältnisse verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Versendung wurden die Behältnisse bei -80°C gelagert, um dann innerhalb von maximal fünf Tagen auf Trockeneis an der Universität Kaiserslautern anzutreffen. Dort wurden die Behältnisse wieder bei -80°C bis zur Aufarbeitung von RNA und Mikrosomen gelagert.

# B.3 In vitro Studien

Durch Kultivierung von frischen Leberparenchymzellen, so genannten Primärhepatozyten, aus der Ratte wird sichergestellt, dass Mutationen, die bei aus Hepatomen isolierten Zelllinien vorhanden sind, keinen Einfluss auf das Experiment haben. Der Fremdstoffmetabolismus in isolierten Primärhepatozyten entspricht weitestgehend den Gegebenheiten in der Leber eines lebenden Tieres. Die durch die Perfusionsmethode auftretenden Stressreaktionen in den Zellen müssen allerdings hingenommen werden.

# B.3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Zur Rattenleberperfusion wurden männliche Ratten des Stammes "Wistar" von Charles River GmbH bezogen, im Tierhaus der Universität Kaiserslautern in Makrolonkäfigen gehalten und über einige Generationen weitergezüchtet. Die Ratten waren künstlicher Tag-Nacht-Beleuchtung (12h / 12h) ausgesetzt und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutterpellets (Altromin, Lage). Zur Perfusion wurden Ratten mit einem Körpergewicht von 140-200g Körpergewicht verwendet.

# B.3.2 *In situ* Perfusion und Präparation von Hepatozyten

Die Hepatozyten aus der Rattenleber wurden mit einer zweistufigen in situ Perfusion, modifiziert nach Seglen (1976) isoliert. Dafür wurden das Präparierbesteck, das

Schlauchsystem, Glasbehältnisse, Filternetze und hitzebeständige Lösungen autoklaviert und nicht hitzebeständige Lösungen sterilfiltriert. Die Lösungen wurden bei 4°C gelagert. Vor Beginn der Perfusion wurden die Perfusionslösungen im Wasserbad bei 42°C entsprechend der Körpertemperatur der Ratte erwärmt und der Waschpuffer auf Raumtemperatur gebracht.

Die Ratte wurde durch eine intraperitonale Injektion einer Pentobarbitallösung (3 ml / kg KG) anästhesiert und bei Narkosewirkung auf dem Operationstisch fixiert. Der Bauchraum wurde bis zum Stenum geöffnet, die Leber freigelegt und das Antikoagulanz Heparin (1 ml / kg KG) in die untere Hohlvene (Vena cave inferior) zur Vermeidung der vorzeitigen Blutgerinnung injektiert. Zur späteren Fixierung wurden je eine lockere Ligatur um die Hohlvene und um die Pfortader (Vena porta hepatica) gelegt. Direkt nach Einführen und Fixieren der Braunüle in die Pfortader zur Infusion von Perfusionslösung in die Leber wurde die untere Hohlvene durchtrennt, um das Abfließen von Blut und Perfusionslösung aus der Leber zu ermöglichen. In der ersten Stufe wurde die Leber für ca. 10 min mit dem EGTA-haltigen Perfusionsmedium I bei einer Durchflussrate von 40 ml / min über die Braunüle in der Pfortader durchspült. Durch Chelatbildung entzieht EGTA dem Zellverband Ca<sup>2+</sup>-Ionen und löst somit die Desmosomen.

In der zweiten Stufe wurde eine zweite Braunüle oberhalb der oberen Hohlvene eingeführt und fixiert, die nach Verschließen der unteren Hohlvene mit einem Abflussschlauch versehen wurde. Nach Wechsel vom Perfusionsmedium I auf das Collagenase- und Ca<sup>2+</sup>-haltige Perfusionsmedium II durch die erste Braunüle in der Pfortader mündet zirkulierend der Abflussschlauch in dem Perfusionsmedium II. Die Durchflussrate beträgt für ca. 5-10 Minuten 40 ml / min. Bei erfolgreichem Verdau des Kollagens durch Kollagenase wird der Parenchymverband der Leber angegriffen und es zeigt sich eine netzartige Oberflächenstruktur des Organs. Dann kann die Leber vorsichtig herauspräpariert und die Leberkapsel auf einem sterilen Seidenfilternetz unter der Sterilbank geöffnet werden. Die Zellen werden mit 200 ml Waschpuffer herausgeschwemmt und durch das Filternetz filtriert. Die Zellsupension wurde auf vier 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 350 rpm und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert (Beckman GS-6R) Das entstandene Zellpellet wurde in 25 ml Waschpuffer resuspendiert und wiederholt zentrifugiert, um tote Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Die Pellets wurden danach resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen in insgesamt ca. 40 ml Waschpuffer vereinigt.

# B.3.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die quantitative Bestimmung der lebenden und toten Zellen erfolgte lichtmikroskopisch in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bei 10 facher Vergrößerung. Dazu wurden 10 µl der durchmischten Zellsuspension in Waschpuffer 1:100 verdünnt. Und auf die Kammer unter das Deckgläschen aufgebracht. Die Zellen von drei verschiedenen Feldern mit jeweils 16 Kleinstquadraten wurden ausgezählt, gemittelt und die Dichte Gesamtzellen (lebende und tote) nach untenstehender Formel bestimmt.

Die Bestimmung der toten Zellen erfolgte mittels Trypanblau-Färbung. Das Blau kann in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen und ermöglicht so die lichtmikroskopische Detektion. Hierzu wurde ein Aliquot einer 10 fachen Verdünnung der Zellsuspension mit einem Aliquot Trypanblau versetzt und in der Fuchs-Rosenthal-Kammer die blauen Zellen ausgezählt. Die Dichte der toten Zellen wurde nach gleicher Formel mit zweitem Verdünnungsfaktor bestimmt.

$$Zellzahl/ml = \frac{GZ*80*1000*V_f}{16}$$

I 6 GZ: gemittelte Zellzahl in einem Feld 16: ausgezählte Kleinstquadrate 80: Kammerfaktor der Fuchs-Rosenthal-Kammer 1000: Umrechnung von μl auf ml V<sub>f</sub>: Verdünnungsfaktor (100 bzw. 20)

Die Dichte der Lebendzellen berechnet sich durch Subtraktion der Zelldichte der toten Zellen von der Gesamtzelldichte. Der Quotient aus Anzahl lebender Zellen und Gesamtzellzahl bildet den Vitalitätsfaktor. Zur Gewährleistung einer erfolgreichen Versuchsdurchführung wurden nur Zellpräparationen mit einem Vitalitätsfaktor von mindestens 85% eingesetzt.

# B.3.4 Herstellung einer Kollagenlösung

Zur Herstellung einer Kollagenlösung wurden ca. 20, bei –20°C gelagerte, Rattenschwänze verwendet. Die aufgetauten Schwänze wurden mit Ethanol (70 %) desinfiziert, unter der Sterilbank gehäutet und die Kollagenfasern von der Schwanzspitze her mit einer Pinzette herausgezogen. Es erfolgte eine Trocknung der Fasern unter UV-Licht über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Fasern verrieben und in einer Petrischale nochmals unter UV-Licht über Nacht sterilisiert. Die Fasern sind in einer Petrischale verschlossen bei -20°C lagerfähig.

Zur Herstellung einer Kollagen-Stocklösung unter sterilen Bedingungen wurden 2g der Fasern in einen Erlenmeyerkolben überführt und unter Rühren für eine Stunde mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Dieser Waschschritt wurde nach Wasserwechsel für eine halbe Stunde wiederholt und die gereinigten Fasern in eine Flasche überführt. Unter Rühren wurden die Fasern in einer 500 ml Lösung aus 0,1%iger Essigsäure innerhalb von 24h gelöst. Bei der anschließenden Zentrifugation für 3 Stunden bei 4°C und 3700 rpm (Beckman GS-6R) werden nicht gelöste Bestandteile abgetrennt und danach der Proteingehalt mittels der Methode nach Bradford bestimmt.

Die Kollagen-Gebrauchslösung für Single-Layer-Kollagenschichten wurde auf 0,5 mg/ml und für Sandwich-Layer auf 1,65 mg/ml mit 0,1%iger Essigsäure eingestellt. Beide Gebrauchslösungen sowie die Stocklösung sind bei 4°C lagerfähig.

# B.3.5 Kultivierung auf Single-Layer-Kollagenschicht

Die Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 94 mm wurden für die Single-Layer-Kultivierung mit einer dünnen Kollagenschicht der niedrig konzentrierten Kollagengebrauchslösung überzogen. Hierzu wurde die Schale mit der Kollagenlösung vollständig bedeckt und die Lösung in die nächste Schale abgegossen. Der verbleibende Kollagenrest bildet die Single-Layer-Kollagenschicht. Die Kulturschalen wurden über Nacht unter UV-Licht steril getrocknet.

Das Nährmedium wird vor Benutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Hepatozyten aus der Perfusion wurden in den kollagenbeschichteten Gewebekulturschalen in serumhaltigem Nährmedium ausgesät. Die Zelldichte auf der Schale betrug 100.000 Zellen/cm<sup>2</sup>. Nach zweieinhalb Stunden Anheftens der Zellen auf der Kollagenschicht bei 37°C im Brutschrank wurde das Nährmedium entfernt und durch frisches ersetzt, welches für die Behandlung der Zellen schon die Testsubstanzen enthielt. Dabei wurden tote Zellen und Zelltrümmer abgewaschen und entfernt. Die weitere Kultivierung bis zum Versuchsende erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

# B.3.6 Kultivierung im Sandwich-Kollagen

Die Kollagen-Gebrauchslösung für Sandwich-Layer wurde im Verhältnis 9:1 auf Eis mit Neutralisierungspuffer gemischt. Zügig wurden 2,25 ml der Mischung je Gewebekulturschale verteilt und so geschwenkt, dass die Mischung sich über den ganzen Boden der Schale verteilt. Dann wurde Die Schicht für 2h im Brutschrank bei 37°C getrocknet und im weiteren Verlauf mit 5 ml serumfreien Nährmedium überzogen. Diese erste Kollagenschicht wurde maximal über Nacht im Brutschrank gelagert bevor die Aussaat der Zellen erfolgte. Die Hepatozyten aus der Perfusion wurden nach vorsichtigem Absaugen des Nährmediums auf der ersten Kollagenschicht mit einer Zelldichte von 200.000 Zellen / cm<sup>2</sup> in serumhaltigem Nährmedium ausgesät. Nach 2,5h wurden die Zelltrümmer und toten Zellen durch Erneuern des serumhaltigen Nährmediums entfernt. Nach Kultivierung im Brutschrank über Nacht wurde am folgenden Tag das Nährmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit der zweiten, zur ersten gleichartigen, Schicht Kollagen-Lösung überzogen. Nach einstündiger Trocknung des zweiten Kollagengels im Brutschrank wurde serumhaltiges Medium auf die Schicht aufgetragen und die Zellen bis zum Versuchsende im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

# B.3.7 Behandlung der Zellen

Die Zellen auf den Single-Layer-Kollagenschichten wurden direkt nach Waschen der Zellen am selben Tag der Aussaat mit verschiedenen Konzentrationen der Flammschutzmittel oder einer der Positivkontrollen Dexamethason, bzw. TCDD behandelt. Dafür wurden die Substanzen zuvor in DMSO gelöst und dann mit einer Endkonzentration von 0,5% DMSO im serumfreien Nährmedium vermischt. Dieses die Substanzen enthaltende Medium wurde sodann auf die gewaschenen Zellen aufgetragen. Die Zellen wurden für weitere 48h im Brutschrank inkubiert. Die Endkonzentration der Substanzen im Medium betrug maximal 10<sup>-4</sup> molar. Für die Positivkontrollen lag die Endkonzentration bei 1 nM für TCDD und 25 µM für Dexamethason. Es wurde immer eine Lösungsmittelkontrolle, die DMSO in gleicher Menge enthielt, sowie eine Medienkontrolle, die nur das serumfreie Nährmedium enthielt, mitgeführt. Das Medienvolumen auf den 94 mm Gewebeschalen betrug 5 ml. Die Inkubationsansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Zellen im Sandwich-Kollagen wurden am zweiten Tag nach der Aussaat gewaschen und ebenso mit den Inkubationsansätzen behandelt. Als Positivkontrolle agierte Phenobarbital, welches zuvor in Wasser gelöst und mit maximaler Endkonzentration von 10<sup>-4</sup> molar eingesetzt wurde. Die Inkubation im Brutschrank dauerte ebenfalls 48h bevor die Zellen geerntet wurden. Das Medienvolumen auf den 94 mm Gewebeschalen betrug im Sandwich-Kollagen 7 ml. Die Inkubationsansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

# B.3.8 Zellernte

Nach 48stündiger Inkubation wurde das Medium auf den Platten mit Single-Layer-Kollagenschicht oder Sandwich-Schicht entfernt und die Zellen mit 0,9%iger NaCl-Lösung zweimal gewaschen. Die Restlösung wurde vorsichtig abgesaugt, bevor die Platten bis zur Aufarbeitung für Mikrosomen- oder RNA-Isolierung bei -80°C gefroren aufbewahrt wurden.

# B.4 Aufarbeitung der Zellbestandteile

# B.4.1 Isolierung der Mikrosomen

Die Isolierung von Mikrosomen aus der Leber erfolgte nach einer modifizierten Methode von Melancon (Melancon, 1996). Aus dem Leberlappen wurde je Versuchstier ein Gramm in einen Glasmörser gegeben und mit 10 ml des gekühlten M-Puffers maschinell auf Eis homogenisiert. Die Supension wurde in ein Zentrifugenröhren überführt und bei 11.000g, 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und in der Ultrazentrifuge bei 100.000g, 4°C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet in ca. 1 ml eines gekühlten NaP<sub>i</sub>-Puffers (pH 7,6) suspendiert und in ein 2 ml Schraubeppi überführt wurde. Zum Suspendieren wurde neben dem Vortexer für einige Sekunden auch die Ultraschallsonde (50 mW) hinzugezogen.

Für die Isolierung der Mikrosomen aus Zellen wurden die in Zellkulturplatten eingefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut. Sodann wurde mit 200 µl des M-Puffers die Zellschicht mittels Zellschabers abgeschabt und in ein 2 ml-Eppi überführt. Zum Nachspülen wurden weitere 200 µl des M-Puffers verwendet. Das Gemisch wurde mittels Pipette und Vortexer suspendiert und den gleichen Zentrifugenschritten, wie oben erwähnt unterzogen. Der Überstand wurde in ein frisches Ultrazentrifugen-Eppi überführt und das Pellet nach Ultrazentrifugation wie zuvor beschrieben in ca.50 µl NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH 7,6) suspendiert. Die Mikrosomensuspensionen wurden nach Proteinbestimmung vor weiterer Verwendung bei -80°C gelagert.

# B.4.2 Proteinbestimmung

## B.4.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Bei der Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach der Methode von Lowry (1951) wird die Reaktion von aromatischen Aminosäuren mit einem Farbreagenz über Kupfer-Proteinkomplexe ausgenutzt. Das dabei entstehende farbige Produkt kann spektrometrisch quantifiziert werden.

5 μl der zu bestimmenden Proben werden parallel zu einer nur Wasser enthaltenden Leerprobe und einer Standardreihe an verschiedenen Konzentrationen von BSA-Lösungen
mit 95 µl Wasser und 100 µl 1 M NaOH-Lösung vermischt. Nach Zupipettierens von 1 ml der Lowry A –Lösung wird geschüttelt und nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 100 µl Lowry B Reagenz hinzugeben, bevor kräftig geschüttelt wird. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Messung gestartet. Die Absorption wird bei 720 nm gegen die Leerprobe bestimmt. Anhand der BSA-Standardkurve wird der Proteingehalt berechnet.

### B.4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (1976) beruht auf der Anlagerungsreaktion von Coommassie Brilliant Blue an das Protein. Es entsteht ein spektrometrisch quantifizierbarer blauer Farbstoff.

3 µl der zu bestimmenden Proben werden parallel zu einer nur Wasser enthaltenden Leerprobe und einer Standardreihe an verschiedenen Konzentrationen von BSA-Lösungen mit 60 µl Wasser verdünnt und in Triplikaten 20 µl davon in eine 96Well Platte pipettiert. Das Coomassie Brilliant Blue enthaltende Bradfordreagenz wird kurz vor Gebrauch mit Wasser 1:5 verdünnt und 200 µl davon in jedes Well gegeben. Nach Vermischung und 30 minütiger Inkubation wird bei 570 nm die Absorption bestimmt. Anhand der BSA-Standardkurve erfolgt für die Proben die Berechnung der Proteinkonzentration.

### B.4.3 Isolierung der RNA

Die RNA-Isolierung aus der Leber erfolgte mittels TRIzol anhand der Herstellerangaben nach einer modifizierten Methode von Chomczynskli und Sacchi (1987).

Aus dem Leberlappen wurde je Versuchstier ein Gramm in einen Glasmörser gegeben und mit 10 ml TRIzol maschinell auf Eis homogenisiert. Zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe wurde das Homogenat noch weitere 5 min in TRIzol bei Raumtemperatur inkubiert bevor das Gemisch in Zentrifugenröhrchen überführt und 2 ml Chloroform hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde sofort per Hand für 15sec kräftig geschüttelt und weitere 2 min inkubiert bei Raumtemperatur. Die vollständige Phasentrennung in die untere Phenol-Chloroform-haltige, die Interphase und die obere RNA-haltige wässrige Phase erfolgte bei der Zentrifugation bei 12.000g, 4°C über15 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen übertragen. Mittels Zugabe von 5 ml Isopropanol und vorsichtigem Kippens des Röhrchens zur Vermischung wurde während einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur die RNA präzipitiert und konnte bei 12.000g, 4°C über 15 min abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde entfernt und das Präzipitat mit 10 ml 75% Ethanol mittels Vortexer kräftig gewaschen. Nach weiterer Zentrifugation bei 7.500g, 4°C für 5 min wurde der Überstand entfernt und die Röhrchen

unter einem Abzug zum Verdampfen des restlichen Ethanols bei Raumtemperatur für ca.10 min gestellt. Die trockene RNA wurde sodann in 1 ml RNase freiem Wasser aufgenommen, mittels Pipettierens solubilisiert, in ein 2 ml Schraubeppi überführt und auf einer Heizplatte bei 60°C für 10 min vollständig gelöst.

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurden die eingefrorenen Zellkulturplatten auf Eis aufgetaut und zügig mit insgesamt 5 ml TRIzol abgeschabt und in einem Glasmörser maschinell homogenisiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie beim Lebergewebe, nur mit halber Menge der Lösungen. Die RNA wurde zum Schluss in 50-200 µl RNase freiem Wasser solubilisiert und ebenso auf der Heizplatte vollständig gelöst Die wässrige RNA-Lösung wurde nach quantitativer und qualitativer Bestimmung vor weiterer Verwendung auf 200 ng/µl in RNase freiem Wasser verdünnt und bei -80°C

gelagert.

## B.4.4 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der RNA

### B.4.4.1 Spektroskopische Messung

Die RNA-Konzentration wurde im Nanodrop gemessen und abgelesen. Dabei wird gegen RNase freies Wasser als Blank die Absorption der RNA-haltigen Lösung über ein Spektrum von 180 bis 300 nm aufgenommen. Aus der Absorption bei 260 nm wird die RNA-Konzentration berechnet. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über die Kontamination der RNA-Lösung mit Proteinen. RNA mit einem 260 nm / 280 nm-Quotienten von 1,8-2,0 wurde weiterverwendet. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 230 nm als Qualitätsmerkmal für Kontamination mit Lösungsmitteln aus der Aufarbeitung der RNA musste für die weitere Verwendung der RNA größer als 1 sein, ansonsten erfolgte eine Aufreinigung mit anschließend wiederholter, qualitativer Bewertung.

### B.4.4.2 Agarose Gel

Zur Bewertung des Degradationsgrades der RNA, verursacht durch RNase, wurde die RNA in einem Formaldehyd-Agarosegels detektiert.

Zur Herstellung des Gels wurde 1,5g Agarose in 108 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gemischt, in der Mikrowelle kurz erhitzt und gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden 15 ml 10xMOPS hinzugegeben und nach Abkühlen unter 40°C 27 ml der37%igen Formaldehydlösung hineinvermengt. Sodann wurde die Lösung in ein Gelbett gegossen, mit einem Kamm für spätere Taschen versehen und blasenfrei aushärten gelassen. Nach ca. 1h wurde das Gel mit 1xMOPS überschichtet und nach zwei weiteren Stunden wurde ein RNA-Mix in die jeweilige Geltasche gefüllt. Dieser bestand aus 6,5 µl RNA-Lösung 15 µl Denaturierungspuffer und 5 µl Gelladepuffer. Vor Auftrag auf das Gel wurde der Mix 10 min bei 65°C erhitzt und sodann bei 5 min auf Eis abgekühlt.

Bei anschließender Elektrophorese bei 80V wanderten die negativ beladenen RNA-Stränge abhängig von ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Kathode. Nach ca. 1-2h waren die RNA-Stränge nach ihrer Größe aufgetrennt und konnten anhand der Form der zwei im UV-Licht sichtbaren Banden nach Degradationsauffälligkeit bewertet werden. Haben die Banden oder einer der beiden Banden einen Schweif vorangeschoben, war dies ein sicheres Zeichen für Degradation und die RNA konnte nicht mehr verwendet werden. Das Absorptionsverhältnis der beiden stark sichtbaren Banden der 28S zur 18S RNA sollte in etwa 2 betragen.

## **B.5** Biochemische Tests

### B.5.1 Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivität kennzeichnet die Fähigkeit eines Enzyms innerhalb einer bestimmten Zeit eine Reaktion mit einer bestimmten Umsetzungsmenge zu katalysieren. Unter der Annahme, dass alle Enzyme eines spezifischen Proteins, die gleiche Umsetzungsrate besitzen, ist die Enzymaktivität mit der Enzymmenge korreliert. Biochemisch wird die Enzymaktivität eines Proteins durch eine ausgewählte Markerreaktion bestimmt. Diese Markerreaktion zeichnet sich durch zugängliche chemische oder physikalische Detektionsmöglichkeiten aus.

### B.5.1.1 EROD

Zur Bestimmung der CYP1A-Aktivität nach einer modifizierten Methode von Kennedy (1995) wird die Fähigkeit des Enzyms zur oxidativen Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin herangezogen. Schon im Namen anklingend bezeichnet die EROD-Aktivität, also 7-Ethoxyresorufin oxidierende Dealkylierungsaktivität, diese Fähigkeit des CYP1A. Bei dieser Reaktion entsteht unter Umwandlung von NADPH zu NADP<sup>+</sup> das fluorometrisch messbare Resorufin. Die Menge an gebildetem Resorufin ist proportional zur vorhandenen Proteinmenge von CYP1A. Zugleich kann der Proteingehalt durch Reaktion mit zugegebenem Fluorescamin fluorometrisch erfasst werden und somit die Aktivität von CYP1A bestimmt werden.

Zur Durchführung der Experimente werden 2-10 µl der auf Eis aufgetauten Mikrosomen aus der Zell- oder Gewebsaufbereitung in 96Well-Platten pipettiert, in gekühltem NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH

8,0) bis zum Volumen von 70 μl solubilisiert und mit 30 μl der lichtgeschützten ER-Lösung vermischt. Im Plattenreader (Fluoroskan) werden die Probengemische bei 37°C für 10 min vorinkubiert, bevor 15 μl der aufgetauten NADPH-Lösung per Dispenser des Gerätes in die jeweiligen Wells der Platte pipettiert werden. Damit startet die katalytische Umwandlung von 7-Ethoxyresorufin. Nach 7 min bei 37°C wird die Reaktion durch automatische Zugabe von 90 μl Fluorescaminlösung abgebrochen. Sodann kann Resorufin bei einer Extinktionswellenlänge (Ex) von 544 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 590 nm detektiert werden. Das ans Protein gebundene Fluorescamin wird im Anschluss bei Ex 390 nm / Em 460 nm bestimmt. Parallel zu den Proben werden Kalibrierproben mit verschiedenen Mengen der Resorufin- und BSA-Standardlösungen vorbereitet und diese zugleich wie die Proben mit NaP<sub>I</sub>-, ER-, NADPH- und Fluorescaminlösungen behandelt. Somit ergeben sich aktuelle Kalibrierkurven für die Protein- und Resorufinbestimmung. Anhand der Kalibrierkurven berechnet sich die Menge an Protein (in Relation zu BSA) und Resorufin in den einzelnen Probenwells.

