

Projekt Umwelt und Gesundheit (PUG)

Abschlußbericht

Wirkung der kombinierten Belastung mit ausgewählten PCB-Kongeneren auf  
spezifische Verhaltensweisen, Neurotransmitter im Gehirn und  
Schilddrüsenhormone bei der Ratte

von

H. Lilienthal, A. Roth-Härer, J. Hany, C. Huppa, H. Kremer, M. Petsas, G. Winneke

Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

in Kooperation mit

A. Fastabend, B. Heinzow, G. Ostendorp, H. Winterhoff

Die Arbeiten des Projektes Umwelt und Gesundheit  
werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Förderkennzeichen: PUG U 95 003

November 1997

# **Wirkung der kombinierten Belastung mit ausgewählten PCB-Kongeneren auf spezifische Verhaltensweisen, Neurotransmitter im Gehirn und Schilddrüsenhormone bei der Ratte**

H. Lilienthal, A. Roth-Härer, J. Hany, C. Huppa, H. Kremer, M. Petsas, G. Winneke  
Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf

## **Zusammenfassung**

In diesen Versuchen sollte die Wirkung bestimmter Kombinationen von PCB-Kongeneren nach Belastung während der Entwicklung geprüft werden. Dazu wurden an Ratten Verhaltenstests durchgeführt, die für Veränderungen in bestimmten Hirnarealen sensitiv sind. Die Ergebnisse wurden zu Änderungen von Neurotransmitterkonzentrationen in verschiedenen Gehirnarealen und Schilddrüsenhormonen in Beziehung gesetzt. In dem ersten Teil des Projektes wurden zwei PCB-Kongeneren, ein ortho-chloriertes (2,2',4,4'-Tetrachlorbiphenyl) und ein coplanares (3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl) einzeln oder in Kombination eingesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung wurden Blut- und Organproben für chemische und biochemische Analysen bei Müttern und Nachkommen entnommen. Bei gleicher Dosis war die innere Belastung mit dem coplanaren PCB deutlich geringer als beim ortho-chlorierten Kongener. Trotzdem war der überwiegende Teil der Wirkungen durch das coplanare PCB verursacht. Es konnten erstmals geschlechtsspezifische Wirkungen auf Elektretinogramme (ERG) nachgewiesen werden. Die Verhaltensexperimente ergaben Veränderungen in den emotionalen Komponenten und sprechen damit für Wirkungen auf die Amygdala im Gegensatz zum Hippocampus. Ferner traten Wirkungen bei der Haloperidol-induzierten Katalepsie auf, die im Einklang mit neurochemischen Veränderungen sind. Bei Aktivitätsmessungen war eine Altersabhängigkeit der Wirkungen zu beobachten. Im zweiten Projektteil wurde ein technisches PCB-Gemisch mit einem Gemisch verglichen, das nach dem Muster der in Muttermilch vorhandenen Kongeneren rekonstituiert war. Wirkungen waren dabei erneut auf die Katalepsie und auf emotionales Verhalten zu beobachten. Die Wirkungen beider PCB-Gemische waren in diesen Tests ziemlich ähnlich, während in den noch andauernden Messungen zu steroidabhängigen Funktionen das rekonstituierte Gemisch die deutlicheren Wirkungen zeigt.

## **Effects of Combined Exposure to Selected PCB Congeners on Behavior, Neurotransmitters in the Brain, and Thyroid Hormones in Rats**

H. Lilienthal, A. Roth-Härer, J. Hany, C. Huppa, H. Kremer, M. Petsas, G. Winneke

### **Summary**

The purpose of this study was to evaluate the effects of developmental exposure to combinations of selected PCB congeners in rats. Several behavioral tests were conducted which are sensitive to alterations in different parts of the brain. The outcome was related to changes in levels of neurotransmitters and thyroid hormones. In the first part an ortho-chlorinated PCB congener (2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl) and a coplanar PCB (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl) were used for single and combined exposure. Blood and tissue samples were taken at different time points during development for chemical and biochemical analyses. At the same dose level internal exposure to the coplanar PCB was lower than values of the ortho-chlorinated PCB. However, the coplanar congener induced most of the effects. For the first time sex-dependent effects on the electroretinogram could be demonstrated. Behavioral tests revealed changes in emotional components and, therefore, suggest effects on the amygdala rather than on the hippocampus. Effects were further found on haloperidol-induced catalepsy which are consistent with neurochemical changes. An age-dependency of effects was observed in activity measurements. In the second part, a technical mixture of PCBs was compared with a mixture reconstituted according to the congener pattern in breast milk. Again, effects could be detected

on catalepsy and emotional behaviors. The technical and the reconstituted mixtures exerted similar effects in these tests, while in the ongoing evaluation of steroid-mediated functions effects by the reconstituted mixture were more pronounced.