Zur Berechnung der Aktivität gilt folgende Formel:

$$EROD - Aktivität = \frac{R}{t \times P}$$

R: berechnete Resorufinmenge im Well

P: berechnete Proteinmenge im Well

t: Reaktionszeit (=7 min)

Jede Mikrosomen- und Kalibrierprobe wird in Triplikaten der EROD-Messung unterzogen und die Aktivitäten gemittelt.



Abbildung 9: Oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin bzw. 7-Pentoxyresorufin zu Resorufin durch CYP1A bzw. CYP2B.

### B.5.1.2 PROD

Die CYP2B-Aktivität kann mittels der Fähigkeit, Pentoxyresorufin oxidativ zu Resorufin dealkylieren zu können, bestimmt. PROD ist hierbei die Abkürzung für Pentoxyresorufin oxidierende Dealkylierung. Die Versuchsanleitung unterscheidet sich nur in einem Punkt von der für die Bestimmung der EROD-Aktivität; statt ER-Lösung wird PR-Lösung verwendet. Die Berechnung der Aktivität erfolgt synchron.

### B.5.1.3 LBD

Das Enzym CYP3A kann eine Debenzylierung katalysieren. Diese Eigenschaft wird beim Luciferinbenzylether-Debenzylierungs (LBD)-Assay angewandt. Luciferin-6'-benzylether wird durch CYP3A unter Umwandlung von NADPH zu NADP<sup>+</sup> zu Luciferin debenzyliert. Die Reaktion erfolgt unter Energiefreisetzung in Form von Licht und ist daher luminometrisch bestimmbar. Bei diesemVersuch wird der Kit des P450-Glo Assays (Promega) verwendet. 13 µg der aufbereiteten und auf Eis aufgetauten Mikrosomen werden in 96Well-Platten vorgelegt und gegebenenfalls bis auf 6,25 µl mit NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH 7,6) aufgefüllt. Hinzu werden 6,25 µl des 4xSubstrat-Reaktionsgemisches pipettiert und vermischt. Bei 37°C wird die Platte für 10 min vorinkubiert. Die katalytische Reaktion wird durch Zugabe von 12,5 µl der 2xNADPH / KPO₄-Lösung gestartet. Die Probenplatte wird für weitere 30 min bei 37°C inkubiert bevor 25 µl des Luciferin-Detektionsreagenzes hinzugegeben werden. Bei Raumtemperatur wird das Lumineszenz-Signal über 20 min stabilisiert. Danach werden die Proben in Lumi-Röhrchen überführt und im Luminometer mit einer Integrationszeit von einer Sekunde je Probe vermessen. Eine Blankprobe, die statt Mikrosomen NaPi-Puffer (pH 7,6) enthält, dient als Blank. Der Lumineszenz-Wert des Blanks wird von den übrigen Proben subtrahiert. Die Aktivitäten der Dreifachbestimmung je Probe werden in Relation zum Mittelwert der Kontrolle gesetzt und gemittelt.



zu Luciferin durch CYP3A.

## B.5.2 Western Blot

Die Bestimmung der spezifischen Proteinmenge erfolgt über die Anwendung des Western Blot-Verfahrens. Die Proteingemische werden vorbehandelt auf ein Gel aufgetragen. Durch eine Elektrophorese werden sie nach ihrer Größe getrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Auf der Membran werden spezifische Proteine durch ausgewählte Antikörper erkannt und gebunden. Ein zweiter Antikörper mit einem enzymatisch aktiven Zentrum der Meerrettichperooxidase koppelt an den ersten. Die Meerrettichperooxidase kann zugesetztes Luminol oxidieren, welches dadurch energetisch angeregt wird und bei Rückgang in den Grundzustand, Energie in Form von Licht freisetzt. Dieses wird luminometrisch bestimmt.

### B.5.2.1 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Trennung von Proteinen im homogenen elektrischen Feld anhand ihrer Molekülgröße. Dazu werden die Proteine zunächst mit einem anionischen Detergenz denaturiert. Bei diesem Schritt werden die Proteine proportional zu ihrer Molekülgröße anionisch beladen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ist somit abhängig von ihrer

Molekülgröße.

Die Lösungen für das Trenngel werden zusammenpipettiert, wobei APS und TEMED zum Start der Polymersiation des Gels als letztes zugegeben wird. Die Gelgießapparatur wird zu Dreiviertel mit dem Gemisch blasenfrei befüllt. Auf die Oberkante werden wenige Tropfen n-Butanol gegeben, um einen planaren Gelrand zu erhalten. Das n-Butanol wird nach ca. einer Stunde, also nach beendeter Polymerisation, mittels Filterpapier entfernt. Die Lösungen für das Sammelgel werden zusammengemischt und die Gießkammer damit vollständig aufgefüllt. Zwischen die Glasplatten wird in das Sammelgel ein Kamm für die Gelladetaschen eingesetzt. Die Polymerisation ist nach ca. 45 min abgeschlossen und das Gel in den Glasplatten kann mit Elektrophoresepuffer in der Gelkammer geflutet werden, um nach Kammentferunng mit den aufbereiteten Proteinproben befüllt zu werden.

Zur Aufbereitung werden 20 µg der Mikrosomen in einem Volumen von 14 µl, gegebenenfalls mit Wasser aufzufüllen, mit 7 µl 3xLämmli-Puffer versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Pro Gelladetasche wird eine Probe eingefüllt. Auf jedem Gel ist eine Tasche für 3 µl Molekulargewichtstandard reserviert. Freie Taschen werden mit 7 µl 3xLämmli befüllt. Die Elektrophorese wird bei 100V für 1,5-2h durchgeführt.

### B.5.2.2 Blotting

Um die Proteine nach ihrer molekulargrößenabhängigen Auftrennung den Antikörpern zugänglich zu machen, werden sie im Western-Blot auf eine Membran eluiert. Nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran haften die Proteine auf der Oberfläche de Membran und sind somit den Antikörpern zugänglich. Im Semidry-Blot-Verfahren wird die Membran, die Gelgröße zugeschnitten wurde, für ca. 1 min in Methanol inkubiert, kurz mit Wasser gespült und im Anodenpuffer II zusammen mit zwei Filterpapieren der gleichen Größe für 10 min getränkt. Ein Filterpapier wird im Anodenpuffer I und drei zusammen mit dem Trenngel, nach Herauslösen dessen aus der Gelkammer, im Kathodenpuffer ebenfalls für 10 min äquilibriert. Danach werden die Filterpapiere, Gel und Membran im Blotter auf die anodische Graphitelektrode blasenfrei, vertikal gestapelt. Von anodisch nach kathodisch ergibt sich folgende Reihenfolge: Filterpapier aus Anodenpuffer I, zwei Filterpapiere aus Anodenpuffer II, Membran, Gel, drei Filterpapiere aus dem Kathodenpuffer. Die kathodische Elektrodenplatte wird darübergelegt und beschwert. Der Transfer erfolgt bei konstanter Stromstärke von ca. 75 mA pro Gel für 1-1,5h.

### B.5.2.3 Färbung von Gel und Membran

Nach dem Transfer kann eine Kontrolle für den vollständigen Proteintransfer vom Gel auf die Membran durch Anfärben des Gels mit Amidoschwarz und der Membran mit Ponceau-Rot erfolgen. Hierfür wird das Gel für ca. eine halbe Stunde in Amidoschwarzlösung geschwenkt und danach mehrfach mit Wasser gewaschen. Bei Vorhandensein von restlichen Proteinen lassen sich durch irreversible Reaktion des Amidoschwarz mit dem Protein dunkelblaue Banden auf dem Gel erkennen und der Transfer war nicht vollständig. Nach dem Schwenken der Membran für ca. 5 min in Ponceau-Rot-Lösung und anschließendem vorsichtigen Auswaschen mit TBS müssen bei Vorhandensein von

Proteinen pinkfarbene Banden ersichtlich sein. Die Farbe kann vollständig ausgewaschen werden und ist danach der Immunodetektion zugänglich.

Durch irreversibles, aber quantitatives Färben der Proteine auf der Membran mit Amidoschwarzlösung können nach Abschluß der Immunodetektionen die Proteinmengen pro Bahn verglichen werden und somit ein das Ergebnis verfälschendes Mehrauftragen von Mikrosomen auf einer Bahn ausgeschlossen werden.

### B.5.2.4 Immunodetektion

Nach dem Proteintransfer und der Kontrollfärbung wird die Membran über Nacht bei 4°C in einer 5%igen Milchpulverlösung in TBS-T geschwenkt, um spezifische Bindungsstellen für

die nachfolgenden Antikörperreaktionen zu blockieren. Am folgenden Tag wird die Membran zuerst dreimal in TBS-T für je 5 min gewaschen und anschließend für 1h mit dem ersten Antikörper in der jeweiligen Verdünnung in TBS bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T wird der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS zur Membran gegeben und für 1h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Wiederum wird die Membran dreimalig in TBS-T gewaschen und dann zur Detektion vorbereitet.

Für die cheminolumetrische Detektion wurde der ECL-Kit (Perkin-Elmer) benutzt. Das oxidierende Reagenz und das Luminol enthaltende Reagenz werden im gleichen Verhältnis im Dunkeln gemischt. Die Membran wird kurz in dem Gemisch geschwenkt und sofort über 1-15 min im Lumi-Imager luminometrisch detektiert. Die spezifischen, detektierten Proteinbanden lassen durch die lokale Lichtintensität auf ihre Menge rückschliessen.

### B.5.2.5 Strippen der Membran

Durch das Strippen wird die Membran von den Antikörpern befreit und ist daher für eine neue Immunodetektion mit anderen Antikörpern zugänglich. Somit können mehrere Proteine spezifisch nacheinander auf einer Membran detektiert werden.

Die Membran wird nach der Immunodetektion fünfmal für je 5 min in TBS-T gewaschen. Danach wird sie für 30 min im Stripping Puffer bei 50°C im Schüttelbad inkubiert, bevor sich ein erneuter fünfmaliger Waschvorgang in TBS-T für je 5 min anschließt. Die Membran kann zur Kontrolle des effektiven Strippens der cheminolumetrischen Detektion zugeführt werden. Es sollten, wenn die Antikörper heruntergestrippt wurden, kein Licht emittiert werden und somit keine Proteinbanden sichtbar sein.

Nach dem Strippen wird die Membran erneut der Immunodetektion mit Blockieren durch Milchpulverlösung zugeführt. Beim Strippen kann es passieren, dass auch einige Proteine auf der Membran abgelöst werden, sodass nur bis zu viermal gestrippt wird.

### B.5.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist eine neuere Methode zur indirekten quantitativen Bestimmung von spezifischen RNA-Transkripten. Bei der SYBR-Green-Spezifizierung wird die Einlagerung von SYBR-Green in doppelsträngige DNA ausgenutzt, wobei SYBR-Green zum Fluoreszieren gebracht wird. Mithilfe der reversen Tranksription wird zuvor die RNA in cDNA umgeschrieben und bei der anschließenden PCR (Polymerase Chain Reaction) mit entstehender doppelsträngiger DNA vervielfältigt.

### B.5.3.1 Reverse Transkription

Die reverse Transkription(RT-Reaktion) ermöglicht die Umschreibung von RNA in cDNA. In der Durchführung wurde für die RT-Reaktion von Versuchen mit RNA aus den TBBPAund HBCD-*in vivo*-Studien der iScript-Kit (Biorad) verwendet, während alle anderen RT-Reaktionen aus den Reverse-iT 1st Strand Synthesis Kits (ABgene) bestritten wurden. Für den Kit von Biorad gilt folgende Durchführung. Die RNA der Konzentration 200 ng/µl wurde aufgetaut und 5 µl davon zusammen mit 1 µl reverser Trankriptase, 10 µl nuklease freiem Wasser und 4 µl 5xReaktionsmix in ein PCR-Röhrchen gemischt. Das Röhrchen wurde im iCycler (Biorad) zuerst für 5 min bei 25°C, dann für 30 min bei 42°C und zum Schluss für 5 min bei 85°C inkubiert, bevor es bei 4°C abgekühlt wurde. Bei 42°C ist die reverse Transkriptase aktiv und die Synthese von cDNA findet statt. Bei 85°C wird die reverse Transkriptase denaturiert und inaktiviert. Das cDNA enthaltende Röhrchen wurde bei -20°C bis zum Einsatz in die PCR gelagert.

Mit dem Reverse-iT 1st Strand Synthesis Kit (ABgene) wurde folgendermaßen verfahren. Die RNA der Konzentration 200 ng/µl wurde aufgetaut und 5 µl (=1 µg) davon zusammen mit 1 µl Random Primer und 6 µl RNase freiem Wasser in ein RNase freies PCR-Röhrchen gegeben. Dieses wurde im iCycler (Biorad) bei 70°C für 5 min erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu unterbinden. Die Röhrchen wurden auf Eis abgekühlt, bevor 4 µl des 5x First Strand Synthese-Puffers, 2 µl des dNTP-Mixes, 1 µl der DTT-Lösung und 1 µl Reverse-iT RTase Blend hinzupipettiert wurde. Dieses Gemisch wurde für 50 min bei 47°C inkubiert, wobei die Synthese des cDNA-Stranges erfolgte. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde anschließend auf 75°C für 10 min erhitzt. Das Gemisch, das nun die cDNA beinhaltet, wurde bis zur PCR bei -20°C gelagert.

### B.5.3.2 PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion, engl. polymerase chain reaction, werden stufenweise Doppel-DNA-Stränge zuerst zu Einzelsträngen denaturiert, dann Primer, kurze DNA-Sequenzen, angelagert und dann die Einzelstränge mithilfe der Polymerase zu Doppelsträngen synthetisiert. Dabei entsteht pro Einzelstrang der Zielsequenz ein Doppelstrang und in folgender Denaturierung eine Kopie. Bei x-facher Wiederholung dieser Schritte entstehen 2<sup>x</sup> Kopien. Diese werden durch Einlagerung von SYBR-Green in die Doppelstrang-DNA in jeder Wiederholung quantitativ bestimmt.

#### B.5.3.2.1. Primer

Bei der Primerauswahl mithilfe der GenBank-Datenbank und des Programms DNAMAN und der Primervalidierung für die Real Time-PCR sind einige Kriterien einzuhalten, um nur die jeweiligen Zielsequenzen optimal in der PCR zu mehren.

Die Primer dürfen nur ein eindeutiges PCR-Produkt ermöglichen, d.h. keine anderen DNA-Sequenzen dürfen kopiert werden. Da mit einer geringen Verunreinigung von DNA in der Aufbereitung von RNA zu rechnen ist, dürfen auch die DNA-Sequenzen des Zielgens nicht abgeschrieben werden. Zur Vermeidung dessen wurde daher ein Blast in der Genbank durchgeführt und PCR-Produkte anderer Gene ausgeschlossen. Des Weiteren wurden die Primer so ausgewählt, dass sie komplementär zu RNA-Sequenzen sind, die sich durch Exon-Brücken auszeichnen.

Die PCR-Produkte sollten möglichst klein sein für eine schnelle Synthese und wenig Verlust bei den Ressourcen, z.B. dNTP, erdulden. Daher wurden Primerpaare gewählt, die ein PCR-Produkt von 50-150bp ergeben.

Die Primeranlagerungstemperaturen für sense und antisense-Primer sollten sich nur wenig unterscheiden. Es wurden Primer ausgewählt, die sich an die Zielsequenzen bei einer Temperatur von 59°C anlagern.

Die ausgesuchten Primer wurden in der Real Time PCR nach den obigen Anforderungen validiert. Die Effizienz der Reaktion wurde bestimmt und die Schmelztemperatur des PCR-Produktes festgehalten. Die Effizienz, kennzeichnend für die optimale Primerbindung an die DNA, wird durch die Kopienrate pro Wiederholung berechnet. Bei maximaler Kopienzahl, also Verdopplung jedes Stranges beträgt die Effizienz 2. Je weniger Kopien effektiv gebildet werden, umso kleiner ist die Effizienz.

Gen	5'-Sense-3'	3'-Antisense-5'						
	TOOLOOLAOTOOTTAOO	000470040707047047040						
rgapdh	IGCACCACCAACIGCIIAGC	GGCAIGGACIGIGGICAIGAG						
$rCVP1\Delta1/2$	CGGTGATTGGCAGAGATCGG	GTCCCTCGTTGTGCTGTGG						
	00010411000404041000	0100010010100010100						
rCYP2B1/2	ATGGAGAAGGAGAAGTCGAACC	CTTGAGCATCAGCAGGAAACC						
rCVD2A1/2	CCACCACCACACTTTCCTTTC	CCTCCCACCTCCCTTATTCC						
ICTF3AI/3	CCAGCAGCACACACITICCTITG	GGIGGGAGGIGCCITATIGG						
Tabelle 13: Pr	Tabelle 13: Primertabelle							

Gen	GenBank Eintrag	PCR-Produkt
rGAPDH	AF106860	87 bp
rCYP1A1/2	NM_012541	134 bp
rCYP2B1/2	M37134	135 bp
rCYP3A1/3	NM_173144 / NM_013105	110 bp
Tabelle 14: PC	CR-Produkte	

### B.5.3.2.2. Durchführung (Biorad)

Die Proben aus den in-vivo Studien mit TBBPA und HBCD wurden mit dem Supermix-Kit von Biorad in der Real Time-PCR durchgeführt. Dabei wurde 1 µl des cDNA Templates mit 12,5 µl SYBR Green Supermix, 10,5 µl nuklease freiem Wasser, 0,5 µl des sense- und 0,5 µl des antisense-Primers in einem Well einer 96Well-Platte vermischt. Als externe Referenz diente ein cDNA-Template einer Probe, das auf jeder Platte mit dem jeweiligen Reaktionsmix mitgeführt wurde. Dies ermöglichte den Vergleich der Platten untereinander. Als Blank diente eine Probe, die anstatt cDNA Wasser enthielt. Auf die 96Well-Platte wurde eine optische Folie geklebt. Die Platte durchlief im iCycler folgendes Temperaturprogramm:

Zyklus 1:	1x	95°C	3 min	Aktivieren der Polymerase
Zyklus 2:	40x	95°C	1 min	Denaturierung des Doppelstranges
		59°C	1 min	Anlagerung der Primer
		72°C	1 min	Synthese des Doppelstranges
Zyklus 3:	1x	95°C	1 min	Denaturierung des Doppelstranges
Zyklus 4:	1x	55°C	1 min	Schmelzkurve
Zyklus 5:	80x	55°C(+0,5°C) 10sec		

Beim Zyklus 5 durchlief das fertige PCR-Produkt den Weg vom Doppelstrang (55°C) zur Denaturierung in die Einzelstränge über 80 Temperaturstufen in 0,5°C-Erhöhungen. Sobald der Doppelstrang geschmolzen ist, kann auch eingelagertes SYBR-Green fluorometrisch nicht mehr detektiert werden. Ein Schmelzpunkt ist kennzeichnend für die Bildung eines eindeutigen PCR-Produkts.

### B.5.3.2.3. Durchführung (ABgene)

Alle Proben die nicht aus den den in-vivo Studien mit TBBPA und HBCD stammen wurden mit dem Absolute QPCR SYBR Green Kit (ABgene) durchgeführt. Dabei wurde1 µl des cDNA Templates mit 12,5 µl Absolute QPCR Sybr Green Mix, 10,5 µl nuklease freiem Wasser, 0,5 µl des sense- und 0,5 µl des antisense-Primers in einem Well einer 96Well-Platte vermischt. Als externe Referenz diente wie oben beschrieben ein cDNA Template einer Probe und als Blank eine Probe mit Wasser statt cDNA. Auf die 96Well-Platte wurde eine optische Folie geklebt und im iCycler das gleiche Temperaturprogramm wie zuvor beschrieben gefahren; nur die Aktivierung der Polymerase im ersten Zyklus dauerte 15 min statt 1 min.

### B.5.3.2.4. Berechnung

In jeder Wiederholung der Zyklen 2 und 5 wird die Menge an fluoreszierendem SYBR-Green bestimmt. Durch die überproportionale Steigerung der doppelsträngigen DNA des PCR-Produkts, ergibt sich eine überproportionale Steigerung der fluoreszierenden SYBR-Green-Menge im gewünschten PCR-Produkt. Diese Steigerung lässt durch Ressourcenverbrauch, wie dNTP und Primer, nach und ist in den letzten Wiederholungen ganz abgeschlossen. Der CT-Punkt gibt die Wiederholung an, bei der die Fluoreszenzkurve vom überproportionalen in den linearen Bereich übergeht. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben miteinander wird der optimale CT-Wert über alle Proben berechnet. Mittels des CT-Werts lässt sich die relative RNA-Menge bezogen auf ein Housekeeping Gen und die Kontrolle, die Ratio, nach der Formel von Pfaffl (2001), siehe Formel unten, berechnen.

Das Housekeeping Gen, aus dem englischen übersetzt Haushaltsgen, ist ein Gen welches durch das Experiment keine veränderte Expression erfährt und somit in allen behandelten und nicht behandelten Proben die gleiche Anzahl an RNA-Transkripten aufweisen sollte. Weithin benutzte Housekeeping Gene sind GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase), β-Actin, 18S und 28S-RNA, Cyclophilin. In den hier gezeigten Experimenten wurde GAPDH benutzt.

$$Ratio = \frac{E_Z^{Ct(Kontrolle)_{Zie \lg en} - Ct(\Pr obe)_{Zie \lg en}}}{E_H^{Ct(Kontrolle)_{Housekeeping} - Ct(\Pr obe)_{Housekeeping}}}$$

E<sub>H</sub>: Effizienz für die Housekeeping-Primer
E<sub>z</sub>: Effizienz für die Zielgen-Primer
Ct: Wiederholung, an der die Fluoreszenkurve vom überproportionalen Bereich in den linearen übergeht
Kontrolle: externe Kontrolle, die auf jeder Platte mitgeführt wurde
Probe: die zu betrachtende Probe im jeweiligen Well, aus der gleichen cDNA

Die gemittelte Ratio für jede Probe setzt sich als Mittelwert aus den einzeln berechneten Ratios der Triplikate der Proben zusammen.

### B.5.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwert der Dosisgruppen mit Standardabweichung dargestellt. Es wurden, soweit nicht anders angegeben, drei unabhängige Messreihen durchgeführt und gingen in die statistische Auswertung ein.

Mithilfe der Software InStat wurden die Ergebnisse der einzelnen Versuche statistisch verglichen und bewertet. Als Test für den Vergleich der behandelten zu den unbehandelten Gruppen diente der Dunnett-Test. Die dosisabhängige Trendanalyse wurde mittels eines Tests nach Duckworth und Wyatt softwaregestützt durchgeführt. Signifikante Abweichungen von der Kontrolle sind mit einem Stern(\*) markiert. Dafür muss der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau von 0,1 sein.

# C Ergebnisse

# C.1 TBBPA

Das industriell hergestellte Tetrabromobisphenol-A wurde für die *in vivo* Versuche an männlichen und weiblichen Ratten in das Tierfutter eingemischt und die Dosen 0, 30, 100 und 300 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag (mg/kg KG/d) anhand des Futterverbrauchs berechnet. Pro Geschlecht und Dosisgruppe wurden zehn Tiere eingesetzt. Nach 28 Tagen Behandlung wurden die Tiere getötet und die Leber entfernt. Aus der Leber wurden Mikrosomen und RNA isoliert. Die Mikrosomen wurden in die Proteinbestimmungen Western-Blot und Enzymaktivitätsmessungen eingesetzt, die RNA einer Analyse in der Real-Time-PCR unterzogen.

## C.1.1 RNA

Mithilfe der RealTime PCR konnten auf RNA-Ebene für die untersuchten Gene CYP1A, CYP2B und CYP3A keine dosisabhängigen Effekte ausgemacht werden. Die Ratios der einzelnen Dosisgruppen - 0, 30, 100 und 300 mg/kg KG/d - waren nicht signifikant unterschiedlich. Es zeigte sich jedoch eine hohe individuelle Schwankungsbreite innerhalb der Dosisgruppen, was in Abbildung 12 durch den eingezeichneten Standardfehler ersichtlich wird.

## C.1.2 Western Blot

In Abbildung 12 sind die relativen gemittelten Proteinmengen der einzelnen Dosisgruppen für die Enzyme CYP1A, CYP2B, CYP3A dargestellt. Obwohl im Diagramm ein Trend zu gesteigerter CYP3A-Expression mit erhöhter Dosis durch die gemittelten relativen Mengen anscheinend sichtbar wird, ist dieser aber statistisch nicht nachzuweisen. Für alle drei Enzyme in den männlichen wie weiblichen Tieren werden keine signifikanten (p<0,1) dosisabhängigen Unterschiede festgemacht. Wiederum streuen die individuellen Proteinmengen, gekennzeichnet durch die Fehlerbalken in Abbildung 12. Western Blots werden exemplarisch in Abbildung 11 gezeigt.

# C.1.3 Enzymaktivität

Mit der Messung der EROD(Ethoxyresorufin-O-Dealkylase)-Aktivität bzw. der PROD (Pentoxyresorufin-O-Dealkylase)-Aktivität werden die Enzymaktivitäten von CYP1A bzw. CYP2B bestimmt.

In der Abbildung 12 wird beispielhaft deutlich, wie groß die interindividuelle Streuung der Enzymaktivitäten in allen Dosisgruppen ist. Weder in der EROD (Ethoxyresorufin-O-Dealkylase)- noch in der PROD (Pentoxyresorufin-O-Dealkylase)-Analyse konnten durch TBBPA verursachte dosisabhängige Effekte aufgedeckt werden. Mit der Messung der LBD(Luciferinbenzyl-dearylase)-Aktivität wird bestätigt, dass TBBPA die CYP3A-Isoenzyme dosisabhängig nicht beeinflusst, siehe Abbildung 12.



Legende:

(von links	Banden s nach rechts)	1	2	3	4	5	6	7	8
1	CYP1A	0 ma/ka	30 ma/ka	100 ma/ka	300 ma/ka	0 ma/ka	30 ma/ka	100 ma/ka	300 ma/ka
2	CYP2B	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d
3	CYP3A	(weibi.)	(weibi.)	(weibi.)	(weibi.)	(manni.)	(manni.)	(manni.)	(manni.)

Abbildung 11: TBBPA im Western Blot



#### Legende:

- ① mRNA-Level von CYP1A1/2 in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung
- <sup>©</sup> mRNA-Level von CYP2B1/2 in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung
- <sup>③</sup> mRNA-Level von CYP3A1 in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung
- ④ Proteinlevel von CYP1A1 in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung
- S Proteinlevel von CYP2B1/2 in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung
- <sup>©</sup> Proteinlevel von CYP3A1 in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung
- © EROD-Aktivität in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung
- 8 PROD-Aktivität in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung
- IBD-Aktivität in der Rattenleber nach TBBPA-Behandlung

weiß: weibliche Ratten; schwarz: männliche Ratten

Ratio<sup>1</sup>: Ratio (Pfaffl, 2001) in Relation zum "Housekeeping" Gen GAPDH und bezogen auf die

Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>2</sup>: Lichteinheiten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>3</sup>: Aktivitäten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Abbildung 12: Einfluss von TBBPA auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in vivo

# C.2 HBCD

Das industriell hergestellte HBCD wurde für die *in vivo* Versuche den männlichen und weiblichen Ratten täglich per Schlundsonde in den Dosen 0 / 0,3 / 1 / 3 / 10 / 30 / 100 / 200 mg pro Kilogramm Körpergewicht (mg/kg KG) verabreicht. Als Vehikel diente Maiskeimöl. Nach 28 Tagen Behandlung wurden alle Tiere, fünf pro Geschlecht und Dosisgruppe, getötet und die Leber entnommen. Aus der Leber wurden Mikrosomen und RNA isoliert. Die Mikrosomen wurden in die Proteinbestimmungen Western-Blot und Enzymaktivitätsmessungen eingesetzt, die RNA einer Analyse in der Real-Time-PCR unterzogen.

# C.2.1 RNA

Mithilfe der RealTime PCR konnten auf RNA-Ebene für CYP1A in beiden Geschlechtern keine dosisabhängigen Effekte ausgemacht werden. Die Ratios der einzelnen Dosisgruppen waren nicht signifikant unterschiedlich. Für CYP2B wurden die mit der Dosis steigenden Ratios bei den weiblichen und männlichen Tieren mit einer Trendanalyse statistisch untermauert. Beim Vergleich der Dosisgruppen wurden erst bei der höchsten Dosis signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe bei den weiblichen Tieren gesehen. Bei den männlichen Tieren kommt es im Mittel zu einer fast zehnfach erhöhten Ratio, wobei schon erste signifikante Unterschiede ab 30 mg/kg KG/d erkennbar sind. Die interindividuelle Streuung ist in der kleinen Dosisgruppe recht hoch. Für CYP3A steigen die Ratios dosisabhängig bis zu fünffach über der Kontrolle in den männlichen Tieren. Bei den weiblichen wird eine erhebliche dosisabhängige Erhöhung mit Ratios von gemittelt 35-fach über der Kontrolle in der höchsten Dosis gefunden. Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten die niedrigeren Dosen bis einschließlich 3 mg/kg KG. Bei höherer Dosierung sind statistisch signifikante Unterschiede errechnet worden. Die Ratios der mRNA für die drei Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A gegenüber dem "housekeeping gen" GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) sind in Abbildung 14 dosisabhängig dargestellt.

## C.2.2 Western Blot

In Abbildung 14 sind die relativen gemittelten Proteinmengen der einzelnen Dosisgruppen dargestellt, in Abbildung 13 die dazugehörigen exemplarisch ausgewählten Western Blot-Membranen. Für CYP1A sind auf Proteinebene weder bei den weiblichen noch männlichen Tieren dosisabhängige Effekte auszumachen, während die CYP2B Expression in den männlichen Tieren in einem dosisabhängigen Trend und bei 100 mg/kg KG/d signifikant im Vergleich zur Kontrolle und in den weiblichen ab 30 mg/kg KG/d aufwärts statistisch signifikant erhöht vorliegt. Auf Proteinebene wurde CYP3A in weiblichen Tieren schon ab einer täglichen Dosis von 3 mg/kg KG und in männlichen ab einer Dosis ab 30 mg/kg KG induziert, wobei der Effekt sich in den weiblichen Tieren stärker manifestierte als in den männlichen.

_	1	2	3	4	5	6	7	8
1		-	-	-	-	-		-
2				-				
3	-	-	-	-				
4	-	-			-			-

Legende:

	Banden (von links nach rechts)	1	2	3	4	5	6	7	8
1	CYP2B weibl.								
2	CYP2B männl.	0 mg/kg	200 mg/kg	0,3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
3	CYP3A weibl.	KĞ/d	≩/d KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d
4	CYP3A männl.								

Abbildung 13: HBCD im Western Blot

### C.2.3 Enzymaktivität

Im EROD-Assay wurden bis zu einer Dosis von 200 mg/kg KG/d keine durch HBCD verursachten Auffälligkeiten in der CYP1A Aktivität erkannt. Die Dosisgruppen der männlichen und weiblichen Ratten zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle, vgl. Abbildung 14.

Mit dem PROD-Assay konnte eine signifikante Erhöhung der CYP2B-Aktivität in den männlichen Tieren bei den Dosen 10 und 100 mg/kg KG/d festgestellt werden. Die Dosis 30 mg/kg KG/d führte ebenfalls zu erhöhter, allerdings nicht signifikanter Induktion in den männlichen Tieren, vgl. Abbildung 14. Die weiblichen Tiere blieben für diese Endpunkt unauffällig.

Die CYP3A-Aktivität, die mit dem LBD-Assay nachgewiesen wurde, war ab der Dosis von 10 mg/kg KG/d bei den weiblichen Tieren erhöht, vgl. Abbildung 14. Den männlichen Tieren war keine erhöhte CYP3A-Aktivität mit diesem Assay nachzuweisen.

#### Ergebnisse



#### Legende:

- ① mRNA-Level von CYP1A1/2 in der Rattenleber nach HBCD-Behandlung
- ② mRNA-Level von CYP2B1/2 in der Rattenleber nach HBCD-Behandlung
- <sup>③</sup> mRNA-Level von CYP3A1 in der Rattenleber nach HBCD-Behandlung
- Proteinlevel von CYP1A1 in der Rattenleber nach HBCD-Behandlung
- S Proteinlevel von CYP2B1/2 in der Rattenleber nach HBCD-Behandlung
- Proteinlevel von CYP3A1 in der Rattenleber nach HBCD-Behandlung
- © EROD-Aktivität in der Rattenleber nach HBCD-Behandlung
- (9) LBD-Aktivität in der Rattenleber nach HBCD-Behandlung

weiß: weibliche Ratten; schwarz: männliche Ratten

Ratio<sup>1</sup>: Ratio (Pfaffl, 2001) in Relation zum "Housekeeping" Gen GAPDH und bezogen auf

die Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>2</sup>: Lichteinheiten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>3</sup>: Aktivitäten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

#### Abbildung 14: Einfluss von HBCD auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in vivo

# C.3 HBCD – in vitro

In den untersuchten Primärhepatozyten wurde der Einfluss von HBCD auf CYP1A und CYP3A im Monolayer und für CYP2B im Sandwichlayer untersucht. Hierzu wurden Konzentrationen im Nährmedium von 100 µM bzw. deren Verdünnungen auf den Zellrasen aufgetragen. Die Zellen wurden nach 48 Stunden Inkubation mit HBCD geerntet und nach Aufarbeitung der RNA und Proteine den Analysen in der Real Time PCR und im Western Blot zugeführt

## C.3.1 RNA

In der Analyse aus der RealTime PCR trat zutage, dass CYP3A schon ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine signifikant erhöhte Ratio aufwies, die sich über die konzentrierteren HBCD-Lösungen noch weiter bis auf 240 fach gegenüber der Kontrolle erhöhte. Auch für CYP2B wirkte HBCD induzierend. Bei diesen Versuchen wurden ähnlich hohe Ratios wie bei der Positivkontrolle Phenobarbital (100  $\mu$ M) erreicht. CYP1A wurde auf RNA-Ebene ebenfalls durch HBCD leicht positiv reguliert, reichte aber an Stärke bei weitem nicht an die Positivkontrolle TCDD heran. Die jeweiligen Ratios sind in Abbildung 16 veranschaulicht.

## C.3.2 Western Blot

Im Western Blot wurden aufgrund von Schwierigkeiten bei der Proteinaufreinigung nur die Enzyme CYP1A und CYP3A nachgewiesen, siehe Abbildung 15. Für CYP1A sind im Vergleich zu TCDD keine Banden erkennbar. Bei den beiden höheren Konzentrationen 10 und 100 µM sind Banden für die Bindung an den Antikörper CYP3A auszumachen. In der Abbildung ist Dexamethason als Positivkontrolle dargestellt.







Legende:

- mRNA-Level von CYP1A1/2 in Primärhepatozyten nach HBCD-Behandlung (1) A: DMSO-Kontrolle;
  - B:  $10^{-8}$  M HBCD; C: $10^{-7}$  M HBCD; D:  $10^{-6}$  M HBCD; E:  $10^{-5}$  M HBCD F:  $10^{-9}$  M TCDD
- mRNA-Level von CYP2B1/2 in Primärhepatozyten nach HBCD-Behandlung 2 A: DMSO-Kontrolle;
  - B: 10<sup>-6</sup> M HBCD; C: 10<sup>-5</sup> M HBCD
  - D: 10<sup>-4</sup> M Phenobarbital; E: 10<sup>-5</sup> M Phenobarbital
- Image: A: DMSO-Kontrolle;
  - B: 10<sup>-7</sup> M HBCD; C: 10<sup>-6</sup> M HBCD; D: 10<sup>-5</sup> M HBCD
  - E: 25 µM Dexamethason

schwarz: Lösungsmittelkontrolle; weiß: HBCD ; grau; Positivkontrolle

Ratio<sup>1</sup>: Ratio (Pfaffl, 2001) in Relation zum "Housekeeping" Gen GAPDH und bezogen auf die

Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

#### Abbildung 16: Einfluß von HBCD auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in Primärhepatozyten

# C.4 Pentamix

Der industriell hergestellte und aufgereinigte Pentamix wurde für die *in vivo* Versuche den männlichen und weiblichen Ratten per Schlundsonde in den Dosen 0 / 0,27 / 0,82 / 2,47 / 7,4 / 22,2 / 66,7 / 200 mg pro Kilogramm Körpergewicht ( mg/kg KG) täglich verabreicht. Als Vehikel diente Maiskeimöl. Nach 28 Tagen Behandlung wurden alle Tiere, fünf pro Geschlecht und Dosisgruppe, getötet und die Leber entfernt. Aus der Leber wurden Mikrosomen und RNA isoliert. Die Mikrosomen wurden in die Proteinbestimmungen Western-Blot und Enzymaktivitätsmessungen eingesetzt, die RNA einer Analyse in der Real-Time-PCR unterzogen.

### C.4.1 RNA

Die Behandlung mit dem Pentamix führte zwar bei CYP1A zu mit der Dosis steigenden Ratios in den weiblichen Tieren, allerdings war dieser Effekt nicht signifikant. Für die männlichen Tiere konnte kein dosisabhängiger Effekt ausgemacht werden. Für CYP2B lagen signifikante erhöhte mRNA-Mengen ab einer Dosis von 7,4 mg/kg KG/d in den weiblichen und männlichen Ratten vor. Die höchsten Ratios gegenüber der Kontrollgruppe erzielten die weiblichen Tiere in der Dosis 66,7 mg/kg KG/d mit über 1000 fachen Erhöhungen. Damit war die Induktionsfähigkeit des Pentamixes in den weiblichen Tieren weitaus stärker ausgeprägt als in den männlichen mit gemittelten Ratio-Werten bis zu 72fach über der Kontrolle. Für CYP3A konnte mittels einer Trendanalyse bestätigt werden, dass die Ratios, demnach auch die mRNA-Menge von CYP3A, für die männlichen und weiblichen Tiere dosisabhängig steigen. Die einzelnen Dosisgruppen waren gegenüber den Kontrollgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Zur Veranschaulichung sind die Ratios für CYP1A, CYP2B und CYP3A in Abbildung 18 dargestellt.

## C.4.2 Western Blot

Auf Proteinebene sind für CYP1A für die männlichen und weiblichen Ratten dosisabhängige Einflüsse, ab einer Dosis von 22,2 mg/kg KG/d signifikant, auszumachen. Mit Proteinsteigerungen in der höchsten Dosis von ca. 20 fach über der Kontrolle in der höchsten Dosisgruppe führte der Pentamix zu ähnlich starken Induktionseffekten in den männlichen und weiblichen Tieren, allerdings setzte diese Proteinanhäufung in den männlichen Tieren erst bei höherer Dosis ein. Für CYP2B zeigten sich signifikante Vervielfachungen auf Proteinebene schon bei der Dosis von 7,4 mg/kg KG/d, die sich dann auf eine maximale Höhe mit gemittelten relativen BLUs von 200 für die weiblichen und 50 für die männlichen Tiere begeben. Die Proteinwerte für CYP3A schwanken interindividuell sehr stark, sodass zwar die gepoolten und mittleren relativen BLUs ab einer Dosis von 7,4 mg/kg KG/d stark ansteigen, jedoch eine signifikante Erhöhung nur für die Gesamtheit der Dosisgruppen über eine Trendanalyse festgestellt wurde. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 18 Western-Blot-Daten grafisch für CYP1A, CYP2B und CYP3A dargestellt. Dazugehörige Blots werden in Abbildung 17 exemplarisch gezeigt.



Legende:

	Banden (von links nach rechts)	1	2	3	4	5	6	7	8
1	CYP1A weibl.								
2	CYP1A männl.								
3	CYP2B weibl.	0 mg/kg	0,27 mg/kg	0,82 mg/kg	2,47 mg/kg	7,4 mg/kg	22,2 mg/kg	66,7 mg/kg	200 mg/kg
4	CYP2B männl.	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d	KG/d
5	CYP3A weibl.								
6	CYP3A männl.								

Abbildung 17: Pentamix im Western Blot

### C.4.3 Enzymaktivität

Korrelierend zu den Werten aus der Western Blot-Analyse für CYP1A ergaben sich im EROD-Assay signifikante Erhöhungen ab einer Dosis von 22,2 mg/kg KG/d für beide Geschlechter, wobei wiederum die weiblichen Ratten einen größeren Unterschied zur Kontrolle zeigten als die männlichen (ca. 40 fach bzw. 16fach). Für CYP2B konnte schon ab der Dosis von 2,47 mg/kg KG/d (gegenüber 7,4 mg/kg KG/d auf RNA und Proteinebene) bei den weiblichen und männlichen Tieren eine signifikante Erhöhung festgestellt werden. Der LBD-Assay, der Aussage über die CYP3A-Aktivität treffen soll, zeigte keine sichtbaren Veränderungen der einzelnen Dosisgruppen gegenüber der Kontrolle. Die Enzymaktivitäten sind in Abbildung 18 anschaulich dargestellt.

#### Ergebnisse



#### Legende:

- ① mRNA-Level von CYP1A1/2 in der Rattenleber nach Pentamix-Behandlung
- <sup>(2)</sup> mRNA-Level von CYP2B1/2 in der Rattenleber nach Pentamix-Behandlung
- ③ mRNA-Level von CYP3A1 in der Rattenleber nach Pentamix-Behandlung
- ④ Proteinlevel von CYP1A1 in der Rattenleber nach Pentamix-Behandlung
- ⑤ Proteinlevel von CYP2B1/2 in der Rattenleber nach Pentamix-Behandlung
- <sup>©</sup> Proteinlevel von CYP3A1 in der Rattenleber nach Pentamix-Behandlung
- C EROD-Aktivität in der Rattenleber nach Pentamix-Behandlung
- IBD-Aktivität in der Rattenleber nach Pentamix-Behandlung

weiß: weibliche Ratten; schwarz: männliche Ratten

Ratio<sup>1</sup>: Ratio (Pfaffl, 2001) in Relation zum "Housekeeping" Gen GAPDH und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>2</sup>: Lichteinheiten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>3</sup>: Aktivitäten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

#### Abbildung 18: Einfluss des Pentamix auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in vivo

# C.5 Pentamix – in vitro

In den untersuchten Primärhepatozyten wurde der Einfluss des Pentamixes auf CYP1A und CYP3A im Monolayer und für CYP2B im Sandwichlayer untersucht. Hierzu wurden Konzentrationen im Nährmedium von 100 µM bzw. deren Verdünnungen auf den Zellrasen aufgetragen. Die Zellen wurden nach 48 Stunden Inkubation mit dem Pentamix geerntet und nach Aufarbeitung der RNA und Proteine den Analysen in der Real Time PCR, im Western Blot oder den Aktivitätsmessungen zugeführt.

## C.5.1 RNA

In der Analyse aus der RealTime PCR trat zutage, dass CYP1A schon ab so niedriger Konzentration von 1  $\mu$ M eine doppelte Ratio gegenüber der Lösungsmittelkontrolle aufwies. Die 250 fache Ratio der Positivkontrolle TCDD(1 nM) konnte allerdings auch bei der höchsten Konzentration bei weitem nicht erreicht werden. Auch für CYP2B wirkte der Pentamix als Induktor. Bei diesen Versuchen wurden ähnliche hohe Ratios wie bei der Positivkontrolle Phenobarbital(100  $\mu$ M) erreicht. CYP3A wurde auf RNA-Ebene ebenfalls durch den Pentamix ab Konzentrationen von 1  $\mu$ M positiv reguliert. Die Positivkontrolle Dexamethason (25 mM) wirkte aber hierbei noch viel stärker als die maximal eingesetzte Konzentration des Pentamixes (100  $\mu$ M), beschränkt durch die Löslichkeit. Die jeweiligen Ratios sind in Abbildung 20 veranschaulicht.

## C.5.2 Western Blot

Im Western Blot wurden aufgrund von Schwierigkeiten bei der Proteinaufreinigung nur die Enzyme CYP1A und CYP3A nachgewiesen, siehe Abbildung 19.

Während bei den niedrigeren Konzentrationen von 10 und 100 nM nur wenig Antikörper an CYP1A binden konnte, zeigten sich ab der Konzentration 1  $\mu$ M bis über 100  $\mu$ M Banden mit hoher Intensität, zum Vergleich aufgetragen 1 nM TCDD.

Verstärkte Antikörperbindung an CYP3A wurde bei den Konzentrationen 10 µM und 100 µM des Pentamixes sichtbar. In Abbildung 19 ist Dexamethason als Positivkontrolle dargestellt.



Abbildung 19: Pentamix in Primärhepatozyten im Western Blot

## C.5.3 Enzymaktivität

Im EROD Assay erwies sich der Pentamix als induzierend. Erste Effekte wurden schon ab einer Konzentration von 1 µM erkannt. Während in den durchgeführten Experimenten die Wirksamkeit gleich war, variierte die Wirkstärke erheblich, wie in Abbildung 20 dargestellt. Im Vergleich zu 1 nM TCDD einem potenten CYP1A Induktor erreicht der Pentamix eine sehr hohe Wirkstärke.

#### Ergebnisse



Konzentration (10<sup>-x</sup> M)

-10 -9 -8 -7 -6 -5

- Legende: mRNA-Level von CYP1A1/2 in Primärhepatozyten nach Pentamix-Behandlung A: DMSO-Kontrolle;
  - B:  $10^{-6}$  M Pentamix; C: $10^{-5}$  M Pentamix; D:  $10^{-4}$  M Pentamix; E:  $10^{-9}$  M TCDD
- mRNA-Level von CYP2B1/2 in Primärhepatozyten nach Pentamix-Behandlung A: DMSO-Kontrolle;
  - B: 10<sup>-6</sup> M Pentamix; C: 10<sup>-5</sup> M Pentamix
  - D: 10<sup>-4</sup> M Phenobarbital; E: 10<sup>-5</sup> M Phenobarbital
- Image: Image:
  - B: 10<sup>-6</sup> M Pentamix; C: 10<sup>-5</sup> M Pentamix; D: 10<sup>-4</sup> M Pentamix
  - E: 25  $\mu$ M Dexamethason
- EROD-Aktivität in Primärhepatozyten nach Pentamix-Behandlung
  - DMSO-Kontrolle
  - Pentamix in den Konzentrationen 10<sup>-9</sup> M 10<sup>-4</sup> M
  - 10<sup>-9</sup> M TCDD

schwarz: Lösungsmittelkontrolle; weiß: Pentamix ; grau; Positivkontrolle

Ratio<sup>1</sup>: Ratio (Pfaffl, 2001) in Relation zum "Housekeeping" Gen GAPDH und bezogen auf die

Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>3</sup>: Aktivitäten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Abbildung 20: Einfluss des Pentamix auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in Primärhepatozyten

# C.6 Decamix

Der industriell hergestellte Decamix wurde für die *in vivo* Versuche den männlichen und weiblichen Ratten per Schlundsonde in den Dosen 0 / 1,87 / 3,75 / 7,5 / 15 / 30 mg pro Kilogramm Körpergewicht (mg/kg KG) einmal täglich und in den Dosen 0 und 30 mg/kg KG zweimal täglich verabreicht. Als Vehikel diente Maiskeimöl. Nach 28 Tagen Behandlung wurden alle Tiere, fünf pro Geschlecht und Dosisgruppe, getötet und die Leber entfernt. Aus der Leber wurden Mikrosomen und RNA isoliert. Die Mikrosomen wurden in die Proteinbestimmungen Western-Blot und Enzymaktivitätsmessungen eingesetzt, die RNA einer Analyse in der Real-Time-PCR unterzogen.