# 1 Einleitung

In epidemiologischen Untersuchungen an zwei Populationen in den USA wurden Zusammenhänge zwischen der neuropsychologischen Entwicklung von Kindern und der Belastung mit polychlorierten Biphenylen (PCB) berichtet. Signifikante Beziehungen gab es dabei nur mit der pränatalen Belastung, nicht aber mit der postnatalen Exposition über die Muttermilch (JACOBSON et al. 1985; ROGAN et al. 1986). Diese Untersuchungen warfen Fragen auf zur Kausalität, dem Spektrum und der Persistenz der beobachteten Entwicklungs-defizite. In einem Kreuzaufzuchtversuch an Ratten ergab sich, daß die pränatal exponierten Tiere wie die permanent belasteten Ratten Defizite in zwei Lernversuchen aufwiesen. Dagegen verhielten sich die postnatal exponierten Ratten wie die Kontrollen (LILIENTHAL & WINNEKE 1991). Zur PCB-Belastung wurde in diesem Versuch ein technisches Gemisch (Clophen A30) eingesetzt. Daran anschließende Experimente mit einem coplanaren und einem ortho-chlorierten Kongener ergaben ausgeprägtere Wirkungen des coplanaren PCB (WEINAND-HÄRER et al. 1997). Da die Belastung des Menschen weder mit technischen Gemischen noch mit Einzelkongeneren erfolgt, sollen die gegenwärtigen Versuche die Wirkung definierter Kombinationen von PCB-Einzelkongeneren prüfen.

Experimente mit definierten Gemischen wurden bisher nur vereinzelt durchgeführt. Dabei wurde eine stärkere Enzyminduktion in der Rattenleber durch ein PCB-Gemisch gefunden, das in seiner Zusammensetzung dem Muster der in Muttermilch vorhandenen Kongenere entsprach, als durch das technische Gemisch Kanechlor 500 (PARKINSON et al. 1980). Bei der Untersuchung der mutagenen Wirkung von 2,2',5,5'-tetraCB und 3,3',4,4'-tetraCB allein oder in Kombination wurden in vitro und in vivo überadditive bzw. potenzierende Wirkungen der Kombination beobachtet (SARGENT et al. 1989 und 1992). In Experimenten mit verschiedenen Klassen von PCB-Kongeneren - coplanare, di-ortho-chlorierte, und mono-ortho-chlorierte Verbindungen - an einer Marderart traten reproduktionstoxische Wirkungen nur auf, wenn mehr als eine Klasse von PCB verwendet wurde (KIHLSTRÖM et al. 1992).

Bislang gibt es keine Untersuchungen zur Neuro- und Verhaltenstoxizität von definierten PCB-Gemischen. Das jetzige Vorhaben soll prüfen, ob es auch im Verhaltensbereich zu Interaktionen nach kombinierter Belastung mit einzelnen PCB-Kongeneren kommt. Im ersten Schritt wird als einfachstes Gemisch die Kombination aus einem coplanaren PCB (3,3',4,4'-tetraCB) und einem ortho-

chlorierten PCB (2,2',4,4'-tetraCB) untersucht und mit den Wirkungen der Einzelkongenere verglichen. Ortho-chlorierte Kongenere führen *in vitro* zu erniedrigten Dopamin-Konzentrationen in PC-12-Zellen (SHAIN et al. 1991). Metabolite des coplanaren Kongeners blockieren die Bindungsstellen für Schilddrüsenhormone an ihren Serum-Transportproteinen (BROUWER & VAN DEN BERG 1986). Beide Wirkungen beeinflussen die neuronale Entwicklung und können Verhaltensänderungen induzieren.

## **2 Experiment I**

### **2.1 Fragestellung**

Ziel dieser Versuche war, die Wirkung einer Kombination des ortho-chlorierten 2,2',4,4'-tetraCB (PCB 47) und des coplanaren 3,3',4,4'-tetraCB (PCB 77) auf verschiedene Funktionen des Nervensystems nach Belastung während der Entwicklung zu prüfen und mit neurochemischen Daten und Hormonanalysen zu verknüpfen. Es wurden sensorische Funktionen wie akustisch evozierte Hirnstammpotentiale (BAEP) und Elektretinogramme (ERG) sowie Verhaltenstests ausgewählt, die für Veränderungen in bestimmten Hirnarealen sensitiv sind.

### **2.2 Hintergrund**

Nach Exposition von Ratten mit einem technischen PCB-Gemisch (Aroclor 1254) waren Hörschwellen und die Schreckreaktion auf akustische Reize verändert (GOLDEY et al. 1995b). Diese Veränderungen entsprachen der Wirkung des Thyreostatikums Propylthiouracil (PTU) auf das Hörsystem (GOLDEY et al. 1995a). Die Messung der BAEP soll Aufschluß geben, ob Veränderungen auch nach Belastung mit PCB-Kongenere, einzeln oder in Kombination, zu beobachten sind und ob sie cochleären oder neuronalen Ursprungs sind. ERG werden miteinbezogen, da sie sensitiv für Veränderungen im dopaminergen System der Retina sind (LILIENTHAL et al. 1994). Im Gegensatz zum Hörsystem gab es bislang nur einen Hinweis auf PCB-induzierte Veränderungen im Sehvermögen, nämlich die diffuse Angabe von „visuellen Störungen“ bei Yusho-Patienten nach einer Massenvergiftung in Japan (KURATSUNE et al. 1972). Die vorliegenden Untersuchungen hatten deshalb den Zweck, mögliche Veränderungen des visuellen Systems anhand von Elektretinogrammen experimentell zu erfassen.