### C.6.1 RNA

Die Behandlug mit Decamix führte zu dosisabhängigen erhöhten mRNA-Mengen, berechnet in Ratios, bei CYP1A in männlichen und weiblichen Tieren und bei CYP2B nur in den männlichen Tieren. Für die weiblichen Tiere führte auch die Trendanalyse nicht zu einem signifikanten Effekt, obwohl ein paar Tiere in den höheren Dosen eine Induktion vermuten lassen. Für CYP1A wurden signifikante Effekte ab 15 mg/kg KG bei den männlichen bzw. 30 mg/kg KG bei den weiblichen Ratten gesehen, für CYP2B schon ab 7,5 mg/kg KG in den männlichen Tieren. Die Induktion in den männlichen Tieren war für CYP2B (ca. achtfach bei maximaler Dosis) stärker ausgeprägt, als für CYP1A (ca. zweifach bei maximaler Dosis). Decamix schien auf mRNA-Ebene bei beiden Geschlechtern keinen Effekt auf CYP3A zu hinterlassen. Die Ratios der mRNA für die drei Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A gegenüber dem "housekeeping gen" GAPDH sind in Abbildung 22 dosisabhängig dargestellt.

# C.6.2 Western Blot

Auf Proteinebene sind für CYP1A für die männlichen und weiblichen Ratten Induktionshinweise zu sehen, in der höchsten Dosis signifikant. Beim Vergleich der Western Blot Membranen fällt auf, dass die Induktion auch auf Proteinebene für CYP2B stärker ist als für CYP1A. Bei den männlichen Ratten sind Induktionseffekte schon bei der niedrigsten Dosierung zu sehen, bei den weiblichen erst ab 30 mg/kg KG/d.

CYP3A war im Western Blot dosisabhängig unauffällig. Western Blots werden exemplarisch in Abbildung 21 gezeigt, die Diagramme in Abbildung 22.

	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	-				CONC.	A. Tapin	20		
2		145/12		- 1000					
3	-	-	(Strongel) in	dereingen in	righter (		-	-	
Leg	ende:								
(von	Binks nach	anden rechts)	1		2	:	3	4	

(von	Banden links nach rechts)	1	2	3	4	5	6	7	8
1	CYP1A	0	1,87	7.5.000/100	20	0	1,87	7.5.000///00	20
2	CYP2B	U mg/kg KG/d	mg/kg KG/d	7,5 mg/kg KG/d	30 mg/kg KG/d	U mg/kg KG/d	mg/kg KG/d	7,5 mg/kg KG/d	30 mg/kg KG/d
3	СҮРЗА	(weibl.)	(weibl.)	(weibl.)	(weibl.)	(männl.)	(männl.)	(männl.)	(männl.)

Abbildung 21: Decamix im Western Blot

# C.6.3 Enzymaktivität

Die EROD-Aktivität, die für die CYP1A-Aktivität aussagekräftig ist, war in den männlichen und weiblichen Tieren erhöht, was eine Trendanalyse bestätigte. Bei den männlichen Tieren waren die Dosisgruppen 30 und 60 mg/kg KG/d und bei den weiblichen nur die höchste Dosisgruppe signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Eine induzierte PROD-Aktivität, kennzeichnend für CYP2B, wurde nur in den männlichen Tieren ab der Dosis von 15 mg/kg KG/d und aufwärts statistisch bestätigt. Eine Trendanalyse zeigte aber neben den männlichen auch in den weiblichen Tieren eine Erhöhung der PROD-Aktivität. Im für die CYP3A-Aktivität repräsentativen LBD-Assay wurden keine Decamix-abhängigen Effekte gefunden. Die Enzymaktivitäten sind in Abbildung 22 anschaulich dargestellt.



#### Legende:

- ① mRNA-Level von CYP1A1/2 in der Rattenleber nach Decamix-Behandlung
- 2 mRNA-Level von CYP2B1/2 in der Rattenleber nach Decamix-Behandlung
- ③ mRNA-Level von CYP3A1 in der Rattenleber nach Decamix-Behandlung
- ④ Proteinlevel von CYP1A1 in der Rattenleber nach Decamix-Behandlung
- <sup>©</sup> Proteinlevel von CYP3A1 in der Rattenleber nach Decamix-Behandlung
- © EROD-Aktivität in der Rattenleber nach Decamix-Behandlung
- IBD-Aktivität in der Rattenleber nach Decamix-Behandlung

weiß: weibliche Ratten; schwarz: männliche Ratten

Ratio<sup>1</sup>: Ratio (Pfaffl, 2001) in Relation zum "Housekeeping" Gen GAPDH und bezogen auf die

Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>2</sup>: Lichteinheiten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Ratio<sup>3</sup>: Aktivitäten relativiert zur Lösungsmittelkontrolle (gemittelt)

Abbildung 22: Einfluss des Decamix auf CYP1A, CYP2B und CYP3A in vivo

# **D** Diskussion

# D.1 TBBPA

Mit einem Verbrauch von weltweit mehr als 100'000 Tonnen ist Tetrabromobisphenol A (TBBPA) das zurzeit meistgenutzte bromierte Flammschutzmittel. In einer 28-Tage Studie mit täglicher oraler Verabreichung an Ratten über das Futter sollte sein Potential zur Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzymen CYP1A, CYP2B und CYP3A untersucht werden.

ТВВРА	RNA		Weste	rn Blot	Enzymaktivität		
In vivo	Ŷ	50	9	8	9	8	
CYP1A	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	
CYP2B	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	
CYP3A	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	

Tabelle 15: Übersicht der Induktionsergebnisse von TBBPA

Die täglichen Dosen von bis zu 300 mg TBBPA pro kg Körpergewicht (mg/kg KG) führten über diesen Zeitraum zu keiner substanzabhängigen Veränderung der Enzyme weder auf RNA-, noch Protein- oder Enzymaktivitätslevel. Angesichts der Tatsache, dass TBBPA in der Umwelt zu finden ist und dementsprechend dem Menschen auch außerhalb der prädestinierten Anwendung in Kunststoffen zur Exposition zur Verfügung steht, scheint dieses Ergebnis mit den sehr hohen Dosierungen zu beruhigen.

*In vitro* beeinträchtigt TBBPA einige Aspekte bezüglich der Schilddrüsen- und Östrogenhormone, siehe Kapitel A.2.7.1. Außerdem wird diesem BFR wegen der Inhibition von CYP2C9 und der Zerstörung der Mitochondrien eine Minderung der oxidativen Phosphorylierung zugesprochen. (Birnbaum, 2004) Diese Effekte scheinen sich nicht auf die vorgestellte Studie und seine CYPs1-3 auszuwirken.

Zur Ergründung, warum TBBPA in der Studie keine Wirkung auf die CYPs1-3 hinterließen, müssen verschiedene Faktoren betrachtet werden. Zum einen kann es natürlich tatsächlich keinen Effekt auf diese speziellen CYPs geben, während *in vitro* CYP2C9 beeinflusst wird. Zum anderen und viel stärker wiegend scheint die Bioverfügbarkeit zu gering, um überhaupt Effekte auslösen zu können.

Wie schon in Kapitel A.2.6 erwähnt, wird der Großteil des TBBPA in der Ratte unmetabolisert wieder ausgeschieden. Allerdings wurden auch Glukuronidkonjugate gefunden, die aus dem

hepatischen Kreislauf in der Darmflora dekonjugiert werden. Demnach muss TBBPA in die Leber gelangt sein. Vermutlich schützt hier eine rasche Metabolisierung in der Phase II des Fremdstoffmetabolismus und eine zügige Exkretion mithilfe von Proteinen der Phase III vor einer anhaltenden Enzyminduktion von CYPs1-3 über 28 Tage. Damit könnte sich der Körper im adaptiven Prozess befinden.

In einer Vergleichsstudie zur Toxikokinetik zwischen Ratte und Mensch bei einmaliger oraler Aufnahme von TBBPA konnten ebenfalls nur geringe Dosen, wenn überhaupt, im Blut detektiert werden. Die schnelle Metabolisierung zu nachgewiesenen Glukuronid-, bzw. Sulfatkonjugaten schützt vor eventuellen negativen Effekten des TBBPA. (Schauer, 2006) Somit scheint die geringe Bioverfügbarkeit der maßgebliche Grund für fehlende inhibitorische oder induktive Effekte an den wichtigen fremdstoffmetabolisierenden Enzymen CYP1A, CYP2B und CYP3A zu sein. Dies steht im Einklang mit den relativ geringen Konzentrationen im Blutplasma langzeitexponierter Mitarbeiter in Recyclinganlagen, siehe Kapitel A.2.5. CYP2B und CYP3A als Markerproteine werden auf Transkriptionsebene über die nukleären Rezeptoren CAR und PXR reguliert. Diese Signalkaskade wird in der vorgestellten Studie wahrscheinlich nicht angeregt, da die DNA-Transkriptionsrate, gemessen als mRNA-Menge, nicht erhöht war. CAR und PXR sind auch an der Transkriptionsmodulation einer Reihe anderer Enzyme beteiligt, z.B. CYP2C, die über diesen Weg somit sicherlich nicht induziert werden.

# D.2 HBCD

Das mit mehr als 9.000 Tonnen in der jährlichen Anwendung zweitwichtigste BFR in Europa, das HBCD, wurde in Umwelt- und Humanproben gefunden. Ihm, das sich über die Nahrungskette anreichert, wird eine bioakkumulierende Fähigkeit zugesprochen. Mit diesem Hintergrund müssen die Ergebnisse aus der 28 Tage-Studie diskutiert werden. Nach oraler Verabreichung von HBCD an Ratten in den Dosen bis zu 200 mg/kg KG/d, gelöst in Maiskeimöl, zeigten sich induzierende Effekte auf CYP2B und CYP3A. Die *in vitro* Ergebnisse mit Primärhepatozyten bestätigen die induzierenden Effekte von HBCD auf diese CYPs.

HBCD	RNA		Weste	rn Blot	Enzymaktivität		
In vivo	9	6	9	6	9	6	
CYP1A	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	
CYP2B	↑	↑ (	↑ (	↑	$\rightarrow$	↑ (	
CYP3A	1	↑	<b>↑</b>	↑	↑	$\rightarrow$	
In vitro							
CYP1A	1		-	$\rightarrow$			
CYP2B	1						
CYP3A	1	È la construction de la construc		<b>↑</b>			

Tabelle 16: Übersicht der Induktionsergebnisse von HBCD

Für CYP1A konnte kein Induktionspotential *in vivo* nachgewiesen werden. Die leichte Erhöhung auf RNA-Ebene *in vitro* konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Zur Ergründung dieses Gegensatzes muss nun explizit auf die Isoenzyme eingegangen werden. Auf RNA-Ebene wurden mittels der RealTime-PCR CYP1A1 und CYP1A2 zusammen detektiert. Auf Proteinebene wurde nur auf CYP1A1 geprüft, was aber weder *in vivo* noch *in vitro* detektiert wurde. Demnach könnte nur CYP1A2 *in vitro* induziert worden sein. Beim Vergleich der Reaktionsweise mit der von Dexamethason deckt sich diese Ergründung mit den Resultaten auf RNA-Ebene von Martignoni et al: Dexamethason induziert in der Rattenleber *in vivo* CYP2B1 und CYP3A1, nicht jedoch CYP1A1 und CYP1A2. In den *in vitro* behandelten Leberschnitten wurde zusätzlich zu CYP2B1 und CYP3A1 noch CYP1A2 als induzierend nachgewiesen. (Martignoni, 2004) Dexamethason ist kein Ah-Rezeptor-Agonist und dementsprechend sind andere Signalkaskaden für die Induktion von CYP1A2 *in vitro* verantwortlich. Gleiches gilt für HBCD, weswegen auch *in vivo* keine Effekte gefunden wurden.

Diskussion

Hamers et al. zeigten im DR-CALUX-Assay in H4IIE-Zellen, womit die Aktivierung an AhRsensitive XRE-Enhancersequenzen bei CYP1A-Genen mittels Reportergenvektor nachgewiesen werden kann, dass dem HBCD keine agonistische, sondern leicht antagonistische Wirkung bezüglich dem Ah-Rezeptor zugesprochen werden kann. (Hamers, 2006) Ronisz et al. zeigten im EROD-Assay ebenfalls eine inhibierende Wirkung des HBCD, allerdings in der Regenbogenforelle. (Ronisz, 2004) Dies steht im Gegensatz zu den leicht induzierenden Effekten auf RNA-Ebene in der vorgestellten *in vitro*-Studie in Primärhepatozyten der Ratte. Somit scheint der Weg der CYP1A-Induktion bzw. Inhibition durch HBCD speziesabhängig zu sein, abhängig von der Wahl der Testmethode, oder/und von der Zusammensetzung der industriell hergestellten Testsubstanz.

Bei Betrachtung der geschlechtsspezifischen Unterschiede wird augenscheinlich, dass für die weiblichen Tiere, die CYP3A-Induktion stärker hervortritt als für die männlichen. Da CYP3A1 bei den männlichen Tieren konstitutiv stärker exprimiert wird (Anakk, 2003), ist die Spanne bis zur maximalen Induktionsfähigkeit über den gleichen Signalweg kleiner als bei den weiblichen Tieren. Zusätzlich können geschlechtsspezifische, hormonelle Interaktionen zu diesen Unterschieden führen.

CYP2B war bei den männlichen und weiblichen Tieren auf RNA und Proteinebene dosisabhängig erhöht. Auf der Enzymaktivitätsebene wurde nur noch die männliche PROD-Aktivität als signifikant erhöht bei den Dosen 10 und 100 mg/kg KG/d befunden. Für die weiblichen Tiere waren auf dieser Ebene keine Effekte auszumachen. Zum einen ist dies mit einer relativ hohen interindividuellen Schwankungsbreite zu erklären, zum anderen sind die Effekte nicht so stark ausgeprägt wie bei CYP3A. Dies kann ein Indiz auf eine PXR statt CAR vermittelte Genregulation sein. CAR und PXR können an das gleiche responsive Element der Enhancerregion von CYP2B, das PBREM, binden, wobei CAR eine größere Affinität aufweist als PXR, zumindest bei Maus und Mensch. (Makinen, 2002) Wird also PXR aktiviert, bindet es auch an PBREM, allerdings weniger stark als CAR es tun würde und geringer als an das XREM, der CYP3A-Enhancersequenz.

CYP2B und CYP3A können über PXR, CAR und andere nukleäre Rezeptoren reguliert werden. Daher lag es nahe, herauszufinden, ob PXR an der HBCD vermittelten Genregulation beteiligt ist. Dies konnte Silke Weyland in Zelllinien im Rahmen ihrer Diplomarbeit zeigen. Mittels Reportergenassay bei teilweiser Kotransfektion eines PXR-Expressionsplasmids konnte sie nachweisen, dass eine Inkubation von HBCD zur Aktivierung von PXR führt und die Genregulation über die Enhancersequenz XREM der Ratte angeschalten wird. Dabei scheint aber der PXR der Ratte sensitiver auf eine Aktivierung zu reagieren als der PXR des Menschen. (Weyland, 2005)

Die Aktivierung des PXR steuert nicht nur die Genregulation von CYP3A, sondern beeinflusst auch den Transkriptionsmechanismus anderer Gene. Die Induktionsergebnisse von CYP3A aus den vorgestellten *in vitro* und *in vivo* Studien deuten darauf hin, dass ebenso UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A, Sulfotransferase (SULT)2A, Multi Drug Resistance Gene (MDR)1 und Multi Drug Resistance Protein (MRP)3, sowie weitere Enzyme des Fremdstoffmetabolismus induziert werden können.

Somit bleibt bewusst zu machen, dass eine Induktion von CYP3A und weiteren Enzymen des Fremdstoffmetabolismus zu einer erhöhten Metabolisierungsrate verschiedener endogener und exogener Stoffe führen kann. Im Falle von CYP3A sind Testosteron und Progesteron zu erwähnen, Thyroidhormone werden durch UGTs und SULTs metabolisierend deaktiviert. Den letztgenannten Effekt konnten Partnergruppen der *in vivo* Studie anhand des reduzierten Gesamtgehalts an Schilddrüsenhormonen im Blut bei höheren HBCD-Dosierungen unterstützen. Zusätzlich kam es zu erhöhtem Gewicht der Schilddrüse und der Hypohphyse. Dies wird durch den negativen Feedbackmechanismus in der Hypthalamus-Hypophysen- Schildrüsen-Achse bei lang anhaltender Verminderung der Schilddrüsenhormone ausgelöst. (van der Ven, 2006; Curran, 1991) Über diesen Feedbackmechanismus greifen ebenso bekannte Substanzen, wie Phenobarbital, Rifampicin, TCDD und andere polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe in das hormonelle Gleichgewicht der Schilddrüsenhormone von Ratten ein. Bisher konnte aber noch nicht nachgewiesen werden, dass dieser Mechanismus auch am Menschen zu adversen Effekten führt. (Curran,1991)

Mechanistische Untersuchungen zu den Eingriffen in den Hormonhaushalt von Ratte und Mensch sollten das Gefährdungspotential von HBCD genauer beschreiben. In Verbindung der Ergebnisse und Überlegungen aus dem Fremdstoffmetabolismus mit den Veranschaulichungen der steigenden Gewebskonzentration über die letzten Jahrzehnte in Tieren bleibt zu schließen, dass HBCD ein sorgsam zu überwachendes BFR bleibt.

# D.3 Pentamix

Dem wichtigen BFR auf dem amerikanischen Markt, dem industriellen Pentamix, wurden schon in den letzten Jahren beträchtliche toxikologische Wirkungen nachgewiesen, sodass industrielle Selbstverpflichtungen und Prohibitionen in Europa, Japan und einigen Staaten Amerikas zu vermindertem Einsatz weltweit beitrugen. Nichtsdestotrotz wurden Kongenere des Pentamixes in vielen abiotischen Systemen detektiert und in allen Organismen vermutet. Die starke Bioakkumulation in der Nahrungskette, Übertragung über die Muttermilch und reprotoxische Effekte motivierten zu weiteren Untersuchungen.

Pentamix	RNA		Weste	rn Blot	Enzyma	Enzymaktivität		
In vivo	Ŷ	3	Ŷ	3	9	8		
CYP1A	$\rightarrow$	$\rightarrow$	<b>↑</b>	<b>↑</b>	<b>↑</b>	<b>↑</b>		
CYP2B	1	↑	↑	↑	↑	<b>↑</b>		
CYP3A	7	7	7	7	$\rightarrow$	$\rightarrow$		
In vitro								
CYP1A		↑		<b>↑</b>				
CYP2B		↑						
CYP3A		↑		<u></u>				

Tabelle 17: Übersicht über die Induktionsergebnisse vom Pentamix

In einer 28 Tage –Studie wurde der industriell hergestellte und im Labor aufgereinigte Pentamix, gelöst in Maiskeimöl, den Ratten in den niedrigen Dosen 0 / 0,27 / 0,82 / 2,47 / 7,4 / 22,2 / 66,7 / 200 mg/kg KG täglich per Schlundsonde verabreicht. Für die drei Enzymsubfamilien CYP1A, CYP2B und CYP3A wurden induzierende Effekte in der Rattenleber ausgemacht. *In vitro* konnte dies in Primärhepatozyten bestätigt werden. Schon in anderen Studien wurde gezeigt, dass einige BDEs kompetetiv an den AhR binden und Induktionen von CYP1A auf mRNA-, Protein- und Enzymaktivitätsebene hervorrufen. (Behnisch, 2003; Chen, 2001; Chen, 2003)

Der Pentamix mit seinem Kongenerencocktail aus hauptsächlich tetra-, penta- und hexaBDEs zeigte in den dargestellten Experimenten ebenso ein Potential zur CYP1A-Induktion wie sie auch schon Chen et al. in Primärhepatozyten mit einzelnen BDEs vorstellten. Während allerdings im dargestellten *in vitro* EROD-Assay der kommerzielle Pentamix ab Konzentrationen um 1  $\mu$ M die Expression von CYP1A induzierte, konnten Chen et al. beim kommerziellen Gemisch keine EROD-Aktivität messen, für einzelne Kongenere des Gemisches, namentlich BDE-66, BDE-100, BDE-153, BDE-183, mit EC<sub>50</sub>-Werten von
0,8-9 µM allerdings schon. Aufgrund der Verteilung der einzelnen Kongenere ist es rechnerisch schwer möglich von additiven Induktionseffekten auszugehen. (Chen, 2001) Aus anderen Studien wurde geschlussfolgert, dass der kommerzielle, nicht aufgereinigte Pentamix ab Dosen von 3-10 mg/kg KG/d in der Ratte zu induktiven Effekten bei CYP1A führt (von Meyerinck, 1990; Zhou, 2001), während in der aufgeführten Studie bei 7,4 mg/kg KG/d noch keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Auch in H4IIE-Zellen, einer Leberzelllinie der Ratte, sollen PBDE-Kongenere CYP1A induzieren. (Behnisch, 2003).

Eine Induktion von CYP1A könnte auf eine Aktivierung über den AhR hinweisen. Allerdings ist durch Untersuchungen über Struktur-Aktivitäts-Relationen bekannt, dass in die Ligandenbindungstasche des AhR planare Strukturen, wie TCDD und coplanare PCBs docken. (Birnbaum, 1994) PBDEs sind allerdings nicht coplanar und lassen auch nach Strukturaktivitätsanalysen keine Bindung an den AhR vermuten, sodass andere Mechanismen zur CYP1A-Induktion führen müssten. (Wang, 2005)

Konträr dazu fand Peters keine Induktionswirkungen für CYP1A durch gleiche BDE-Kongenere wie Behnisch et al. weder in Zelllinien von Ratte, Maus und Mensch, noch in Primärhepatozyten von Affen, sondern eher antagonistische Effekte. (Peters, 2006) Hamers et al. zeigten mittels eines XRE-Reportergenassay in H4IIE-Zellen für einige Kongenere agonistische (z.B. BDEs-38, 153, 190), für einige antagonistische Effekte (z.B. BDEs-28, 47, 169) bezüglich einer AhR-Bindung. (Hamers, 2006)

Zum Vergleich dieser heterogenen Studien muss die Reinheit der Substanzen diskutiert werden, denn schon Spuren an halogenierten Dibenzofuranen und Dibenzodioxinen, wie sie in den kommerziellen Gemischen vorkommen, können zu den CYP1A-Induktionsergebnissen erheblich beitragen (Behnisch, 2003). Diesen Einfluß konnte auch Peters bei BDE-77 im Vergleich zu einem hochreinen Kongener nachweisen. (Peters, 2006)

In der dargestellten *in vivo*-Studie, sowie in den *in vitro*-Experimenten in Primärheptozyten der Ratte lagen die halogenierten Furane und Dioxine des aufgereinigten Pentamixes unterhalb des Detektionslevels (mündlich von Ake Bergmann), bzw. für 2,3,7,8-Tetrabromodibenzofuran (TBDF) bei ca. 0,0001%. Dies bedeutete eine Dosis von ca. 0,2 ng TBDF/kg KG/d bei der Dosisgruppe 200 mg Pentamix/kg KG/d bzw. ca. 0,02 ng TBDF bei der Dosisgruppe 22 mg Pentamix/kg KG/d. *In vitro* bedeutete dies eine TBDF-Konzentration von ca.  $10^{-13}$  M bei der etwaigen EC<sub>50</sub> vom Pentamix von  $10^{-6}$  M. Diese minimale Verunreinigung kann rechnerisch *in vitro* nicht alleinig zur CYP1A-Induktion beitragen. Der EC<sub>50</sub> von TBDF für eine EROD-Induktion in H4IIE-Zellen liegt in etwa bei dem von TCDD, ca. 10<sup>-9</sup> M. (Behnisch, 2003) Somit bleibt fraglich, ob nur diese Verunreinigungen zur CYP1A-Induktion *in vivo* beitragen kann. Möglich wäre eine Bioakkumulation über den Behandlungszeitraum. Da PBDEs photolytisch sind, ist auch denkbar, dass die Photometaboliten, die in jeder Studie unterschiedlich stark auftreten können, oder aber auch die in den Leberzellen entstehenden endogenen Metaboliten zur CYP1A-Induktion führen. (Olsmann, 2006)

Für CYP2B zeigten sich in der dargestellten Studie in männlichen und weiblichen Ratten bereits ab so niedrigen Dosen von 2,47 mg/kg KG auf der Enzymaktivitätsebene Induktionseffekte signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.

Auch andere *in vivo*-Studien bestätigten die Induktionseffekte im PROD-Assay mit einzelnen Kongeneren, wie BDE-47, oder in kommerziellen Pentagemischen. In weiblichen Sprague Dawley-Ratten erreichte BDE-47 allein eine PROD-Aktivität 20fach über der Kontrolle bei einer Dosis von 6 mg/kg KG/d, der kommerzielle Pentamix Bromkal-70-5DE fünffach über der Kontrolle bei einer Dosis von 18 mg/kg KG/d. Der kommerzielle Pentamix DE-71 führte in jungen Long Evans-Ratten zu etwa zehnfach erhöhten Werten gegenüber der Kontrollgruppe bei einer Dosis von 10 mg/kg KG/d. (Hallgren, 2001; Hallgren, 2002; Zhou, 2001)

Die dargestellte Studie in Wistar-Ratten mit dreifachen bzw. 6-10 fachen PROD-Aktivitäten über der Kontrollgruppe bei einer Dosis von 2,74 mg bzw. 7,4 mg/kg KG/d bzw. lässt sich sehr gut mit den Daten der anderen Gruppen vergleichen. Eventuell sind Wistar-Ratten noch etwas sensitiver bezüglich einer CYP2B-Induktion durch PBDEs. BDE-47 wird dabei einen großen, aber rechnerisch nicht den alleinigen Anteil zur CYP2B-Induktion beitragen. Wiederum waren über den gesamten Dosisbereich betrachtet, die weiblichen Tiere einer stärkeren relativen CYP2B-Induktion unterzogen als die männlichen. Dies lässt sich aber mit einer geringeren konstitutiven Expression von CYP2B in den weiblichen Ratten erklären. Bei Frauen ist die konstitutive Expression in der Leber höher als bei Männern, sodass sich im Menschen die relative Induzierbarkeit durch CYP2B-Induktoren umkehren lassen müsste.

Ob der nukleäre Rezeptor CAR als Schlüssel bei der Transkriptionssteigerung fundiert, ließe sich nur über ein Reportergenexperiment nachweisen. Da aber auch PXR an das responsive Element PBREM in der Enhancerregion von CYP2B binden kann, wurde in der Diplomarbeit von Silke Weyland untersucht, ob zusätzlich zu HBCD auch der Pentamix im Reportergenassay PXR aktiviert. In ihrer Arbeit an Primärhepatozyten der Ratte bestätigte

sie den Verdacht und zeigte zusätzlich, dass die Aktivierung über den PXR der Ratte mehr als doppelt so effizient war wie die Aktivierung über den PXR des Menschen. (Weyland, 2005). Darüber hinaus zeigte Lieke Peters in ihrer Promotionsarbeit, dass die BDEs-47, -77 und -99 die Transkription des humanen PXR in HepG2-Zellen, einer humanen Krebszelllinie, erhöhen. (Peters, 2006)

Da PXR ebenso an das XREM in der Enhancerregion von CYP3A bindet, verwundert es nicht, dass der Pentamix *in vivo* und *in vitro* zur Induktion führt. Auch wenn durch die große individuelle Schwankungsbreite innerhalb einer Dosisgruppe einzelne Dosisgruppen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe erreichen, so ist doch der dosisabhängige Trend zur Induktion statistisch nachgewiesen. Wiederum sind die relativen Erhöhungen gegenüber der Kontrollgruppe bei den weiblichen Ratten stärker ausgeprägt, als bei den männlichen, deren basale CYP3A-Expression höher ist. Beim Menschen sind keine deutlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede gefunden worden, allerdings variiert die Enzymaktivität erheblich. (Wolbold, 2004)

# D.4 Decamix

Mit dem, gemessen am Verbrauch, wichtigsten BFR auf dem amerikanischen Markt und zweitwichtigstem BFR auf dem Weltmarkt, dem industriellen Decamix, wurden in den letzten Jahren mehrere toxikologische Studien durchgeführt, insbesondere weil eine ubiquitäre Verteilung in abiotischer und biotischer Umwelt nachgewiesen werden konnte. Die Halbwertszeit des BDE209 im Menschen ist sehr gering (11-18 Tage) und trotzdem enthalten humane Proben dieses Kongener und seine Metabolite, sodass von einer steten Aufnahme der Decamix-Bestandteile ausgegangen werden muss. (Thuresson, 2005)

Decamix	RN	RNA Western Blot Enzy		Western Blot		aktivität
In vivo	9	50	9	6	9	50
CYP1A	↑	↑	↑	<u>↑</u>	↑	<u>↑</u>
CYP2B	$\rightarrow$	<u>↑</u>	↑	↑	↑	<b>↑</b>
CYP3A	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$	$\rightarrow$

Tabelle 18: Übersicht über Induktionsergebnisse vom Decamix

In einer 28 Tage –Studie wurde der industriell hergestellte und im Labor aufgereinigte Decamix den Ratten in den Dosen 0 / 1,87 / 3,75 / 7,5 / 15 / 30 mg/kg KG einmal täglich und in den Dosen 0 und 30 mg/kg KG zweimal täglich verabreicht. Für die Enzymsubfamilien CYP1A und CYP2B wurden induzierende Effekte in der Rattenleber ausgemacht. Für CYP3A konnte keine Enzyminduktion nachgewiesen werden.

Für CYP1A wurden auf mRNA-, Protein- und Enzymaktivitätsebene geringe induzierende Effekte gefunden. Bei höchster Dosis erreichten die relativen Induktionswerte nur etwa doppelte Wirkstärke. Daher scheint der Decamix auf den AhR-Rezeptor-Signalweg nur einen geringen Einfluß zu haben. Diesmal waren die relativen Induktionen für die männlichen Tiere etwas stärker ausgeprägt als für die weiblichen. Gleiches kann für die Induktion von CYP2B gesagt werden. Die CYP2B-Expression ist sehr niedrig, sodass der Decamix nur einen geringen Einfluß auf die Transkription von CYP2B zu haben scheint.

Dieser Effekt auf die beiden Enzymsubfamilien könnte einerseits durch eine geringe Bioverfügbarkeit hervorgerufen sein oder durch eine leichte Kontamination mit aktiveren Komponenten, bzw. eine Metabolisierung zu aktiveren Substanzen. Partnergruppen analysierten gemittelt in der höchsten Dosis 3 mg BDE-209 pro Gramm Nassgewicht der Leber. Damit scheidet der Verdacht der geringen Bioverfügbarkeit aus. Debromierte Metabolite scheinen nicht als Begründung für eine leichte Induktion herhalten zu können, da zwar in geringen Konzentrationen NonaBDEs und in Spuren ein OctaBDE und ein HeptaBDE gefunden wurden, aber geringer bromierte BDEs nicht nachgewiesen werden konnten. Die höher bromierten BDEs wurden in *in vitro* Tests weder als Agonisten noch Antagonisten für eine AhR-vermittelte Transkription bestimmt. (van der Ven, 2008) Ob CAR oder PXR bei dieser geringen Induktion durch den Decamix eine Rolle spielen, wurde nicht weiter untersucht. Dies ist kaum denkbar aufgrund dessen, dass beide nukleäre Rezeptoren an PBREM und XREM binden können, aber nur CYP2B leicht induziert wurde, nicht jedoch CYP3A.

Im Risk Assessment der Europäischen Union wurde 2002 noch konstatiert, dass keine weiteren Untersuchungen und keine Risikoverminderungen notwendig wären. (EU RAR, 2002) Diese Aussage ist in Anbetracht der hier gezeigten Untersuchungen zu unterstützen, schließt aber Untersuchungen von Partnergruppen aus. Die geringen Induktionsstärken für die gezeigten CYPs müssen als adaptiver Prozess innerhalb des Fremdstoffmetabolismus gewertet werden. Die nukleären Rezeptoren scheinen nicht oder nur zu geringem Anteil an Expressionsprozessen durch Decamix beteiligt zu sein und daher fungieren CYP1A, CYP2B und CYP3A hierfür nicht als Markerenzyme.

# D.5 Allgemeine Diskussion

# D.5.1 Studiendesign

In den aufgeführten Studien zeigte sich durchweg eine hohe interindividuelle Schwankungsbreite aller Enzyme in allen Dosen. Bei der Gabe übers Futter könnte dies durch eine interindividuelle Aufnahme der Substanz herrühren. Aber selbst in den Kontrollgruppen zeigte sich dieser Effekt. Natürlicherweise treten im Bereich des Fremdstoffmetabolismus große Schwankungen auf. Dadurch lassen sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe nur schwer nachweisen. Aus statistischer Sicht müsste die Tieranzahl pro Dosisgruppe erhöht werden, um die substanzbedingten Unterschiede von den natürlichen Schwankungen klarer abgrenzen zu können. Aus Tierschutzgründen ist dieser Schritt - auch rechtlich - limitiert. Im Gegenzug wäre aber sicherlich auch bei einigen Studien der LOEL bei tieferen Konzentrationen erkannt worden.

# D.5.2 CYP-Induktoren und deren Folgen

Die Enzyme CYP1A, CYP2B und CYP3A werden auch als Markerenzyme für andere Effekte betrachtet. Daher sollen Folgen der Induktion von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus in diesem Kapitel über die Betrachtung der einzelnen BFRs hinaus ergänzt werden.

# D.5.2.1 CYP1A

Eine CYP1A Induktion, wie bei den PBDEs gezeigt, führt zu einigen weiterführenden hypothetischen Überlegungen:

1.) Eine CYP1A-Induktion wird mit erhöhter Tumorprävalenz korreliert. (Nebert, 1996) CYP1A kann PAKs zu Intermediaten metabolisieren, die an DNA binden können und hernach bei Nichtreparatur des Schadens zu Mutationen und folgend neoplastischen Transformationen führen kann. (Shimada, 1996)

 Außerdem wird diskutiert, dass vermehrt reaktive Sauerstoffspezies durch Induktoren von CYP1A hervorgebracht werden, die wiederum zu DNA-Schäden führen und die Tumorprävalenz erhöhen können. (Wyde, 2001) 3.) Insofern CYP1A als Markerenzym für eine AhR-vermittelte Induktion steht, bleibt zu erwarten, dass auch andere Prozesse, an denen der AhR involviert ist, durch Induktoren beinträchtigt würden. Als Enzyme des Fremdstoffmetabolismus sind hier Glutathion-S-transferase Ya, NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase, Aldehyd-3-dehydrogenase (ALDH3) und UDP-Glucuronosyltransferasen 1 (UGT1) zu nennen. (Woods, 2007; Bock, 1994; Rowlands1997; Whitlock, 1999)

4.) AhR wird auch ein Zusammenspiel mit dem endokrinen System, insbesondere mit Östrogen-induzierten Genen, zugeschrieben, sodass der antiöstrogene Effekt vieler AhR-Agonisten für die Karzinogenese hormonabhäniger Tumore von Bedeutung ist. (Safe, 1998; Safe, 2001; Pascussi, 2007)

Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, dass BFRs ein kanzerogenes Potential besitzen. Es ist jedoch zu beachten, dass eine Tumorentstehung durch protektive Prozesse des Körpers, wie Reparatursysteme und Apoptose, zumeist abgewendet werden können. Die Protektion könnte allerdings durch "Überlastung" mit mehreren ähnlich wirkenden oder synergistisch wirkenden Substanzen ausgehebelt werden.

# D.5.2.2 CYP2B

Eine CYP2B Induktion, wie bei HBCD und den PBDEs gezeigt, führt zu einigen weiterführenden hypothetischen Überlegungen diesbezüglich:

 Interindividuelle Belastungen mit PBDEs oder HBCD könnten zu konzentrationsabhängigen CYP2B-Aktivitäten führen, was ebenso interindividuellen Metabolisierungsraten von Arzneimitteln oder anderen Fremdstoffen bedeuten könnte. Beispielsweise ist bekannt, dass Patienten, die mit Cyclophosphamid behandelt werden, eine interindivuelle 4-Hydroxylierung aufweisen. Möglicherweise begründet sich dies auf verschiedene Belastungen mit CYP2B-Induktoren. (Code, 1997)

2.) Über CYP2B werden auch endogene Substanzen verstoffwechselt, beispielsweise ist Testosteron ein Substrat für CYP2B. Somit könnte es für einige endogene Gleichgewichte zu Disbalancen durch CYP2B-Induktoren kommen, die sich im Bereich der Geschlechtshormone zu Verweiblichung oder Vermännlichung ausprägen könnten. Forscher versuchen bereits epidemiologisch festgemachte Veränderungen, bspw. Spermienparameter bei Männern, mit Umweltchemikalien zu kausalisieren. (Hauser, 2002)

Diskussion

3.) CYP2B kann über den Transkriptionssignalweg des nukleären Rezeptors CAR exprimiert werden. Somit dürften auch weitere Gene, die über CAR reguliert werden, vermehrt transkribiert bzw. repressiert werden. CAR wirkt in der Ratten- und Mausleber induzierend auf Carboxylesterasen, GST, ALDH, SULT, UGT, Monoaminoxidasen, Acyltransferasen und ABC-Transporter. Folglich könnten auch deren Substrate vermehrt metabolisiert bzw. transportiert werden. (Ueda, 2002; Maglich, 2002; Woods, 2007)

4.) Ein Zusammenhang von CYP2B-Induktion und Tumorpromotion wird seit längerem diskutiert. Insbesondere wird darauf verwiesen, dass viele CYP2B-Induktoren auch Tumorpromotoren sind. Möglicherweise sind Belastungen mit CYP2B-Induktoren Cofounder für Krebsinzidenzen. (Yamada, 2006)

# D.5.2.3 CYP3A

Eine CYP3A Induktion, wie bei HBCD und den PBDEs gezeigt, führt zu einigen hypothetischen Überlegungen:

1.) CYP3A metabolisiert den Großteil der bisher verabreichten Arzneimittel. Insofern sind interindividuelle Belastungen mit CYP3A-Induktoren eine Gefahrenquelle zur Überdosierung oder Unterdosierung von Medikamenten. (Guengerich, 2007)

2.) Über CYP3A werden auch endogene Substanzen verstoffwechselt, beispielsweise sind Progesteron, Testosteron und Androstendion Substrate für CYP3A. Somit könnte es für einige endogene Gleichgewichte zu Disbalancen durch CYP3A-Induktoren kommen. (Guengerich, 1999)

3.) CYP3A aktiviert Prokarzinogene wie Aflatoxin B1, PAKs, ein Tabakrauch-spezifisches Nitrosamin und 6-Aminochrysen. Somit wird die metabolische Giftung bei gleichzeitiger Exposition eines CYP3A-Induktors und der hier erwähnten Substanzen verstärkt. Es steigt also die Geschwindigkeit der Umsetzung und somit auch die Konzentration des aktivierten Metaboliten. (Hukkannen, 2000)

4.) CYP3A kann über den Transkriptionssignalweg des nukleären Rezeptors PXR exprimiert werden. Somit dürften auch andere Enzyme, die über PXR reguliert werden, induziert werden. Beispielsweise könnte es damit zu Transkriptionen von weiteren Genen des Fremdstoffmetabolismus wie UGT, GST, SULT, Acyltransferasen und ABC-Transportern kommen. Deren Substrate können somit wiederum verstärkt metabolisiert bzw. transportiert werden. (Maglich, 2002; Woods, 2007)

# D.5.3 Advers und adaptiert

Bei Auftreten von Inhibitionen oder Induktionen im Bereich des Fremdstoffmetabolismus wird diskutiert, welche Effekte als advers und welche als adaptiv anzusehen sind. Generell ist der Fremdstoffmetabolismus natürlich als Schutzfunktion des Körpers zu sehen, der sich auf die Fremdstoffgabe adaptierend einstellt und den dazugehörigen Metabolismus zur Ausscheidung des Fremdstoffes erhöht. Nach Absetzen der Substanz sollte sich der Körper wieder regenerieren und keine bleibenden substanzspezifischen Effekte hinterlassen.

Im Hinblick auf die Einflüsse des Fremdstoffmetabolismus auf den Hormonhaushalt, giftende Aktivitäten, die Einwirkung auf Tumorbildungsprozesse und Medikamentenwechselwirkungen ist die Grenze zu adversen Effekten allerdings überschneidend. Für die Risikobewertung von BFRs sind Induktionen im Bereich des Fremdstoffmetabolismus somit Marker zur Wirkweise der Substanzen, jedoch sollten die eigentlichen adversen Effekte gesondert nachgewiesen werden. (ECETOC, 2002; Xu, 2005)

# E Literaturverzeichnis

- Alaee, M., Arias, P., Sjodin, A., and Bergman, A. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ Int* 29, 683-689.
- Alaee, M., Sergeant, D. B., Ikonomou, M. G., and Luross, J. M. (2001). A gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (GC/HRMS) method for determination of polybrominated diphenyl ethers in fish. *Chemosphere* 44, 1489-1495.
- Allchin, C. R., Law, R. J., and Morris, S. (1999). Polybrominated diphenylethers in sediments and biota downstream of potential sources in the UK. *Environmental Pollution* **105**, 197.
- Anakk, S., Ku, C. Y., Vore, M., and Strobel, H. W. (2003). Insights into gender bias: rat cytochrome P450 3A9. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 703-709.
- Arbeli, Z., Ronen, Z., and Diaz-Baez, M. C. (2006). Reductive dehalogenation of tetrabromobisphenol-A by sediment from a contaminated ephemeral streambed and an enrichment culture. *Chemosphere* 64, 1472-1478.
- Arias, P. (2001). Brominated flame retardants—an overview. The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants., pp. 17-19.
- ATSDR (2002). TOXICOLOGICAL PROFILE FOR POLYBROMINATED BIPHENYLS AND POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS. DRAFT. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia.
- Becher, G. (2005). The stereochemistry of 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane and its graphic representation. *Chemosphere* **58**, 989-991.
- Behnisch, P. A., Hosoe, K., and Sakai, S. (2003). Brominated dioxin-like compounds: *in vitro* assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environ Int* 29, 861-877.
- Bergman, A., Ostman, C., Nybom, R., Sjodin, A., Carlsson, H., Nilsson, U., and Wachtmeister, C. A. (1997). Flame retardants and plasticisers on particulate- in the modern computerised indoor environment. *Organohalogen Compounds* 33, 414-419.
- Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., et al. (1998). Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12208-12213.
- Birnbaum, L. (2006). Brominated Flame Retardants:What We Know and What We Don't. International BFR Meeting.
- Birnbaum, L. S. (1994). The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 9**, 157-167.
- Birnbaum, L. S., and Cohen Hubal, E. A. (2006). Polybrominated diphenyl ethers: a case study for using biomonitoring data to address risk assessment questions. *Environ Health Perspect* **114**, 1770-1775.

- Birnbaum, L. S., and Staskal, D. F. (2004). Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ Health Perspect* **112**, 9-17.
- Blumberg, B., and Evans, R. M. (1998). Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev* **12**, 3149-3155.
- Bock, K. W. (1994). Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **125**, 1-42.
- Boecker, R. H., Schwind, B., Kraus, V., Pullen, S., and Tiegs, G. (2001). Cellular disturbance caused by various brominated flame retardants. The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants. BFR 2001.
- Booij, K., Zegers, B. N., and Boon, J. P. (2002). Levels of some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants along the Dutch coast as derived from their accumulation in SPMDs and blue mussels (Mytilus edulis). *Chemosphere* **46**, 683-688.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brenner, A., Mukmenev, I., Abeliovich, A., and Kushmaro, A. (2006). Biodegradability of tetrabromobisphenol A and tribromophenol by activated sludge. *Ecotoxicology* 15, 399-402.
- BSEF (2001). Major Brominated Flame Retardants Volume. Bromine Science and Environmental Forum. www.bsef.org
- BSEF (2003). HBCD Fact Sheets. www.bsef.org
- BSEF (2004). TBBPA. www.bsef.org
- BUA (2001). Proposal made by the "advisory group on toxicology" on hazardous substances committee with regard to the clasfication of HBCD. BUA. http://www.baua.de/nn\_17206/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/905/905-1-2-5-6-9-10-hexabromocylodecan.pdf
- CEPA (2004). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) [Tetra-, Penta-, Hexa-, Hepta-, Octa-, Nona- and Deca- Congeners]. http://www.ec.gc.ca/CEPARegistry/documents/subs\_list/PBDE\_SAR/HC\_SOS\_PBDE \_e.pdf (15-Feb-2007)
- Chang, Y. S. (2005). Recent Studies in the Monitoring and Risk Assessment of POPs (Dioxin, PCBs, and PBDEs). In *2005 Dioxine Symposium -Dioxins in Food of Animal Origin*, Seoul, National Vetrinary Research & Quarantine Service.
- Chao, H. R., Wang, S. L., Lee, W. J., Wang, Y. F., and Papke, O. (2007). Levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from central Taiwan and their relation to infant birth outcome and maternal menstruation effects. *Environ Int* 33, 239-245.
- Chen, G., and Bunce, N. J. (2003). Polybrominated diphenyl ethers as Ah receptor agonists and antagonists. *Toxicol Sci* **76**, 310-320.