Da insbesondere ortho-chlorierte PCB auf das dopaminerge System wirken (SHAIN et al. 1991), wurde als ein Verhaltenstest die Haloperidol-induzierte Katalepsie ausgewählt. Klassische Neuroleptika wie Haloperidol blockieren den Dopamin-D2-Rezeptor im Striatum und führen so zu einer Hemmung der Willkürmotorik. Um weitere Verhaltensbereiche zu erfassen, wurde das räumliche Lernen im Radiallabyrinth als selektiv für den Hippocampus sowie die passive Vermeidung und die konditionierte Geschmacksaversion als selektiv für die Amygdala ausgewählt. Daneben wurden Messungen der lokomotorischen Aktivität im „open field“ durchgeführt, um unspezifische Aktivitätseinflüsse mit möglicher Bedeutung für die anderen Verhaltenstests zu erfassen.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Tiere und Exposition**

Trächtige Long-Evans-Ratten wurden täglich von Gestationstag 7-18 (GD7-GD18) mit PCB47 (1,5 mg/kg KG), mit PCB77 (0,5 oder 1,5 mg/kg) oder mit beiden Kongeneren (1,0 mg PCB47 + 0,5 mg PCB77/kg) SC injiziert. Kontrollen erhielten das Vehikel (Olivenöl). Nachkommen von Müttern, die 1,5 mg PCB77/kg erhalten hatten, wurden zur Bestimmung der passiven Vermeidung sowie für Messungen der Elektretinogramme (ERG) und BAEP eingesetzt. Nachkommen der Mütter mit 0,5 mg PCB77/kg absolvierten alle anderen Tests. Bei der BAEP-Messung wurde zusätzlich eine Gruppe mit maternaler PTU-Belastung (15 mg/l Trinkwasser) als Positivkontrolle eingesetzt. Für ERG und BAEP wurden sowohl männliche als auch weibliche Nachkommen eingesetzt, für die übrigen Tests nur männliche Ratten.

An GD19 und dem postnatalen Tag (PND) 21 wurde ein Teil der Mütter und Nachkommen zur Blut- und Organentnahme (Gehirn, Leber, perirenales Fett, Uterus) getötet, um die innere Exposition und Hormone zu bestimmen. Bei den Nachkommen erfolgten zusätzlich an PND45 und PND380 weitere Tötungen zur Organentnahme und Präparation von Hirnarealen für die Bestimmung von Neurotransmittern.

### **2.3.2 Neurotransmitterbestimmungen**

Zur Bestimmung der Neurotransmitter wurden die Ratten dekapitiert und die Gehirne schnell entfernt. Die Präparation der Hirnareale - medialer präfrontaler Cortex, Nucleus accumbens,

Striatum anterior und Striatum posterior - erfolgte unter Kühlung. Die Analyse der Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5HT) sowie der Dopamin-Metaboliten Dihydroxyphenylethylamin (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) und des Serotonin-Metaboliten 5-Hydroxyindolethylamin (5HIAA) wurde mittels HPLC und elektrochemischer Detektion nach früher beschriebenen Methoden durchgeführt (BUBSER & SCHMIDT 1990).

### **2.3.3 Schilddrüsenhormone**

An GD19 und PND21 wurde bei den Müttern Herzpunktionsblut zur Bestimmung von Schilddrüsenhormonen entnommen. Bei den Nachkommen erfolgten entsprechende Entnahmen an PND21 und PND45. Es wurden TSH, freies Thyroxin (FT<sub>4</sub>), Gesamt-Thyroxin (TT<sub>4</sub>), freies Trijodthyronin (FT<sub>3</sub>) und Gesamt-Trijodthyronin (TT<sub>3</sub>) im Serum gemessen. Die Methode zur Analyse der Hormone ist in LILIENTHAL et al. (1997) angegeben.

### **2.3.4 Elektrophysiologische Messungen**

Ab PND100 wurden BAEPs nach Clicks abgeleitet, deren Schalldruckpegel (SPL) und Reizrate variiert wurden. Zusätzlich wurden BAEPs bei maskierendem Rauschen mit unterschiedlichem SPL gemessen. Die Ratten (10 Böcke, 10 Weibchen/Gruppe) waren während der Messung mit Ketamin und Xylazin sediert. Alle Methoden der BAEP-Messung sind ausführlich in LILIENTHAL & WINNEKE (1996) dargestellt.

Elektroretinogramme (ERGs) wurden ab PND200 unter derselben Sedierung wie die BAEP erhoben. Die Ratten wurden vor Beginn der Messung 40 min dunkeladaptiert. Als Reize wurden Blitze verwendet, deren Leuchtdichte durch Neutralgraufilter variiert wurde. Um Ganzfeldbedingungen zu schaffen, fielen die Blitze auf eine Kugel aus Opalglas, in der sich der Rattenkopf befand. Es wurde eine skotopische Kennlinie, das Maximale Potential, Oszillatorische Potentiale sowie bei wieder eingeschalteter Hintergrundbeleuchtung Flimmer-Potentiale und das photopische Potential gemessen. Eine ausführliche Darstellung der Methode findet sich in LILIENTHAL et al. (1994).