- Chen, G., Konstantinov, A. D., Chittim, B. G., Joyce, E. M., Bols, N. C., and Bunce, N. J. (2001). Synthesis of polybrominated diphenyl ethers and their capacity to induce CYP1A by the Ah receptor mediated pathway. *Environ Sci Technol* **35**, 3749-3756.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Christensen, J. H., Glasius, M., Pecseli, M., Platz, J., and Pritzl, G. (2002). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine fish and blue mussels from southern Greenland. *Chemosphere* **47**, 631-638.
- Christensen, J. H., and Platz, J. (2001). Screening of polybrominated diphenyl ethers in blue mussels, marine and freshwater sediments in Denmark. *J Environ Monit* **3**, 543-547.
- Clariant (2006). Anwendung von Flammschutzmitteln. Clariant Verwaltungsgesellschaft mbH, Frankfurt. www.flammschutz-online.de
- Code, E. L., Crespi, C. L., Penman, B. W., Gonzalez, F. J., Chang, T. K., and Waxman, D. J. (1997). Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos* 25, 985-993.
- Covaci, A., de, B. J., Ryan, J. J., Voorspoels, S., and Schepens, P. (2002a). Determination of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue by large-volume injection-narrow-bore capillary gas chromatography/electron impact low-resolution mass spectrometry. *Anal Chem* **74**, 790-798.
- Covaci, A., de Boer, J., Ryan, J. J., Voorspoels, S., and Schepens, P. (2002b). Distribution of organobrominated and organochlorinated contaminants in Belgian human adipose tissue. *Environ Res* **88**, 210-218.
- Covaci, A., Gerecke, A. C., Law, R. J., Voorspoels, S., Kohler, M., Heeb, N. V., Leslie, H., Allchin, C. R., and De Boer, J. (2006). Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: a review. *Environ Sci Technol* **40**, 3679-3688.
- Covaci, A., Gheorghe, A., Steen Redekker, E., and Schepens, P. (2002c). Distribution of organochlorine and organobromine pollutants in two sediment cores from the Scheldt estuary (Belgium). *Organohalogen Compound* **57**, 329–332.
- Curran, P. G., and DeGroot, L. J. (1991). The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocr Rev* **12**, 135-150.
- CYP-Allele-Homepage. http://www.cypalleles.ki.se/ (15-Feb-2007)
- CYP-Homepage. http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html (15-Feb-2007)
- Darnerud, P. O. (2003). Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ Int* **29**, 841-853.
- Darnerud, P. O., Eriksen, G. S., Johannesson, T., Larsen, P. B., and Viluksela, M. (2001). Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 1**, 49-68.
- de Wit, C. A. (2001). Levels and Trends of BFRs in the European Environment. The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants. BFR 2001.

- de Wit, C. A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* **46**, 583-624.
- de Wit, C. A., Alaee, M., and Muir, D. C. (2006). Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic. *Chemosphere* **64**, 209-233.
- Denison, M. S., and Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 309-334.
- Dodder, N. G., Strandberg, B., and Hites, R. A. (2000). Concentrations and Spatial Variations of Polybrominated Diphenyl Ethers in Fish and Air from the Northeastern United States. *Organohalogen Compounds* **47**, 69-72.
- Dodder, N. G., Strandberg, B., and Hites, R. A. (2002). Concentrations and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers and several organochlorine compounds in fishes from the northeastern United States. *Environ Sci Technol* **36**, 146-151.
- Dufault, C., Poles, G., and Driscoll, L. L. (2005). Brief postnatal PBDE exposure alters learning and the cholinergic modulation of attention in rats. *Toxicol Sci* **88**, 172-180.
- ECETOC (2002). Recognition of, and Differentiation between, Adverse and Non-adverse Effects in Toxicology Studies. Technical Report No. 85. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brüssel. http://www.ecetoc.org
- Eljarrat, E., de la Cal, A., Raldua, D., Duran, C., and Barcelo, D. (2004). Occurrence and bioavailability of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from the Cinca River, a tributary of the Ebro River (Spain). *Environ Sci Technol* **38**, 2603-2608.
- Eljarrat, E., de la Cal, A., Raldua, D., Duran, C., and Barcelo, D. (2005). Brominated flame retardants in Alburnus alburnus from Cinca River Basin (Spain). *Environ Pollut* **133**, 501-508.
- EPA (2006). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs). Project Plan. http://www.epa.gov/oppt/pbde/pubs/proj-plan32906a.pdf (15-Feb-2007)
- Eriksson, P., Fischer, C., and Fredriksson, A. (2006a). Polybrominated Diphenyl Ethers, A Group of Brominated Flame Retardants, Can Interact with Polychlorinated Biphenyls in Enhancing Developmental Neurobehavioral Defects. *Toxicol. Sci.* **94**, 302-309.
- Eriksson, P., Johansson, N., and Fredriksson, A. (2006b). Highly brominated diphenyl ethers (PBDE 209) can interact with perfluorinated chemicals (PFOA) during neonatal brain development in enhancing developmental neurobehavioural defects. *Organohalogen Compounds*.
- Eriksson, P., Viberg, H., Jakobsson, E., Orn, U., and Fredriksson, A. (2002). A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether: uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. *Toxicol Sci* **67**, 98-103.
- EU-RAR (2002). European Union Risk Assessment Report. BIS(PENTABROMOPHENYL) ETHER. Final Report. http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK\_ASSESSMENT/REPORT/decabromodiphenyletherreport013.pdf

- Fernie, K. J., Shutt, J. L., Mayne, G., Hoffman, D., Letcher, R. J., Drouillard, K. G., and Ritchie, I. J. (2005). Exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): changes in thyroid, vitamin A, glutathione homeostasis, and oxidative stress in American kestrels (Falco sparverius). *Toxicol Sci* 88, 375-383.
- Fischer, C., Fredriksson, A., and Eriksson, P. (2006). PCBs (PCB 153 and PCB 126) and PBDE (PBDE 99) can interact with methylmercury in enhancing developmental neurotoxic effects. *Organohalogen Compounds*.
- Fukuda, N., Ito, Y., Yamaguchi, M., Mitumori, K., Koizumi, M., Hasegawa, R., Kamata, E., and Ema, M. (2004). Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. *Toxicol Lett* **150**, 145-155.
- Gandhi, N., Bhavsar, S. P., Gewurtz, S. B., Diamond, M. L., Evenset, A., Christensen, G. N., and Gregor, D. (2006). Development of a multichemical food web model: application to PBDEs in Lake Ellasjoen, Bear Island, Norway. *Environ Sci Technol* **40**, 4714-4721.
- Gearhart, J., and Posselt, H. (2006). PolybrominatedDiphenylEthers in Dust and Window Films of Passenger Vehicles. International Workshop of Brominated Flame Retardants.
- Gibson, G. G., Plant, N. J., Swales, K. E., Ayrton, A., and El-Sankary, W. (2002). Receptordependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica* **32**, 165-206.
- Gonzalez, F. J., and Kimura, S. (2003). Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice. *Arch Biochem Biophys* **409**, 153-158.
- Guengerich, F. P. (1999). Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**, 1-17.

Guengerich, F. P. (2007). Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. Chem Res Toxicol.

- Haglund, P. S., Zook, D. R., Buser, H. R., and Hu, J. (1997). Identification and Quantification of Polybrominated Diphenyl Ethers and Methoxy-Polybrominated Diphenyl Ethers in Baltic Biota. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 3281-3287.
- Hagmar, L., and Bergman, A. (2001). Human exposure to BFRs in Europe. The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants. BFR 2001.
- Hakk, H., and Letcher, R. J. (2003). Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants--a review. *Environ Int* **29**, 801-828.
- Hallgren, S., and Darnerud, P. O. (2002). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats-testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology* **177**, 227-243.
- Hallgren, S., Sinjari, T., Hakansson, H., and Darnerud, P. O. (2001). Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Arch Toxicol* **75**, 200-208.
- Hamers, T., Kamstra, J. H., Sonneveld, E., Murk, A. J., Kester, M. H., Andersson, P. L., Legler, J., and Brouwer, A. (2006). *In vitro* profiling of the endocrine-disrupting

potency of brominated flame retardants. Toxicol Sci 92, 157-173.

- Handschin, C., and Meyer, U. A. (2005). Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR. *Arch Biochem Biophys* **433**, 387-396.
- Harden, F. A., Toms, L.-M. L., Moore, M., Symons, R., Ahokas, J., Burniston, D. A., Furst, P., and Mueller, J. (2005). Polybrominated diphenyl ethers in human milk from Australia. *Organohalogen Compounds* **67**, 662-666.
- Hartonen, K., Bowadt, S., Hawthorne, S. B., and Riekkola, M.-L. (1997). Supercritical fluid extraction with solid-phase trapping of chlorinated and brominated pollutants from sediment samples. *Journal of Chromatography A* **774**, 229.
- Hauser, R., Altshul, L., Chen, Z., Ryan, L., Overstreet, J., Schiff, I., and Christiani, D. C. (2002). Environmental organochlorines and semen quality: results of a pilot study. *Environ Health Perspect* **110**, 229-233.
- Helleday, T., Tuominen, K. L., Bergman, A., and Jenssen, D. (1999). Brominated flame retardants induce intragenic recombination in mammalian cells. *Mutat Res* 439, 137-147.
- Herzke, D., Gabrielsen, G. W., Evenset, A., and Burkow, I. C. (2003). Polychlorinated camphenes (toxaphenes), polybrominated diphenylethers and other halogenated organic pollutants in glaucous gull (Larus hyperboreus) from Svalbard and Bjornoya (Bear Island). *Environ Pollut* **121**, 293-300.
- Hites, R. A., Foran, J. A., Schwager, S. J., Knuth, B. A., Hamilton, M. C., and Carpenter, D. O. (2004). Global assessment of polybrominated diphenyl ethers in farmed and wild salmon. *Environ Sci Technol* **38**, 4945-4949.
- Hoh, E., and Hites, R. A. (2005). Brominated flame retardants in the atmosphere of the East-Central United States. *Environ Sci Technol* **39**, 7794-7802.
- Hukkanen, J. (2000). Xenobiotic-Metabolizing Cyrochrome P450 Enzymes in Human Lung. In *Department of Pharmacology and Toxicology*. University of Oulu, Oulu, Finland.
- Huwe, J. K., and Larsen, G. L. (2005). Polychlorinated dioxins, furans, and biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in a U.S. meat market basket and estimates of dietary intake. *Environ Sci Technol* **39**, 5606-5611.
- Huwe, J. K., Lorentzsen, M., Thuresson, K., and Bergman, A. (2002). Analysis of mono- to deca-brominated diphenyl ethers in chickens at the part per billion level. *Chemosphere* **46**, 635-640.
- Ikonomou, M. G., Fisher, M., He, T., Addison, R. F., and Smith, T. (2000). Congener patterns, spatial and temporal trends of polybrominated diphenyl ethers in biota samples from the Canadian west coast and the Northwest Territories. *Organohalogen Compound* 47, 77-80.
- Ikonomou, M. G., Rayne, S., and Addison, R. F. (2002). Exponential increases of the brominated flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000. *Environ Sci Technol* **36**, 1886-1892.

Ioannides, C. (2002). Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. J. Wiley,

Chichester.

- IUCLID-Albemarle (2005). IUCLID Data Set. http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/cyclodod/c13459rr.pdf (15 Feb 2007)
- Jacobs, M. N., Covaci, A., and Schepens, P. (2002). Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (Salmo salar), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed. *Environ Sci Technol* **36**, 2797-2805.
- Jakobsson, K., Thuresson, K., Rylander, L., Sjodin, A., Hagmar, L., and Bergman, A. (2002). Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians. *Chemosphere* **46**, 709-716.
- Johnson, A., and Olson, N. (2001). Analysis and occurrence of polybrominated diphenyl ethers in Washington state freshwater fish. *Arch Environ Contam Toxicol* **41**, 339-344.
- Kakizaki, S., Yamamoto, Y., Ueda, A., Moore, R., Sueyoshi, T., and Negishi, M. (2003). Phenobarbital induction of drug/steroid-metabolizing enzymes and nuclear receptor CAR. *Biochim Biophys Acta* **1619**, 239-242.
- Kennedy, S. W., Jones, S. P., and Bastien, L. J. (1995). Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader. *Anal Biochem* 226, 362-370.
- Kester, M. H., Bulduk, S., van Toor, H., Tibboel, D., Meinl, W., et al. (2002). Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters. J Clin Endocrinol Metab 87, 1142-1150.
- Kitamura, S., Kato, T., Iida, M., Jinno, N., Suzuki, T., et al. (2005a). Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci* **76**, 1589-1601.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., et al. (2005b). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol Sci* **84**, 249-259.
- Klamer, H. J., Leonards, P. E., Lamoree, M. H., Villerius, L. A., Kerman, J. E., and Bakker, J. F. (2005). A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments. *Chemosphere* 58, 1579-1587.
- Kliewer, S. A., Goodwin, B., and Willson, T. M. (2002). The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23, 687-702.
- Kodavanti, P. R., and Derr-Yellin, E. C. (2002). Differential effects of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls on [3H]arachidonic acid release in rat cerebellar granule neurons. *Toxicol Sci* **68**, 451-457.
- Kodavanti, P. R., and Ward, T. R. (2005). Differential effects of commercial polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl mixtures on intracellular signaling in rat brain *in vitro*. *Toxicol Sci* 85, 952-962.

Kuriyama, S. N., Talsness, C. E., Grote, K., and Chahoud, I. (2005). Developmental

exposure to low dose PBDE 99: effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environ Health Perspect* **113**, 149-154.

- La Guardia, A. M. J., Hale, R. C., and Harvey, E. (2006). Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environ Sci Technol* **40**, 6247-6254.
- Larsen, G. L., Hakk, H., Klasson-Wehler, E., Örn, U., and Bergman, A. (1998). Metabolism and disposition of the flame retardant tetrabromobisphenol A in conventional rats and rats with cannulated bile ducts. *Organohalogen Compounds* **37**, 413–416.
- Law, R. J., Alaee, M., Allchin, C. R., Boon, J. P., Lebeuf, M., Lepom, P., and Stern, G. A. (2003). Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. *Environ Int* 29, 757-770.
- Law, R. J., Allchin, C. R., Bennett, M. E., Morris, S., and Rogan, E. (2002). Polybrominated diphenyl ethers in two species of marine top predators from England and Wales. *Chemosphere* 46, 673.
- Leisewitz, A., and Kruse, H. (2001). *Erarbeitung von Bewertungsgrundlagen zur Substitution umweltrelevanter Flammschutzmittel. Band I.*
- Leonards, P. E. G., Santillo, D., Bridgen, K., van der Ven, I., van Hesselingen, J., De Boer, J., and Johnston, P. (2001a). Brominated flame retardants in office dust samples. The Second International Workshop of Brominated Flame Retardants.
- Leonards, P. E. G., Santillo, D., Brigden, K., Veen, I. v. d., Hesselingen, J. v., Boer, J. d., and Johnston, P. (2001b). Brominated flame retardants in office dust samples. The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants. BFR 2001.
- Lilienthal, H., Hack, A., Roth-Harer, A., Grande, S. W., and Talsness, C. E. (2006). Effects of developmental exposure to 2,2,4,4,5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environ Health Perspect* **114**, 194-201.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Luckey, F., Fowler, B., and Litten, S. (2001). Establishing baseline levels of polybrominated diphenyl ethers in Lake Ontario surface waters. The Second International Workshop of Brominated Flame Retardants, pp. 337-340.
- Lundstedt-Enkel, K., Johansson, A. K., Tysklind, M., Asplund, L., Nylund, K., Olsson, M., and Orberg, J. (2005). Multivariate data analyses of chlorinated and brominated contaminants and biological characteristics in adult guillemot (Uria aalge) from the Baltic Sea. *Environ Sci Technol* **39**, 8630-8637.
- Luross, J. M., Alaee, M., Sergeant, D. B., Whittle, D. M., and Solomon, K. R. (2000a). Spatial and temporal distribution of polybrominated diphenyl ethers in lake trout from the Great Lakes. *Organohalogen Compound* **47**, 73–76.
- Luross, J. M., Alaee, M., Sergeant, D. B., Whittle, D. W., and Solomon, K. R. (2000b). Organohalogen Compounds **47**, 73–76.

- Madia, F., Giordano, G., Fattori, V., Vitalone, A., Branchi, I., Capone, F., and Costa, L. G. (2004). Differential *in vitro* neurotoxicity of the flame retardant PBDE-99 and of the PCB Aroclor 1254 in human astrocytoma cells. *Toxicol Lett* **154**, 11-21.
- Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J. T., and Kliewer, S. A. (2002). Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 62, 638-646.
- Makinen, J., Frank, C., Jyrkkarinne, J., Gynther, J., Carlberg, C., and Honkakoski, P. (2002). Modulation of mouse and human phenobarbital-responsive enhancer module by nuclear receptors. *Mol Pharmacol* **62**, 366-378.
- Manchester-Neesvig, J. B., Valters, K., and Sonzogni, W. C. (2001). Comparison of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in Lake Michigan salmonids. *Environ Sci Technol* **35**, 1072-1077.
- Marc, N., Galisteo, M., Lagadic-Gossmann, D., Fautrel, A., Joannard, F., Guillouzo, A., and Corcos, L. (2000). Regulation of phenobarbital induction of the cytochrome P450 2b9/10 genes in primary mouse hepatocyte culture. Involvement of calcium- and cAMP-dependent pathways. *Eur J Biochem* **267**, 963-970.
- Mariussen, E., and Fonnum, F. (2003). The effect of brominated flame retardants on neurotransmitter uptake into rat brain synaptosomes and vesicles. *Neurochemistry International* **43**, 533-542.
- Marquardt, H., and Schäfer, S. G. (2004). *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsges.
- Marsh, G., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Bergman, A., Endo, T., and Haraguchi, K. (2005). Identification, quantification, and synthesis of a novel dimethoxylated polybrominated biphenyl in marine mammals caught off the coast of Japan. *Environ Sci Technol* **39**, 8684-8690.
- Martignoni, M., de Kanter, R., Grossi, P., Mahnke, A., Saturno, G., and Monshouwer, M. (2004). An *in vivo* and *in vitro* comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact* **151**, 1-11.
- Mazdai, A., Dodder, N. G., Abernathy, M. P., Hites, R. A., and Bigsby, R. M. (2003). Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environ Health Perspect* **111**, 1249-1252.
- Meerts, I. A., Letcher, R. J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, A., Lemmen, J. G., van der Burg, B., and Brouwer, A. (2001). *In vitro* estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect* **109**, 399-407.
- Meerts, I. A. T. M., Assink, Y., Cenijn, P. H., Weijers, B. M., van den Berg, J. H. J., Bergman, Å., Koeman, J. H., and Brouwer, A. (1999). Distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol A in pregnant and fetal rats and effect on thyroid hormone homeostasis. Organohalogen Compounds 40, 375–378.
- Meerts, I. A. T. M., van Zanden, J. J., Luijks, E. A. C., van Leeuwen-Bol, I., Marsh, G., Jakobsson, E., Bergman, A., and Brouwer, A. (2000). Potent Competitive Interactions

of Some Brominated Flame Retardants and Related Compounds with Human Transthyretin *in vitro*. *Toxicol*. *Sci*. **56**, 95-104.

- Meironyte, D., Bergmann, A., and Noren, K. (1998). Analysis of polybrominated diphenyl ethers in human milk. *Organohalogen Compounds* **35**, 387-390.
- Meironyte, D., Noren, K., and Bergman, A. (1999). Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997. *J Toxicol Environ Health A* **58**, 329-341.
- Meironyte Guvenius, D., Bergman, A., and Noren, K. (2001). Polybrominated diphenyl ethers in Swedish human liver and adipose tissue. *Arch Environ Contam Toxicol* **40**, 564-570.
- Melancon, M. J. (1996). Development of cytochromes P450 in avian species as a biomarker for
- environmental contaminant exposure and effect. Procedures and baseline values. *American Society for Testing and Materials.* **5**, 95-108.
- Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y., and Sugiyama, Y. (2003). Impact of Drug Transporter Studies on Drug Discovery and Development. *Pharmacol Rev*, pr.55.53.51.
- Moisey, J., Simon, M., Wakeford, B., Weseloh, D. V., and Norstrom, R. J. (2001). Spatial and temporal trends of polybrominated diphenyl ethers detected in Great Lakes herring gulls, 1981-2000. International workshop of brominated flame retardants.
- Morris, S., Allchin, C. R., Zegers, B. N., Haftka, J. J., Boon, J. P., Belpaire, C., Leonards, P. E., Van Leeuwen, S. P., and De Boer, J. (2004). Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs. *Environ Sci Technol* **38**, 5497-5504.
- Nagayama, J., Takasuga, T., and Tsuji, H. (2001). Contamination Levels of Brominated Flame Retardants, Dioxins and Organochlorine Compounds in the Blood of Japanese Adults. The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants. BFR 2001.
- Nebert, D. W., McKinnon, R. A., and Puga, A. (1996). Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* **15**, 273-280.
- Nebert, D. W., and Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**, 1155-1162.
- NRC (2000). Toxicological risks of selected flame-retardant chemicals. Subcommittee on Flame-retardant Chemicals. National Academic Press, Washington, DC.
- Nyland, K., Kierkegaard, A., Eriksson, U., Asplund, L., Bigert, A., and Olsson, M. (2001). Spatial distribution of some polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in herring along the Swedish coast. The Second International Workshop of Brominated Flame Retardants, pp. 349-352.
- Nylund, K., Asplund, L., Jansson, B., Jonsson, P., Litzen, K., and Sellstrom, U. (1992). Analysis of some polyhalogenated organic pollutants in sediment and sewage sludge. *Chemosphere* **24**, 1721.

- Ohta, S., Ishizuka, D., Nishimura, H., Nakao, T., Aozasa, O., et al. (2002). Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meats and levels in human milk of nursing women in Japan. *Chemosphere* **46**, 689-696.
- Olsman, H., Hagberg, J., Kalbin, G., Julander, A., van Bavel, B., Strid, A., Tysklind, M., and Engwall, M. (2006). Ah receptor agonists in UV-exposed toluene solutions of decabromodiphenyl ether (decaBDE) and in soils contaminated with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Environ Sci Pollut Res Int* **13**, 161-169.
- Paepke, O., Lohmann, N., Fuerst, P., Schecter, A., and Ryan, J. J. (2006). Analysis of PBDEs in Human Samples Originating from Four Continents:Values, Patterns and Trends. International BFR Meeting.
- Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Drocourt, L., Maurel, P., and Vilarem, M. J. (2003). The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta* **1619**, 243-253.
- Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M. J., and Maurel, P. (2007). The Tangle of Nuclear Receptors that Controls Xenobiotic Metabolism and Transport: Crosstalk and Consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
- Peters, A. K. (2006). Polybrominated Diphenyl Ethers. Aspects of the mechanism of action. In *Institute for Risk Assesment Sciences (IRAS), Faculty of Veterinary Medecine.* University of Utrecht, Utrecht.
- Petreas, M., She, J., Brown, F. R., Winkler, J., Windham, G., Rogers, E., Zhao, G., Bhatia, R., and Charles, M. J. (2003). High body burdens of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in California women. *Environ Health Perspect* **111**, 1175-1179.
- Pettersson, A., and Karlsson, M. (2001a). Analysis and toxicology of brominated flame retardants with emphasis on PBDEs (polybrominated diphenylethers). In *MTM rapport*, pp. 63. Man-Technology-Environment Research Centre, Örebro University.
- Pettersson, A., and Karlsson, M. (2001b). Analysis and toxicology of brominated flame retardants with emphasis on PBDEs (polybrominated diphenylethers). *MTM rapport* **01-8-PP**.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Pullen, S., Boecker, R., and Tiegs, G. (2003). The flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol A-bisallylether suppress the induction of interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) in murine splenocytes. *Toxicology* **184**, 11-22.
- Raab, U., Schwegler, U., Preiss, U., Albrecht, M., and Fromme, H. (2007). Bavarian breast milk survey Pilot study and future developments. *Int J Hyg Environ Health*.
- Rachidi, I. A. (2002). Untersuchung der Expression und Induzierbarkeit der Cytochrom P450 –Isoformen 2E1, 1A1 und 2B in der Rattenlunge. In *Medizinischen Fakultät*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Ramu, K., Kajiwara, N., Sudaryanto, A., Isobe, T., Takahashi, S., et al. (2007). Asian Mussel Watch Program: Contamination Status of Polybrominated Diphenyl Ethers and

Organochlorines in Coastal Waters of Asian Countries. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 4580-4586.

- Reistad, T., Fonnum, F., and Mariussen, E. (2006). Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cells *in vitro*. *Arch Toxicol* **80**, 785-796.
- Rice, D., and James, J. (2007). Brominated Flame Retardants. Third annual report to the Maine Legislature. Maine Department of Environmental Protection. Maine Center for Disease Control & Prevention, Augusta. http://maine.gov/dep/rwm/publications/legislativereports/pdf/finalrptjan07.pdf
- Richter, T. (2005). Untersuchungen zur inter- und intraindividuellen Variabilität der enzymatischen Funktion von Cytochrom P450 CYP2B6. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Rifkind, A. B. (2006). CYP1A in TCDD toxicity and in physiology-with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates. *Drug Metab Rev* **38**, 291-335.
- Robertson, G. R., Farrell, G. C., and Liddle, C. (1998). Sexually dimorphic expression of rat CYP3A9 and CYP3A18 genes is regulated by growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun* **242**, 57-60.
- Ronisz, D., Finne, E. F., Karlsson, H., and Forlin, L. (2004). Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout. *Aquat Toxicol* 69, 229-245.
- Roos, A., Nylund, K., Häggberg, L., Asplund, L., Bergman, A., and Olsson, M. (2001). Brominated Flame Retardants (BFR) in young Grey Seal Males fro the Baltic Sea. The Second International Workshop of Brominated Flame Retardants, pp. 365-370.
- Rowlands, J. C., and Gustafsson, J. A. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* **27**, 109-134.
- Ryan, J., Patry, B., Mills, P., and Beaudoin, N. (2002). Recent trends in levels of brominated diphenyl ethers (BDEs) in human milks from Canada. *Organohalogen Compounds* 58, 173–176.
- Ryan, J. J., and Patry, B. (2001). Body burdens and food exposure in Canada for polybrominated diphenyl ethers (BDEs). *Organohalogen Compound* **51**, 226-229.
- Safe, S. (2001). Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett* **120**, 1-7.
- Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R., and McDougal, A. (1998). Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett* **102-103**, 343-347.
- Samuelsen, M., Olsen, C., Holme, J. A., Meussen-Elholm, E., Bergmann, A., and Hongslo, J. K. (2001). Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell Biol Toxicol* **17**, 139-151.

- Schauer, U. M., Volkel, W., and Dekant, W. (2006). Toxicokinetics of tetrabromobisphenol a in humans and rats after oral administration. *Toxicol Sci* **91**, 49-58.
- Schecter, A., Papke, O., Harris, T. R., Tung, K. C., Musumba, A., Olson, J., and Birnbaum, L. (2006). Polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in an expanded market basket survey of U.S. food and estimated PBDE dietary intake by age and sex. *Environ Health Perspect* **114**, 1515-1520.
- Schecter, A., Päpke, O., Tung, K. C., Joseph, J., Harris, T., and Dahlgren, J. (2005). Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the U.S. population: current levels, temporal trends, and comparison with dioxins, dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls. J Occup Environ Med **47**, 199-211.
- Schecter, A., Papke, O., Tung, K. C., Staskal, D., and Birnbaum, L. (2004). Polybrominated Diphenyl Ethers Contamination of United States Food. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5306-5311.
- Schecter, A., Pavuk, M., Papke, O., Ryan, J. J., Birnbaum, L., and Rosen, R. (2003). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers' milk. *Environ Health Perspect* **111**, 1723-1729.
- Schröter-Kermani, C. (2002). Endocrine Disrupters in Human and Environmental Samples from the German Environmental Specimen Bank. Umweltbundesamt.
- Schröter-Kermani, C., Helm, D., Herrmann, T., and Päpke, O. (2000). Organohalogen Compound **47**, 49–52.
- Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13, 29-83.
- Sellstrom, U., Bignert, A., Kierkegaard, A., Haggberg, L., de Wit, C. A., Olsson, M., and Jansson, B. (2003). Temporal trend studies on tetra- and pentabrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in guillemot egg from the Baltic Sea. *Environ Sci Technol* **37**, 5496-5501.
- Sellstrom, U., and Jansson, B. (1995). Analysis of tetrabromobisphenol A in a product and environmental samples. *Chemosphere* **31**, 3085.
- Sellstrom, U., Kierkegaard, A., de Wit, C., and Jansson, B. (1998). POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS AND HEXABROMOCYCLODODECANE IN SEDIMENT AND FISH FROM A SWEDISH RIVER. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 1065-1072.
- She, J., Petreas, M., Winkler, J., Visita, P., McKinney, M., and Kopec, D. (2002). PBDEs in the San Francisco Bay Area: measurements in harbor seal blubber and human breast adipose tissue. *Chemosphere* 46, 697-707.
- She, J., Winkler, J., Visita, P., McKinney, M., and Petreas, M. (2000). Organohalogen Compound **47**, 53–56.
- Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P., and Sutter, T. R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56, 2979-2984.

Sjodin, A. (2006). Current Concentrations and Changes in Concentrations of PBDEs,

Persistent Pesticides, and PCBs in Human Milk. International BFR Meeting.

- Sjodin, A., Carlsson, H., Thuresson, K., Sjolin, S., Bergman, A., and Ostman, C. (2001a). Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments. *Environ Sci Technol* **35**, 448-454.
- Sjodin, A., Hagmar, L., Klasson-Wehler, E., Kronholm-Diab, K., Jakobsson, E., and Bergman, A. (1999). Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. *Environ Health Perspect* **107**, 643-648.
- Sjodin, A., Jakobsson, E., Kierkegaard, A., Marsh, G., and Sellström, U. (1998). Gas chromatographic identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers in a commercial product, Bromkal 70-5DE. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A* 822.
- Sjodin, A., Patterson, D. G., and Bergman, A. (2003). A review on human exposure to brominated flame retardants-particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environ Int* **29**, 829-839.
- Sjodin, A., Patterson, D. G., Jr., and Bergman, A. (2001b). Brominated flame retardants in serum from U.S. blood donors. *Environ Sci Technol* **35**, 3830-3833.
- Stapleton, H. M., and Baker, J. E. (2003). Comparing polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl bioaccumulation in a food web in Grand Traverse Bay, Lake Michigan. Arch Environ Contam Toxicol 45, 227-234.
- Stapleton, H. M., Dodder, N. G., Kucklick, J. R., Reddy, C. M., Schantz, M. M., Becker, P. R., Gulland, F., Porter, B. J., and Wise, S. A. (2006). Determination of HBCD, PBDEs and MeO-BDEs in California sea lions (Zalophus californianus) stranded between 1993 and 2003. *Mar Pollut Bull* **52**, 522-531.
- Staskal, D. F., Diliberto, J. J., Devito, M. J., and Birnbaum, L. S. (2005). Toxicokinetics of BDE 47 in Female Mice: Effect of Dose, Route of Exposure, and Time. *Toxicol Sci* 83, 215-223.
- Stoker, T. E., Laws, S. C., Crofton, K. M., Hedge, J. M., Ferrell, J. M., and Cooper, R. L. (2004). Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicol Sci* 78, 144-155.
- Strandberg, B., Dodder, N. G., Basu, I., and Hites, R. A. (2001). Concentrations and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers and other organohalogen compounds in Great Lakes air. *Environ Sci Technol* **35**, 1078-1083.
- Strandman, T., Koistinen, J., and Vartiainen, T. (2000). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in

placenta and human milk. Organohalogen Compound 47, 61-64.

- Sueyoshi, T., and Negishi, M. (2001). Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 123-143.
- Szklarz, G. D., and Halpert, J. R. (1998). Molecular basis of P450 inhibition and activation: implications for drug development and drug therapy. *Drug Metab Dispos* 26, 1179-1184.

Szymanska, J. A., Sapota, A., and Frydrych, B. (2001). The disposition and metabolism of

tetrabromobisphenol-A after a single i.p. dose in the rat. Chemosphere 45, 693-700.

- Talsness, C. E., Kuriyama, S. N., Wichert Grande, S., Andrade, A., Sterner-Kock, A., Schnitker, P., Grote, K., and Chahoud, I. (2006). Low dose effects on the rat female reproductive system following exposure to a single administration of PBDE-47. Organohalogen Compounds 47.
- Talsness, C. E., Shakibaei, M., Kuriyama, S. N., Grande, S. W., Sterner-Kock, A., Schnitker, P., de Souza, C., Grote, K., and Chahoud, I. (2005). Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicol Lett* **157**, 189-202.
- Tanabe, S. (2005). Dioxins and Organohalogen Contaminants in the Far East. Organohalogen Compounds **67**.
- Thomsen, C., Leknes, H., Lundanes, E., and Becher, G. (2001a). Brominated flame retardants in laboratory air. *J Chromatogr A* **923**, 299-304.
- Thomsen, C., Leknes, H., Lundanes, E., and Becher, G. (2002a). A new method for determination of halogenated flame retardants in human milk using solid-phase extraction. *J Anal Toxicol* **26**, 129-137.
- Thomsen, C., Liane, V. H., and Becher, G. (2007). Automated solid-phase extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in serum--application on archived Norwegian samples from 1977 to 2003. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **846**, 252-263.
- Thomsen, C., Lundanes, E., and Becher, G. (2001b). Plasma concentrations of brominated flame retardants in three Norwegian occupational groups. The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants. BFR 2001.
- Thomsen, C., Lundanes, E., and Becher, G. (2002b). Brominated flame retardants in archived serum samples from Norway: a study on temporal trends and the role of age. *Environ Sci Technol* **36**, 1414-1418.
- Thuresson, K., Bergman, A., and Jakobsson, K. (2005). Occupational exposure to commercial decabromodiphenyl ether in workers manufacturing or handling flameretarded rubber. *Environ Sci Technol* **39**, 1980-1986.
- Tomy, G. T., Budakowski, W., Halldorson, T., Whittle, D. M., Keir, M. J., Marvin, C., MacInnis, G., and Alaee, M. (2004). Biomagnification of alpha- and gammahexabromocyclododecane isomers in a Lake Ontario food web. *Environ Sci Technol* 38, 2298-2303.
- Tzameli, I., Chua, S. S., Cheskis, B., and Moore, D. D. (2003). Complex effects of rexinoids on ligand dependent activation or inhibition of the xenobiotic receptor, CAR. *Nucl Recept* **1**, 2.
- Ueda, A., Hamadeh, H. K., Webb, H. K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C. A., Lehmann, J. M., and Negishi, M. (2002). Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol Pharmacol* **61**, 1-6.
- van der Ven, L. T., van de Kuil, T., Leonards, P. E., Wout, S., Cantón, R. F., et al. (2008). A 28-day oral dose toxicity study in Wistar rats enhanced to detect endocrine effects of

decabromodiphenylether (dBDE).

- van der Ven, L. T., Verhoef, A., van de Kuil, T., Slob, W., Leonards, P. E., et al. (2006). A 28day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. *Toxicol Sci* **94**, 281-292.
- Verreault, J., Gabrielsen, G. W., Chu, S., Muir, D. C., Andersen, M., Hamaed, A., and Letcher, R. J. (2005). Flame retardants and methoxylated and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in two Norwegian Arctic top predators: glaucous gulls and polar bears. *Environ Sci Technol* **39**, 6021-6028.
- Viberg, H., Fredriksson, A., and Eriksson, P. (2002). Neonatal exposure to the brominated flame retardant 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether causes altered susceptibility in the cholinergic transmitter system in the adult mouse. *Toxicol Sci* **67**, 104-107.
- Viberg, H., Fredriksson, A., and Eriksson, P. (2003). Neonatal exposure to polybrominated diphenyl ether (PBDE 153) disrupts spontaneous behaviour, impairs learning and memory, and decreases hippocampal cholinergic receptors in adult mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**, 95-106.
- Viberg, H., Fredriksson, A., and Eriksson, P. (2004). Investigations of strain and/or gender differences in developmental neurotoxic effects of polybrominated diphenyl ethers in mice. *Toxicol Sci* 81, 344-353.
- Viberg, H., Fredriksson, A., and Eriksson, P. (2007). Changes in spontaneous behaviour and altered response to nicotine in the adult rat, after neonatal exposure to the brominated flame retardant, decabrominated diphenyl ether (PBDE 209). *NeuroToxicology* **28**, 136.
- von Meyerinck, L., Hufnagel, B., Schmoldt, A., and Benthe, H. F. (1990). Induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 by the pentabromo diphenyl ether Bromkal 70 and half-lives of its components in the adipose tissue. *Toxicology* **61**, 259-274.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Maervoet, J., and Schepens, P. (2004). PBDEs in marine and freshwater sediments from Belgium: levels, profiles and relations with biota. *J Environ Monit* **6**, 914-918.
- Voorspoels, S., De Mey, T., Covaci, A., and Schepens, P. (2002). Levels of selected polybrominated diphenyl ethers in benthic organisms from the Belgian Continental Shelf and the Scheldt estuary. *Organohalogen Compound* **55**, 417–421.
- Vorkamp, K., Thomsen, M., Falk, K., Leslie, H., Moller, S., and Sorensen, P. B. (2005). Temporal development of brominated flame retardants in peregrine Falcon (Falco peregrinus) eggs from South Greenland (1986-2003). *Environ Sci Technol* **39**, 8199-8206.
- Wang, Y., Liu, H., Zhao, C., Liu, H., Cai, Z., and Jiang, G. (2005). Quantitative structureactivity relationship models for prediction of the toxicity of polybrominated diphenyl ether congeners. *Environ Sci Technol* **39**, 4961-4966.
- Weyland, S. (2005). Induktion von Cytochrome-P450-3A durch polybromierte Flammschutzmittel. In *Fachbereich Chemie*. Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.

- Whitlock, J. P., Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 103-125.
- WHO (1994). BROMINATED DIPHENYL ETHERS. In *Environmental Health Criteria 16*2. (G. World Health Organization, Ed.).
- WHO (1995). Tetrabisphenol A and Derivatives. In *Environmental Health Criteria* 172. (G. World Health Organization, Ed.).
- Wolbold, R. (2004). Untersuchungen zur Expression des Cytochrom P450 3A4 und zur Expression und transkriptionellen Regulation des Pregnan-X-Rezeptors im Menschen. In *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Woods, C. G., Heuvel, J. P., and Rusyn, I. (2007). Genomic profiling in nuclear receptormediated toxicity. *Toxicol Pathol* **35**, 474-494.
- Wu, N., Herrmann, T., Paepke, O., Tickner, J., Hale, R., Harvey, L. E., La Guardia, M., McClean, M. D., and Webster, T. F. (2007). Human exposure to PBDEs: associations of PBDE body burdens with food consumption and house dust concentrations. *Environ Sci Technol* **41**, 1584-1589.
- Wyde, M. E., Wong, V. A., Kim, A. H., Lucier, G. W., and Walker, N. J. (2001). Induction of hepatic 8-oxo-deoxyguanosine adducts by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Sprague-Dawley rats is female-specific and estrogen-dependent. *Chem Res Toxicol* 14, 849-855.
- Xu, C., Li, C. Y., and Kong, A. N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* **28**, 249-268.
- Xu, L., Li, A. P., Kaminski, D. L., and Ruh, M. F. (2000). 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of cytochrome P4501A in cultured rat and human hepatocytes. *Chem Biol Interact* **124**, 173-189.
- Yamada, H., Ishii, Y., Yamamoto, M., and Oguri, K. (2006). Induction of the Hepatic Cytochrome P450 2B Subfamily by Xenobiotics: Research History, Evolutionary Aspect, Relation to Tumorigenesis, and Mechanism. *Current Drug Metabolism* 7, 397.
- Yoshinari, K., Kobayashi, K., Moore, R., Kawamoto, T., and Negishi, M. (2003). Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett* **548**, 17-20.
- Zegers, B. N., Lewis, W. E., Booij, K., Smittenberg, R. H., Boer, W., de Boer, J., and Boon, J. P. (2003). Levels of polybrominated diphenyl ether flame retardants in sediment cores from Western Europe. *Environ Sci Technol* **37**, 3803-3807.
- Zegers, B. N., Mets, A., vanBommel, R., Minkenberg, C., Hamers, T., Kamstra, J. H., Pierce, G. J., and Boon, J. P. (2005). Levels of Hexabromocyclododecane in Harbor Porpoises and Common Dolphins from Western European Seas, with Evidence for Stereoisomer-Specific Biotransformation by Cytochrome P450. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2095-2100.
- Zeiger, M., Haag, R., Hockel, J., Schrenk, D., and Schmitz, H. J. (2001). Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes:

comparison of relative potencies. *Toxicol Sci* 63, 65-73.

- Zhou, T., Ross, D. G., DeVito, M. J., and Crofton, K. M. (2001). Effects of short-term *in vivo* exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicol Sci* **61**, 76-82.
- Zhou, T., Taylor, M. M., DeVito, M. J., and Crofton, K. M. (2002). Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicol Sci* **66**, 105-116.
- Zuurbier, M., Leijs, M., Schoeters, G., ten Tusscher, G., and Koppe, J. G. (2006). Children's exposure to polybrominated diphenyl ethers. *Acta Paediatr Suppl* **95**, 65-70.

# F Anhang

# F.1 PBDE – Nomenklatur

Nr.	IUPAC Name	Nr.	IUPAC Name
1	2-Bromodiphenylether	41	2,2',3,4-Tetrabromodiphenylether
2	3-Bromodiphenylether	42	2,2',3,4'-Tetrabromodiphenylether
3	4-Bromodiphenylether	43	2,2',3,5-Tetrabromodiphenylether
4	2,2'-Dibromodiphenylether	44	2,2',3,5'-Tetrabromodiphenylether
5	2,3-Dibromodiphenylether	45	2,2',3,6-Tetrabromodiphenylether
6	2,3'-Dibromodiphenylether	46	2,2',3,6'-Tetrabromodiphenylether
7	2,4-Dibromodiphenylether	47	2,2',4,4'-Tetrabromodiphenylether
8	2,4'-Dibromodiphenylether	48	2,2',4,5-Tetrabromodiphenylether
9	2,5-Dibromodiphenylether	49	2,2',4,5'-Tetrabromodiphenylether
10	2,6-Dibromodiphenylether	50	2,2',4,6-Tetrabromodiphenylether
11	3,3'-Dibromodiphenylether	51	2,2',4,6'-Tetrabromodiphenylether
12	3,4-Dibromodiphenylether	52	2,2',5,5'-Tetrabromodiphenylether
13	3,4'-Dibromodiphenylether	53	2,2',5,6'-Tetrabromodiphenylether
14	3,5-Dibromodiphenylether	54	2,2',6,6'-Tetrabromodiphenylether
15	4,4'-Dibromodiphenylether	55	2,3,3',4-Tetrabromodiphenylether
16	2,2',3-Tribromodiphenylether	56	2,3,3',4'-Tetrabromodiphenylether
17	2,2',4-Tribromodiphenylether	57	2,3,3',5-Tetrabromodiphenylether
18	2,2',5-Tribromodiphenylether	58	2,3,3',5'-Tetrabromodiphenylether
19	2,2',6-Tribromodiphenylether	59	2,3,3',6-Tetrabromodiphenylether
20	2,3,3'-Tribromodiphenylether	60	2,3,4,4'-Tetrabromodiphenylether
21	2,3,4-Tribromodiphenylether	61	2,3,4,5-Tetrabromodiphenylether
22	2,3,4'-Tribromodiphenylether	62	2,3,4,6-Tetrabromodiphenylether
23	2,3,5-Tribromodiphenylether	63	2,3,4',5-Tetrabromodiphenylether
24	2,3,6-Tribromodiphenylether	64	2,3,4',6-Tetrabromodiphenylether
25	2,3',4-Tribromodiphenylether	65	2,3,5,6-Tetrabromodiphenylether
26	2,3',4'-Tribromodiphenylether	66	2,3',4,4'-Tetrabromodiphenylether
27	2,3',5-Tribromodiphenylether	67	2,3',4,5-Tetrabromodiphenylether
28	2,3',5'-Tribromodiphenylether	68	2,3',4,5'-Tetrabromodiphenylether
29	2,3',6-Tribromodiphenylether	69	2,3',4,6-Tetrabromodiphenylether
30	2,4,4'-Tribromodiphenylether	70	2,3',4',5-Tetrabromodiphenylether
31	2,4,5-Tribromodiphenylether	71	2,3',4',5'-Tetrabromodiphenylether
32	2,4,6-Tribromodiphenylether	72	2,3',4',6-Tetrabromodiphenylether
33	2,4',5-Tribromodiphenylether	73	2,3',5,5'-Tetrabromodiphenylether
34	2,4',6-Tribromodiphenylether	74	2,3',5',6-Tetrabromodiphenylether
35	3,3',4-Tribromodiphenylether	75	2,4,4',5-Tetrabromodiphenylether
36	3,3',5-Tribromodiphenylether	76	2,4,4',6-Tetrabromodiphenylether
37	3,4,4'-Tribromodiphenylether	77	3,3',4,4'-Tetrabromodiphenylether
38	3,4,5-Tribromodiphenylether	78	3,3',4,5-Tetrabromodiphenylether
39	3,4',5-Tribromodiphenylether	79	3,3',4,5'-Tetrabromodiphenylether
40	2,2',3,3'-Tetrabromodiphenylether	80	3,3',5,5'-Tetrabromodiphenylether

Nr.	IUPAC Name	Nr.	IUPAC Name
81	3,4,4',5-Tetrabromodiphenylether	121	2,3',4,4',6-Pentabromodiphenylether
82	2,2',3,3',4-Pentabromodiphenylether	122	2,3',4,5,5'-Pentabromodiphenylether
83	2,2',3,3',5-Pentabromodiphenylether	123	2,3',4,5',6-Pentabromodiphenylether
84	2,2',3,3',6-Pentabromodiphenylether	124	2,3',4',5,5'-Pentabromodiphenylether
85	2,2',3,4,4'-Pentabromodiphenylether	125	2,3',4',5',6-Pentabromodiphenylether
86	2,2',3,4,5-Pentabromodiphenylether	126	3,3',4,4',5-Pentabromodiphenylether
87	2,2',3,4,5'-Pentabromodiphenylether	127	3,3',4,5,5'-Pentabromodiphenylether
88	2,2',3,4,6-Pentabromodiphenylether	128	2,2',3,3',4,4'-Hexabromodiphenylether
89	2,2',3,4,6'-Pentabromodiphenylether	129	2,2',3,3',4,5-Hexabromodiphenylether
90	2,2',3,4',5-Pentabromodiphenylether	130	2,2',3,3',4,5'-Hexabromodiphenylether
91	2,2',3,4',5'-Pentabromodiphenylether	131	2,2',3,3',4,6-Hexabromodiphenylether
92	2,2',3,4',6-Pentabromodiphenylether	132	2,2',3,3',4,6'-Hexabromodiphenylether
93	2,2',3,4',6'-Pentabromodiphenylether	133	2,2',3,3',5,5'-Hexabromodiphenylether
94	2,2',3,5,5'-Pentabromodiphenylether	134	2,2',3,3',5,6-Hexabromodiphenylether
95	2,2',3,5,6-Pentabromodiphenylether	135	2,2',3,3',5,6'-Hexabromodiphenylether
96	2,2',3,5,6'-Pentabromodiphenylether	136	2,2',3,3',6,6'-Hexabromodiphenylether
97	2,2',3,5',6-Pentabromodiphenylether	137	2,2',3,4,4',5-Hexabromodiphenylether
98	2,2',3,6,6'-Pentabromodiphenylether	138	2,2',3,4,4',5'-Hexabromodiphenylether
99	2,2',4,4',5-Pentabromodiphenylether	139	2,2',3,4,4',6-Hexabromodiphenylether
100	2,2',4,4',6-Pentabromodiphenylether	140	2,2',3,4,4',6'-Hexabromodiphenylether
101	2,2',4,5,5'-Pentabromodiphenylether	141	2,2',3,4,5,5'-Hexabromodiphenylether
102	2,2',4,5,6'-Pentabromodiphenylether	142	2,2',3,4,5,6-Hexabromodiphenylether
103	2,2',4,5',6-Pentabromodiphenylether	143	2,2',3,4,5,6'-Hexabromodiphenylether
104	2,2',4,6,6'-Pentabromodiphenylether	144	2,2',3,4,5',6-Hexabromodiphenylether
105	2,3,3',4,4'-Pentabromodiphenylether	145	2,2',3,4,6,6'-Hexabromodiphenylether
106	2,3,3',4,5-Pentabromodiphenylether	146	2,2',3,4',5,5'-Hexabromodiphenylether
107	2,3,3',4,5'-Pentabromodiphenylether	147	2,2',3,4',5,6-Hexabromodiphenylether
108	2,3,3',4,6-Pentabromodiphenylether	148	2,2',3,4',5,6'-Hexabromodiphenylether
109	2,3,3',4',5-Pentabromodiphenylether	149	2,2',3,4',5',6-Hexabromodiphenylether
110	2,3,3',4',5'-Pentabromodiphenylether	150	2,2',3,4',6,6'-Hexabromodiphenylether
111	2,3,3',4',6-Pentabromodiphenylether	151	2,2',3,5,5',6-Hexabromodiphenylether
112	2,3,3',5,5'-Pentabromodiphenylether	152	2,2',3,5,6,6'-Hexabromodiphenylether
113	2,3,3',5,6-Pentabromodiphenylether	153	2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenylether
114	2,3,3',5',6-Pentabromodiphenylether	154	2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphenylether
115	2,3,4,4',5-Pentabromodiphenylether	155	2,2',4,4',6,6'-Hexabromodiphenylether
116	2,3,4,4',6-Pentabromodiphenylether	156	2,3,3',4,4',5-Hexabromodiphenylether
117	2,3,4,5,6-Pentabromodiphenylether	157	2,3,3',4,4',5'-Hexabromodiphenylether
118	2,3,4',5,6-Pentabromodiphenylether	158	2,3,3',4,4',6-Hexabromodiphenylether
119	2,3',4,4',5-Pentabromodiphenylether	159	2,3,3',4,5,5'-Hexabromodiphenylether
120	2,3',4,4',5'-Pentabromodiphenylether	160	2,3,3',4,5,6-Hexabromodiphenylether