### **2.3.5 Verhaltenstests**

Die Ermittlung der lokomotorischen Aktivität im „open field“ erfolgte an PND18 sowie an PND70 und 340. Die Messung dauerte für jedes Tier 9 min. Die Methode ist ausführlich in LLIENTHAL et al. (1990) beschrieben.

Die Messung der passiven Vermeidung wurde ab PND85 an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Die Ratten hatten dabei die Aufgabe, einen elektrischen Fußschock zu vermeiden, der nach dem Heruntersteigen von einer Plattform appliziert wurde. Der Schock wurde nur beim Trainingstrial eingesetzt. Nach 5 min, 4 h und 24 h wurden die Tiere erneut auf die Plattform gesetzt und die Latenzzeit bis zum Verlassen der Plattform bestimmt.

Bei PND100 wurde ein Katalepsietest durchgeführt. Dazu erhielten männliche Nachkommen Haloperidol (0.3 mg/kg KG) injiziert. Zur Quantifizierung der Katalepsie wurden die Ratten in 3 ungewöhnliche Positionen gebracht: eine Vorderpfote auf einem Podest, aufrecht stehend mit beiden Vorderpfoten auf einer erhöhten Stange, das Tier hängend an einem vertikalen Gitter. Gemessen wurde die Zeit bis zum Bewegungsbeginn der Ratte bzw. bis zur Rückkehr in die normale Haltung. Die Messungen erfolgten für jedes Tier 30 und 60 min nach der Injektion von Haloperidol. Dieser Test ist in der Verhaltenspharmakologie zur Prüfung der Wirkung von klassischen und atypischen Neuroleptika auf die extrapyramidale Motorik etabliert.

Beginnend mit PND300 wurde das räumliche Lernen in einem Radiallabyrinth untersucht, das aus einem achteckigen Mittelstück bestand, von dem 8 gleichlange Arme abgingen. Am Ende jedes Arms befand sich ein Futterpellet. Die Tiere hatten die Aufgabe, alle 8 Pellets zu finden. Dabei wurde jedes zweimalige Betreten eines Arms als Fehler gewertet. Die Methodik der passiven Vermeidung, des Katalepsie-Tests und des räumlichen Lernens sind ausführlich in WEINAND-HÄRER et al. (1997) beschrieben.

Zur Untersuchung des Geschmacksaversionslernens bei PND360 wurde Saccharin-Lösung (0,1%) als konditionierter und Estradiol (10 µg/kg KG) als aversiver unconditionierter Reiz eingesetzt. Männliche Ratten wurden an ein Trinkschema von 30 min pro Tag eine Woche lang gewöhnt. Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch wurden täglich bestimmt. Nachdem sich die Wasser- und Futteraufnahme stabilisiert hatten, erhielten die Tiere am Konditionierungstag Saccharin-Lösung anstelle von Wasser und unmittelbar im Anschluß an die 30minütige Trinkzeit eine IP Injektion von Estradiol (10 µg/kg). Nach zwei Tagen mit Trinkwasser erhielten die Ratten am folgenden Testtag eine Flasche mit Saccharin-Lösung und eine mit Trinkwasser. Die jeweils konsumierte Menge wurde nach 30 min bestimmt.

## 2.4 Ergebnisse

Die Gewichtsentwicklung der Mütter und Nachkommen war bis auf die Gruppe, die täglich 1,5 mg PCB77/kg erhalten hatte, in allen Gruppen gleich. In dieser Gruppe kam es zu Gewichtsreduktionen von circa 10% bei den Nachkommen. Es gab keine Unterschiede zwischen allen Gruppen hinsichtlich der Anzahl der Implantationen und der Wurfgröße.

### 2.4.1 PCB-Konzentrationen im Gewebe

Die Ergebnisse der PCB-Bestimmungen im Gehirn und im Fettgewebe sind für die Mütter in Tabelle 1 und für die Nachkommen in Tabelle 2 und 3 dargestellt.

**Tabelle 1: PCB-Gewebskonzentrationen der Mütter ( $\mu\text{g/g}$  Fett)**

Gruppe	Zeitpunkt	PCB47, Gehirn	PCB77, Gehirn	PCB47, Fett	PCB77, Fett
Kontrolle	GD19	n.n	n.n	n.n	n.n
Kontrolle	PND21	0.00 $\pm$ 0.01	n.n	n.n	n.n
PCB47	GD19	6.93 $\pm$ 2.14	n.n	38.99 $\pm$ 18.69	n.n
PCB47	PND21	0.73 $\pm$ 0.44	n.n	11.65 $\pm$ 1.48	n.n
PCB77 (0.5)	GD19	0.00 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.04	0.01 $\pm$ 0.01	0.74 $\pm$ 0.10
PCB77 (0.5)	PND21	n.n	0.02 $\pm$ 0.01	n.n	0.22 $\pm$ 0.07
PCB77 (1.5)	PND21	0.00 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.09
PCB47/77	GD19	5.53 $\pm$ 0.73	0.08 $\pm$ 0.04	17.67 $\pm$ 10.81	1.26 $\pm$ 0.83
PCB47/77	PND21	0.70 $\pm$ 0.21	0.01 $\pm$ 0.01	10.05 $\pm$ 2.75	0.22 $\pm$ 0.03

Mittelwerte  $\pm$  SD; n=3 (n=2 für Fettgewebe in der PCB47-Gruppe an PND21); PCB77 (0,5) - tägliche Dosis 0,5 mg/kg, PCB77 (1,5) - tägliche Dosis 1,5 mg/kg; n.n - nicht nachweisbar, Bestimmungsgrenze 0.01 $\mu\text{g/g}$  Fett.

Bei den Müttern ist ein deutliches Absinken der inneren Belastung während der Laktation zu erkennen. Die Konzentrationen von PCB47 sinken im Gehirn während der Zeit von GD19 bis

PND21 um etwa 90%, im Fettgewebe dagegen nur um etwa 40-70%. Für die Konzentrationen von PCB77 betragen die entsprechenden Zahlen 70-90% im Gehirn und 70-85% im Fettgewebe.

An GD19 entsprechen bei den Nachkommen die Konzentrationen von PCB47 im Gehirn in etwa den mütterlichen Werten, die Konzentrationen von PCB77 sind bei den Feten 60-85% höher als bei den Müttern. An GD19 konnten bei den Nachkommen keine Fettproben entnommen werden. Der Vergleich der Konzentrationen im Fettgewebe an PND21 ergibt etwa 4,5-6mal so hohe Werte für PCB47 bei den Jungtieren im Vergleich zu den Müttern, während die entsprechenden Werte für PCB77 je nach Dosis 1,5-7,5fach höher sind. Die Konzentrationen von PCB47 im Gehirn steigen bei den Nachkommen während der Säugephase um etwa 30%. Dagegen sinken die entsprechenden Werte für PCB77, teilweise unter die Bestimmungsgrenze. Erwartungsgemäß sinken alle inneren Belastungswerte, d.h. auch die Werte für PCB47 von PND21 bis PND45 sowohl im Gehirn als auch im Fettgewebe. Generell sind bei gleicher Dosis die inneren Belastungen mit PCB47 höher als mit PCB77 [Vergleich PCB47 vs. PCB77 (1,5) bei PND21]. Bei den Müttern überwiegt die innere Belastung mit PCB47 die mit PCB77 um den Faktor 15 im Gehirn und um den Faktor 20 im Fettgewebe. Bei den Nachkommen ergeben sich entsprechende Faktoren von >800 für Gehirn und Fett an PND21.

**Tabelle 2: PCB-Gewebskonzentrationen der Nachkommen ( $\mu\text{g/g}$  Fett)**

Gruppe	Alter	PCB47, Gehirn	PCB77, Gehirn	PCB47, Fett	PCB77, Fett
Kontrolle	GD19	n.n	n.n	---	---
Kontrolle	PND21	n.n	n.n	n.n	n.n
Kontrolle	PND45	0.01 $\pm$ 0.02	n.n	0.02 $\pm$ 0.02	n.n
PCB47	GD19	6.44 $\pm$ 3.36	n.n	---	---
PCB47	PND21	8.75 $\pm$ 1.00	n.n	70.49 $\pm$ 25.26	0.01 $\pm$ 0.01
PCB47	PND45	0.96 $\pm$ 0.36	n.n	7.09 $\pm$ 4.85	0.00 $\pm$ 0.01
PCB77 (0.5)	GD19	0.03 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	---	---
PCB77 (0.5)	PND21	0.02 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.13
PCB77 (0.5)	PND45	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	n.n
PCB77 (1.5)	PND21	n.n	0.00 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.04

PCB47/77	GD19	4.72 ± 0.80	0.13 ± 0.02	---	---
PCB47/77	PND21	6.06 ± 0.69	n.n	45.00 ± 8.22	0.05 ± 0.03
PCB47/77	PND45	0.97 ± 0.18	n.n	8.75 ± 1.97	n.n

Mittelwerte ± SD; n=3; PCB77 (0,5) - tägliche Dosis 0,5 mg/kg, PCB77 (1,5) - tägliche Dosis 1,5 mg/kg; n.n - nicht nachweisbar, Bestimmungsgrenze 0.01µg/g Fett; an GD19 konnten bei den Nachkommen keine Fettproben entnommen werden.

**Tabelle 3: PCB-Konzentrationen in der Leber der Nachkommen ( $\mu\text{g/g}$  Fett)**

Gruppe	Alter	PCB47	PCB77
Kontrolle	PND21	n.n	n.n
PCB47	PND21	21.9 + 7.6	n.n
PCB77 (1.5)	PND21	n.n	n.n
PCB47/77	PND21	18.6 + 3.0	n.n

Mittelwerte  $\pm$  SD; n=4; PCB77 (1,5) - tägliche Dosis 1,5 mg/kg; n.n - nicht nachweisbar, Bestimmungsgrenze 0.10  $\mu\text{g/g}$  Fett.