Nr.	IUPAC Name		Nr.	IUPAC Name
161	2,3,3',4,5',6-Hexabromodiphenylether	1	86	2,2',3,4,5,6,6'-Heptabromodiphenylether
162	2,3,3',4',5,5'-Hexabromodiphenylether	1	87	2,2',3,4',5,5',6-Heptabromodiphenylether
163	2,3,3',4',5,6-Hexabromodiphenylether	1	88	2,2',3,4',5,6,6'-Heptabromodiphenylether
164	2,3,3',4',5',6-Hexabromodiphenylether	1	89	2,3,3',4,4',5,5'-Heptabromodiphenylether
165	2,3,3',5,5',6-Hexabromodiphenylether	1	90	2,3,3',4,4',5,6-Heptabromodiphenylether
166	2,3,4,4',5,6-Hexabromodiphenylether	1	91	2,3,3',4,4',5',6-Heptabromodiphenylether
167	2,3',4,4',5,5'-Hexabromodiphenylether	1	92	2,3,3',4,5,5',6-Heptabromodiphenylether
168	2,3',4,4',5',6-Hexabromodiphenylether	1	93	2,3,3',4',5,5',6-Heptabromodiphenylether
169	3,3',4,4',5,5'-Hexabromodiphenylether	1	94	2,2',3,3',4,4',5,5'-Octabromodiphenylether
170	2,2',3,3',4,4',5-Heptabromodiphenylether	1	95	2,2',3,3',4,4',5,6-Octabromodiphenylether
171	2,2',3,3',4,4',6-Heptabromodiphenylether	1	96	2,2',3,3',4,4',5,6'-Octabromodiphenylether
172	2,2',3,3',4,5,5'-Heptabromodiphenylether	1	97	2,2',3,3',4,4',6,6'-Octabromodiphenylether
173	2,2',3,3',4,5,6-Heptabromodiphenylether	1	98	2,2',3,3',4,5,5',6-Octabromodiphenylether
174	2,2',3,3',4,5,6'-Heptabromodiphenylether	1	99	2,2',3,3',4,5,5',6'-Octabromodiphenylether
175	2,2',3,3',4,5',6-Heptabromodiphenylether	2	200	2,2',3,3',4,5,6,6'-Octabromodiphenylether
176	2,2',3,3',4,5',6'-Heptabromodiphenylether	2	201	2,2',3,3',4,5',6,6'-Octabromodiphenylether
177	2,2',3,3',4,6,6'-Heptabromodiphenylether	2	202	2,2',3,3',5,5',6,6'-Octabromodiphenylether
178	2,2',3,3',5,5',6-Heptabromodiphenylether	2	203	2,2',3,4,4',5,5',6-Octabromodiphenylether
179	2,2',3,3',5,6,6'-Heptabromodiphenylether	2	204	2,2',3,4,4',5,6,6'-Octabromodiphenylether
180	2,2',3,4,4',5,5'-Heptabromodiphenylether	2	205	2,3,3',4,4',5,5',6-Octabromodiphenylether
181	2,2',3,4,4',5,6-Heptabromodiphenylether	2	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonabromodiphenylether
182	2,2',3,4,4',5,6'-Heptabromodiphenylether	2	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-Nonabromodiphenylether
183	2,2',3,4,4',5',6-Heptabromodiphenylether	2	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-Nonabromodiphenylether
184	2,2',3,4,4',6,6'-Heptabromodiphenylether	2	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-Decabromodiphenylether
185	2,2',3,4,5,5',6-Heptabromodiphenylether			

# F.2 Ergebnistabellen

# F.2.1 TBBPA

#### RNA: CYP1A (Ratio)

ma/ka KC/d	Weil	blich	Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,5	1,0	0,5
30	1,0	0,6	0,9	0,4
100	1,1	0,3	1,1	0,7
300	1,2	0,6	0,8	0,6

#### RNA: CYP2B (Ratio)

ma/ka KC/d	Weil	blich	Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,7	1,0	0,3
30	0,4	0,2	1,2	0,3
100	0,6	0,2	0,9	0,5
300	1,1	1,0	1,4	0,8

#### RNA: CYP3A (Ratio)

ma/ka KG/d	Wei	blich	Männlich	
ing/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,4	1,0	0,3
30	1,2	0,4	0,7	0,5
100	1,2	0,2	1,0	0,2
300	0,9	0,4	0,7	0,5

### EROD (Ratio)

ma/ka KC/d	Weil	blich	Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,6	1,0	0,5
30	0,7	0,4	0,9	0,4
100	0,8	0,5	1,1	0,5
300	0,7	0,4	1,1	0,5

### PROD (Ratio)

malka KC/d	Weil	blich	Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,7	1,0	0,9
30	0,6	0,4	0,9	0,8
100	0,7	0,5	1,0	1,0
300	0,6	0,4	0,9	0,8

#### Western Blot: CYP1A (Ratio)

ma/ka KC/d	Weib	lich	Männlich			
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD		
0	1,0	0,0	1,0	0,0		
30	1,0	0,1	1,1	0,3		
100	0,9	0,1	1,0	0,2		
300	0,8	0,2	1,3	0,5		

#### Western Blot: CYP2B (Ratio)

ma/ka KG/d	Weib	lich	Männlich		
ing/kg KG/u	MW	SD	MW	SD	
0	1,0	0,0	1,0	0,0	
30	1,0	0,1	0,9	0,4	
100	1,0	0,4	1,1	0,5	
300	1,5	0,7	1,0	0,4	

### Western Blot: CYP3A (Ratio)

ma/ka KG/d	Weib	lich	Männlich		
ing/kg KG/u	MW	SD	MW	SD	
0	1,0	0,0	1,0	0,0	
30	1,2	0,8	0,9	0,3	
100	1,3	0,8	1,1	0,7	
300	1,7	1,3	0,8	0,5	

#### LBD (Ratio)

ma/ka KG/d	Weiblich		Männlich	
ilig/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,4	1,0	0,3
30	0,6	0,4	1,0	0,4
100	0,6	0,2	1,9	1,4
300	0,8	0,3	1,1	0,6

# F.2.2 HBCD in vivo

## RNA: CYP1A (Ratio)

malka KC/d	Weil	Weiblich		Männlich	
mg/kg kg/u	MW	SD	MW	SD	
0	1,0	0,3	1,0	0,3	
0,3	1,2	0,1	0,7	0,5	
1	1,5	0,5	1,1	0,1	
3	1,1	0,1	0,9	0,0	
10	1,5	0,2	0,7	0,3	
30	0,9	0,2	0,9	0,5	
100	1,2	0,4	0,8	0,5	
200	1,0	0,7	0,9	0,4	

#### RNA: CYP2B (Ratio)

ma/ka KC/d	Weiblich		Männlich	
iliy/ky KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,4	1,0	0,3
0,3	2,1	1,3	0,4	0,1
1	2,4	2,1	1,2	0,8
3	2,0	1,3	1,5	1,3
10	8,5	6,6	1,7	1,5
30	2,0	0,9	6,5	4,4
100	2,1	1,2	4,7	0,8
200	54,9	55,3	6,3	7,0

#### RNA: CYP3A (Ratio)

malka KC/d	Weiblich		Männlich	
iliy/ky KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,3	1,0	0,2
0,3	1,7	0,2	1,0	0,1
1	1,6	0,5	1,5	0,4
3	2,9	0,8	0,8	0,4
10	12,7	4,2	1,5	0,3
30	20,5	3,9	3,3	1,4
100	23,3	8,4	3,5	2,2
200	35,0	14,3	4,6	2,7

#### Western Blot: CYP1A (Ratio)

malka KC/d	Weiblich		Männlich	
ilig/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,4	1,0	0,3
0,3	0,9	0,4	0,9	0,4
1	0,9	0,5	1,0	0,5
3	0,8	0,6	1,5	0,5
10	1,5	0,2	1,3	0,4
30	1,1	0,3	1,0	0,5
100	2,2	0,7	2,0	0,7
200	1,6	0,8	1,8	0,8

## Western Blot: CYP2B (Ratio)

ma/ka KG/d	Weiblich		Männlich	
ilig/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,3	1,0	0,9
0,3	1,3	0,4	0,4	0,1
1	1,6	1,0	0,4	0,1
3	1,4	0,7	0,5	0,2
10	1,8	0,9	0,7	0,3
30	3,2	1,6	1,7	0,7
100	3,3	1,9	4,1	3,3
200	8,0	2,6	2,9	3,0

### Western Blot: CYP3A (Ratio)

ma/ka KC/d	Weiblich		Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,1	1,0	0,9
0,3	0,9	0,2	0,4	0,1
1	1,5	0,5	0,4	0,1
3	1,2	0,6	0,5	0,2
10	1,9	0,5	0,7	0,3
30	4,3	1,1	1,7	0,7
100	5,1	2,3	4,1	3,3
200	2,7	0,9	2,9	3,0

## EROD (Ratio)

malka KC/d	Weiblich		Männlich	
mg/kg KG/a	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,3	1,0	0,3
0,3	1,1	0,3	1,1	0,3
1	1,1	0,3	1,1	0,2
3	0,9	0,2	1,0	0,2
10	0,9	0,2	1,0	0,1
30	1,0	0,3	1,0	0,2
100	0,9	0,2	1,3	0,4
200	0,9	0,2	1,1	0,3

## PROD (Ratio)

ma/ka KC/d	Wei	blich	Män	nlich
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,3	1,0	0,2
0,3	0,9	0,1	1,2	0,4
1	1,2	0,2	1,3	0,2
3	0,9	0,2	1,3	0,2
10	1,1	0,2	1,5	0,2
30	1,0	0,1	1,4	0,2
100	1,1	0,2	1,7	0,2
200	0,8	0,1	1,2	0,3

#### LBD (Ratio)

ma/ka KC/d	Weiblich		Männlich	
my/ky KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	1,3	1,0	0,4
0,3	1,5	0,9	1,4	0,5
1	2,0	1,2	1,1	0,2
3	1,8	1,3	0,3	0,1
10	3,6	1,6	1,0	0,3
30	5,6	3,6	0,7	0,8
100	4,4	2,5	1,9	1,2
200	10,1	5,0	1,5	0,7

# F.2.3 HBCD in vitro

#### RNA: CYP1A (Ratio)

	MW	SD
DMSO-Kontrolle	1,0	0,0
10 <sup>-8</sup> M HBCD	1,7	0,3
10 <sup>-7</sup> M HBCD	3,2	0,4
10 <sup>-6</sup> M HBCD	3,7	2,7
10 <sup>-5</sup> M HBCD	3,6	0,7
10 <sup>-9</sup> M TCDD	265,4	114,4

### RNA: CYP2B (Ratio)

	MW	SD
DMSO-Kontrolle	1,0	0,2
10 <sup>-6</sup> M HBCD	1,4	0,4
10 <sup>-5</sup> M HBCD	1,5	0,2
10 <sup>-4</sup> M Phenobarbital	1,2	0,3
10 <sup>-5</sup> M Phenobarbital	1,3	0,2

### RNA: CYP3A (Ratio)

	MW	SD
DMSO-Kontrolle	1,0	0,2
10 <sup>-7</sup> M HBCD	2,4	1,0
10 <sup>-6</sup> M HBCD	35,0	14,0
10 <sup>-5</sup> M HBCD	240,0	85,7
25µM Dexamethason	2303,4	506,1

# F.2.4 Pentamix in vivo

### RNA: CYP1A (Ratio)

	Weiblich		Männlich	
my/ky KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,5	1,0	1,0
0,27	1,4	0,6	0,1	0,0
0,82	0,5	0,8	0,3	0,2
2,47	1,4	1,9	0,3	0,2
7,4	3,8	3,5	0,4	0,6
22,2	6,5	7,7	0,4	0,3
66,7	7,2	7,5	1,6	0,1
200	8,8	11,5	1,0	0,8

## RNA: CYP2B (Ratio)

mg/kg KG/d	Weiblich		Männlich	
	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,1	1,0	1,5
0,27	3,7	1,4	0,2	0,2
0,82	0,9	1,1	0,4	0,4
2,47	8,6	13,5	3,1	1,1
7,4	102,9	93,6	31,9	43,8
22,2	573,8	827,1	21,9	13,3
66,7	1045,9	1418,1	72,5	20,9
200	150,8	183,7	41,7	41,7

### RNA: CYP3A (Ratio)

ma/ka KC/d	Weiblich		Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,27	1,0	0,8	0,6	0,7
0,82	0,5	0,7	2,1	0,8
2,47	1,7	2,3	2,0	2,4
7,4	2,6	3,1	4,2	7,7
22,2	30,1	28,0	3,3	3,3
66,7	102,1	81,3	15,2	6,7
200	28,7	25,9	19,9	21,1

#### Western Blot: CYP1A (Ratio)

mg/kg	Weiblich		Männlich	
KG/d	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,3	1,0	0,2
0,27	1,3	0,8	0,7	0,2
0,82	0,8	0,3	1,0	0,4
2,47	1,2	0,7	1,0	0,3
7,4	4,2	1,5	3,9	2,0
22,2	15,1	9,4	4,8	1,9
66,7	19,6	11,2	12,4	4,8
200	21,7	14,5	18,3	4,2

### Western Blot: CYP2B (Ratio)

mg/kg	Weiblich		Männlich	
KG/d	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,2	1,0	0,2
0,27	1,0	0,3	0,9	0,2
0,82	1,7	0,9	1,8	0,6
2,47	6,2	6,2	7,4	3,1
7,4	56,6	38,3	29,5	20,4
22,2	137,3	40,6	29,2	8,8
66,7	192,6	50,3	36,0	5,9
200	82,9	14,2	39,2	6,5

#### Western Blot: CYP3A (Ratio)

	( <i>)</i>						
mg/kg	Weiblich		Männlich				
KG/d	MW	SD	MW	SD			
0	1,0	0,4	1,0	0,2			
0,27	1,1	0,3	0,8	0,2			
0,82	2,3	2,4	1,1	0,4			
2,47	1,9	1,9	0,9	0,3			
7,4	14,7	13,8	2,5	1,0			
22,2	20,2	14,2	2,7	1,6			
66,7	29,6	18,7	4,7	2,2			
200	17,2	9,1	5,1	1,7			

## EROD (Ratio)

mg/kg KG/d	Weiblich		Männlich	
	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,1	1,0	0,3
0,27	1,5	0,1	0,9	0,1
0,82	1,6	0,1	1,0	0,2
2,47	4,2	1,6	1,6	0,7
7,4	8,3	3,2	2,6	0,4
22,2	20,6	8,1	3,3	1,9
66,7	23,1	8,5	10,2	2,8
200	37,6	11,9	16,2	3,0

## PROD (Ratio)

malka KC/d	Weiblich		Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,1	1,0	0,6
0,27	1,4	0,3	0,7	0,0
0,82	1,5	0,2	1,2	0,7
2,47	3,1	1,0	2,5	1,2
7,4	5,4	0,9	8,6	2,4
22,2	10,3	2,9	6,9	5,4
66,7	12,4	3,5	8,9	2,6
200	23,0	4,2	8,5	1,4

#### LBD (Ratio)

malka KC/d	Weiblich		Männlich	
iliy/ky KG/u	MW	SD	MW	SD
0	1,0	0,1	1,0	0,1
0,27	1,0	0,2	0,9	0,1
0,82	1,1	0,1	1,0	0,1
2,47	1,0	0,2	0,9	0,2
7,4	0,9	0,1	1,0	0,1
22,2	1,1	0,1	0,9	0,1
66,7	1,0	0,3	1,0	0,2
200	1,0	0,1	0,9	0,3
# F.2.5 Pentamix in vitro

#### RNA: CYP1A (Ratio)

	MW	SD
DMSO-Kontrolle	1,0	0,0
10 <sup>-6</sup> M Pentamix	1,9	0,2
10 <sup>-5</sup> M Pentamix	5,4	1,0
10 <sup>-4</sup> M Pentamix	9,4	2,4
10 <sup>-9</sup> M TCDD	265,4	114,4

#### RNA: CYP2B (Ratio)

	MW	SD
DMSO-Kontrolle	1,0	0,2
10 <sup>-6</sup> M Pentamix	1,2	0,2
10 <sup>-5</sup> M Pentamix	1,2	0,2
10 <sup>-4</sup> M Phenobarbital	1,2	0,3
10 <sup>-5</sup> M Phenobarbital	1,3	0,2

### RNA: CYP3A (Ratio)

	MW	SD
DMSO-Kontrolle	1,0	0,2
10 <sup>-6</sup> M Pentamix	2,2	0,4
10 <sup>-5</sup> M Pentamix	3,3	0,5
10 <sup>-4</sup> M Pentamix	108,8	26,1
25µM Dexamethason	2303,4	506,1

# EROD (Ratio)

	MW	SD
10 <sup>-4</sup> M Pentamix	31,7	6,8
5*10 <sup>-5</sup> M Pentamix	39,5	3,1
2*10 <sup>-5</sup> M Pentamix	44,7	9,4
10 <sup>-5</sup> M Pentamix	37,8	2,7
7,5*10 <sup>-6</sup> M Pentamix	37,4	6,2
5*10 <sup>-6</sup> M Pentamix	34,9	3,7
2*10 <sup>-5</sup> M Pentamix	22,9	2,3
10 <sup>-6</sup> M Pentamix	14,1	8,7
10 <sup>-7</sup> M Pentamix	1,6	0,3
10 <sup>-8</sup> M Pentamix	1,1	0,3
10 <sup>-9</sup> M Pentamix	1,1	0,2
10 <sup>-9</sup> M TCDD	65,6	11,7
DMSO-Kontrolle	1,0	0,3

# F.2.6 Decamix

RNA:	CYP1A	(Ratio)
1 11 17 1.	011 173	(i tatio)

	Weiblich		Männlich	
iliy/ky KG/u	MW	SD	MW	SD
0-0	1,0	0,5	1,0	0,2
0	1,2	0,2	1,8	1,0
1,87	1,3	0,8	1,6	0,5
3,75	1,1	0,3	1,2	0,4
7,5	1,7	0,6	1,3	0,4
15	1,6	0,4	2,0	0,7
30	1,8	0,3	1,4	0,4
60	1,8	0,3	1,8	0,4

## RNA: CYP2B (Ratio)

malka KC/d	Weiblich		Männlich	
iliy/ky KG/u	MW	SD	MW	SD
0-0	1,0	0,7	1,0	0,6
0	0,9	0,4	0,5	0,2
1,87	1,1	0,4	1,5	1,5
3,75	1,5	1,4	1,1	1,0
7,5	4,9	4,5	4,5	2,2
15	2,2	1,4	5,5	3,1
30	6,0	4,7	7,7	3,5
60	4,0	5,1	2,4	2,3

# RNA: CYP3A (Ratio)

ma/ka KC/d	Weiblich		Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0-0	1,0	0,6	1,0	0,2
0	1,2	0,5	1,1	0,5
1,87	1,5	0,3	1,4	0,4
3,75	0,9	0,4	0,9	0,5
7,5	1,7	0,7	0,9	0,3
15	2,3	1,1	1,1	0,4
30	1,1	0,5	0,7	0,2
60	2,0	0,9	0,9	0,3

### Western Blot: CYP1A (Ratio)

ma/ka KC/d	Weiblich		Männlich	
ilig/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0-0	1,0	0,4	1,0	0,4
0	1,1	0,4	1,0	0,7
1,87	1,2	0,4	0,7	0,4
3,75	0,8	0,1	0,7	0,4
7,5	1,4	0,4	1,0	1,0
15	0,8	0,2	1,3	1,0
30	1,1	0,5	2,0	1,8
60	1,1	0,3	2,7	2,1

## Western Blot: CYP2B (Ratio)

ma/ka KC/d	Weiblich		Männlich	
ilig/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

### Western Blot: CYP3A (Ratio)

malka KC/d	Weiblich		Männlich	
mg/kg KG/u	MW	SD	MW	SD
0-0	1,0	0,0	1,0	0,0
0	1,2	0,2	1,0	0,1
1,87	1,0	0,2	1,1	0,3
3,75	1,0	0,0	0,9	0,2
7,5	1,2	0,3	0,9	0,3
15	1,1	0,1	0,9	0,1
30	1,0	0,2	0,7	0,1
60	0,9	0,2	0,7	0,2

# EROD (Ratio)

	Weiblich		Männlich	
mg/kg KG/a	MW	SD	MW	SD
0-0	1,0	0,2	1,0	0,1
0	1,3	0,3	1,0	0,1
1,87	1,0	0,2	1,1	0,4
3,75	1,2	0,4	1,3	0,5
7,5	1,2	0,3	1,1	0,1
15	1,5	0,4	1,5	0,5
30	1,0	0,3	1,6	0,2
60	1,7	0,2	1,9	0,3

# PROD (Ratio)

mg/kg KG/d	Weiblich		Männlich	
	MW	SD	MW	SD
0-0	1,0	0,1	1,0	0,1
0	1,5	0,3	1,1	0,2
1,87	0,8	0,3	1,2	0,6
3,75	1,4	0,7	1,6	0,7
7,5	1,1	0,4	1,2	0,1
15	1,5	0,5	2,6	1,5
30	0,9	0,4	2,5	0,3
60	1,6	0,2	2,7	0,9

#### LBD (Ratio)

mg/kg KG/d	Weiblich		Männlich	
	MW	SD	MW	SD
0-0	1,0	0,1	1,0	0,2
0	1,0	0,4	0,9	0,1
1,87	1,0	0,1	0,9	0,1
3,75	0,9	0,3	1,0	0,1
7,5	1,0	0,2	0,8	0,1
15	0,9	0,2	1,1	0,3
30	1,1	0,1	1,0	0,2
60	0,9	0,2	1,0	0,1