### 2.4.2 Neurotransmitterbestimmungen

Die Analyse der Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5HT) sowie der Dopamin-Metaboliten (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) und des Serotoninmetaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure (HIAA) ergab Unterschiede vor allem im Nucleus accumbens (NAC) und im Striatum posterior, teilweise auch im medialen präfrontalen Cortex (PFC). Am ausgeprägtesten waren die Unterschiede beim Serotonin-Metaboliten HIAA. Die Tabelle 4 faßt die deutlichsten Wirkungen zusammen.

**Tabelle 4: Konzentrationen und Umsätze der Neurotransmitter**

Gruppe	Hirnregion	NA	HVA	5HT	HIAA	5HT-Umsatz
Kontrolle	PFC	474 $\pm$ 56	130 $\pm$ 16	281 $\pm$ 78	527 $\pm$ 46	0.524 $\pm$ 0.102
Kontrolle	NAC	793 $\pm$ 240	738 $\pm$ 64	625 $\pm$ 94	729 $\pm$ 54	0.854 $\pm$ 0.092
Kontrolle	SP	483 $\pm$ 92	1140 $\pm$ 121	412 $\pm$ 62	753 $\pm$ 68	0.544 $\pm$ 0.044
PCB47	PFC	560 $\pm$ 66	129 $\pm$ 20	407 $\pm$ 122	610 $\pm$ 90	0.720 $\pm$ 0.290
PCB47	NAC	624 $\pm$ 136	729 $\pm$ 94	529 $\pm$ 120	712 $\pm$ 72	0.743 $\pm$ 0.142
PCB47	SP	299 $\pm$ 44*	1200 $\pm$ 208	442 $\pm$ 46	781 $\pm$ 42	0.565 $\pm$ 0.046
PCB77	PFC	539 $\pm$ 82	138 $\pm$ 22	296 $\pm$ 56	645 $\pm$ 124*	0.469 $\pm$ 0.076
PCB77	NAC	991 $\pm$ 342	678 $\pm$ 124	568 $\pm$ 72	850 $\pm$ 102*§	0.681 $\pm$ 0.104*
PCB77	SP	323 $\pm$ 66*	1126 $\pm$ 178	480 $\pm$ 42	923 $\pm$ 52*§	0.522 $\pm$ 0.048

PCB47/77	PFC	521 ± 86	133 ± 20	232 ± 68	515 ± 70	0.438±0.074
PCB47/77	NAC	687 ± 216	598 ± 84*§	506 ± 90*§	632 ± 46*§	0.813±0.164
PCB47/77	SP	418 ± 92	1233 ± 172	434 ± 18	764 ± 74§	0.578± 0.062

Konzentrationen (pg/ml); Mittelwerte ± CL95; n=8; \*p<0.05 vs Kontrolle, §p<0.05 vs PCB47, \$p<0.05 vs PCB77, Wilcoxon-Test.

### 2.4.3 Schilddrüsenhormone

Bei den Müttern waren die Werte der Schilddrüsenhormone hauptsächlich an GD19 verändert. Bei FT<sub>4</sub>, TT<sub>4</sub> und FT<sub>3</sub> ergaben sich die deutlichsten Wirkungen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Schilddrüsenhormone im Serum von Rattenmüttern an GD19**

Gruppe	FT <sub>4</sub> (pmol/l)	TT <sub>4</sub> (µg/dl)	FT <sub>3</sub> (pmol/l)
Kontrolle	9.96 ± 2.08	4.00 ± 0.56	7.97 ± 0.22
PCB47	12.12 ± 1.00	4.98 ± 0.22*§#	7.07 ± 0.84*
PCB77	8.48 ± 1.38§	3.29 ± 0.24	7.39 ± 1.22
PCB47/77	8.89 ± 0.76§	3.19 ± 0.44	7.12 ± 0.24*

Mittelwerte ± CL95; n=8; \*p<0.05 vs Kontrolle, §p<0.05 vs PCB47, \$p<0.05 vs PCB77, #p<0.05 vs PCB47/77; Varianzanalyse mit REGWQ-Test.

Bei den Nachkommen ergab sich eine deutliche Dosisabhängigkeit bei PCB77. Auch bei der niedrigeren Dosis (0.5 mg/kg) traten Wirkungen auf die Serumspiegel von TT<sub>4</sub> und FT<sub>3</sub> auf.

**Tabelle 6: Schilddrüsenhormone im Serum der Nachkommen an PND21**

Gruppe	FT <sub>4</sub> (pmol/l)	TT <sub>4</sub> (µg/dl)	FT <sub>3</sub> (pmol/l)
Kontrolle	13.78 ± 1.72	6.22 ± 0.28	9.23 ± 0.58
PCB47	13.29 ± 1.10	5.78 ± 0.58	6.10 ± 0.56*

PCB77 (0.5)	11.81 ± 1.18	5.25 ± 0.52*	7.93 ± 0.66*§
PCB77 (1.5)	9.30 ± 0.84*§§#	3.96 ± 0.50*§§#	10.52 ± 0.98*§§#
PCB47/77	12.83 ± 0.82	5.28 ± 0.22*	7.17 ± 0.62*§

Mittelwerte ± CL95; n=8; \*p<0.05 vs Kontrolle, §p<0.05 vs PCB47, §p<0.05 vs PCB77 (0.5), #p<0.05 vs PCB47/77; Varianzanalyse mit REGWQ-Test.

#### 2.4.4 Elektrophysiologische Messungen

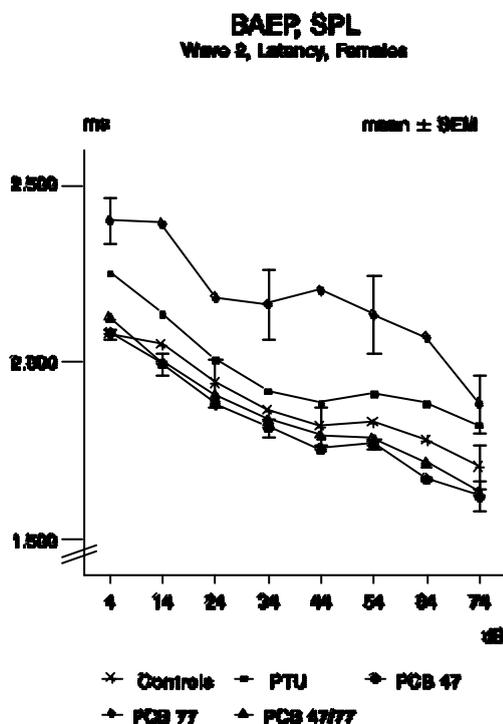


Abb. 1 Latenz der Welle 2 der akustisch evozierten Hirnstammpotentiale (BAEP) bei Variation des Schalldruckpegels (SPL).

Die Auswertung der BAEP ergab vier prominente frühe Wellen im BAEP der Ratte. Bei Variation des SPL ergaben sich bei weiblichen Ratten signifikante Behandlungseffekte für die Latenzen aller Wellen, bei der Reizrate für die ersten drei Wellen und bei der Maskierung für die ersten beiden (Varianzanalyse mit Meßwiederholung; p<0.05). Bei *post hoc*-Vergleichen - hier exemplarisch für die Welle 2 angeführt - zeigte sich bei der SPL-Bedingung, daß die Gruppe mit dem

coplanaren PCB77 sich signifikant von allen anderen Gruppen unterschied (s. Abb. 1). Bei der Reizrate ergaben sich Unterschiede zwischen der PCB77- und der PTU-Gruppe im Vergleich zur Gruppe mit dem ortho-chlorierten PCB47 und auch für die PCB77-Gruppe verglichen mit der kombiniert belasteten Gruppe, die beide PCB-Kongenere erhalten hatte. Bei der Maskierungsbedingung traten Unterschiede hauptsächlich zwischen der PTU-Gruppe und den PCB47-Tieren auf. Die Auswertung der Interpeak-Latenzen 2-4 ergab signifikante Haupteffekte bei der SPL- und der Maskierungsbedingung (p<0.05). Diese waren beim SPL auf die Unterschiede zwischen der PCB77-Gruppe im Vergleich zur PTU-Gruppe und den Kontrollen zurückzuführen, während bei der Maskierung sich die PTU-Gruppe von allen PCB-exponierten Gruppen

unterschied. Bei männlichen Ratten traten signifikante Unterschiede in den absoluten Latenzen aller Wellen fast ausschließlich zwischen PTU-exponierten Tieren und allen anderen Gruppen auf. Die Interpeak-Latenzen waren im Gegensatz zu den Weibchen nicht betroffen.

Beim ERG wurden bei weiblichen Ratten, die maternal mit PCB77 exponiert waren, signifikante Amplitudenverminderungen der B-Welle gegenüber den Kontrollen gefunden. Diese betrafen die skotopische Kennlinie und das Maximale Potential, bei dem verringerte Amplituden auch bei der A-Welle zu beobachten waren. Ferner waren die Amplituden der ersten beiden Wellen der Oszillatorischen Potentiale sowie das ERG bei Flimmerlicht sofort nach Einschalten der Hintergrundbeleuchtung reduziert (s. Abb. 2;  $p < 0.05$ ). Latenzveränderungen traten nur vereinzelt auf. Bei männlichen Ratten fanden sich nur bei einem Parameter PCB-Wirkungen.

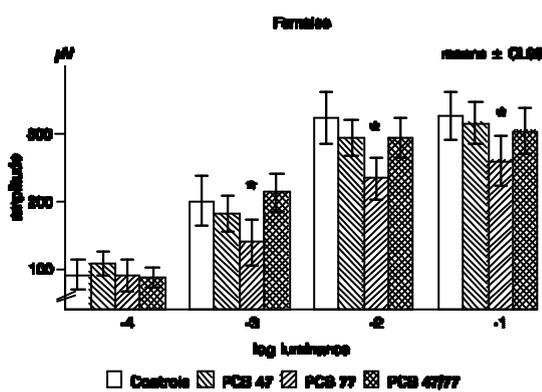


Abb. 2 Amplitude der B-Welle des ERG unter skotopischen Bedingungen.

## 2.4.5 Verhaltenstests

Die Gesamtaktivität im „open field“ war an PND18 und PND80 in allen Gruppen gleich. Dagegen traten bei PND340 signifikant höhere Aktivitätswerte als bei den Kontrollen bei allen belasteten Gruppen auf ( $p < 0.05$ ), die am deutlichsten in der PCB-77-Gruppe waren. Während die Gesamtaktivität in der Säugephase und im frühen adulten Stadium gleich war, gab es jedoch Unterschiede bei der Aktivitätsverteilung: Ratten, die das coplanare PCB77 bekommen hatten, bewegten sich signifikant weniger in der ansonsten bevorzugten äußeren Zone des „open field“ als die Kontrollen. In der Säugephase traf dies nur für die Gruppe zu, die allein mit PCB77 belastet war.

Bei der passiven Vermeidung ergaben sich signifikante Unterschiede (Varianzanalyse mit Meßwiederholung,  $p < 0.05$ ), die auf Beeinträchtigungen beim ersten Meßzeitpunkt, 5 min nach dem Trainings-trial, in den Gruppen zurückzuführen sind, die das coplanare Kongener erhalten hatten (PCB77 und PCB47/77). (Abb. 3).

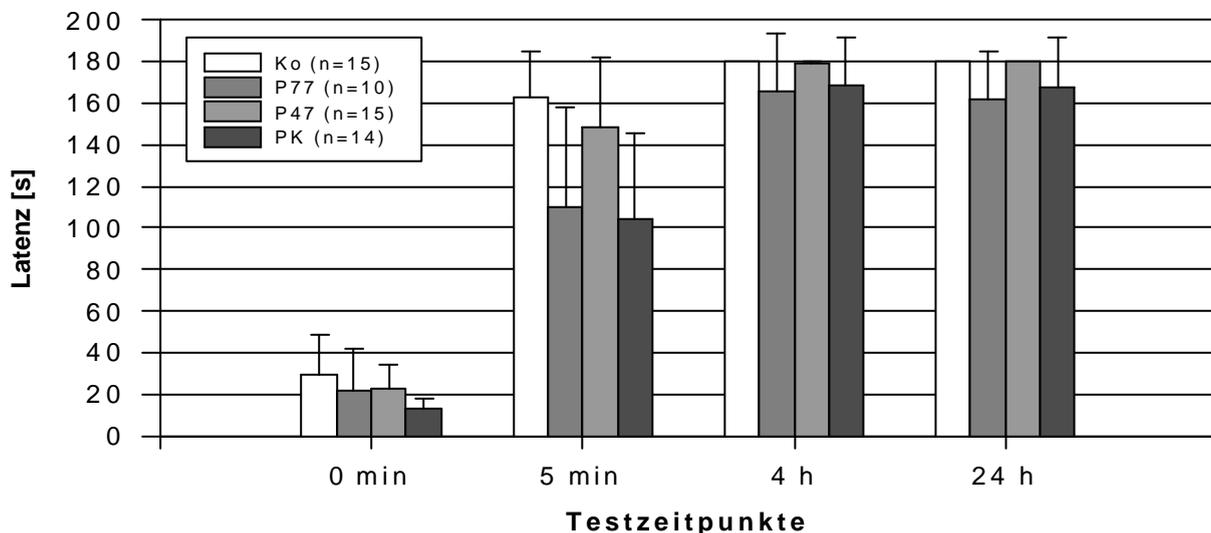


Abbildung 3: Ergebnisse der passiven Vermeidung (Mittel  $\pm$  CL95). Ko - Kontrollgruppe, P77 - Gruppe mit PCB77, P47 - Gruppe mit PCB47, PK - PCB47/77 Kombinationsgruppe.

Das Geschmacksaversionslernen (Abb.4) ergab eine signifikant verringerte Saccharin-Aversion in den Gruppen, die maternal PCB77 erhalten hatten, entweder allein oder in Kombination mit PCB47 ( $p < 0.05$ ).

### Saccharin Aversion

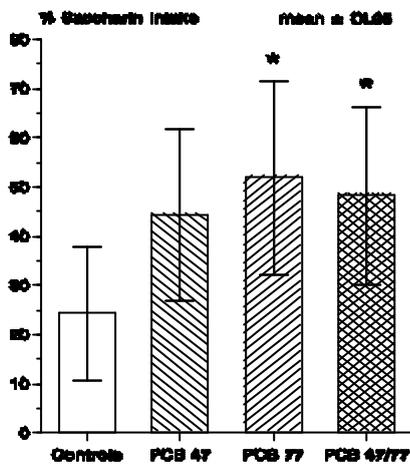
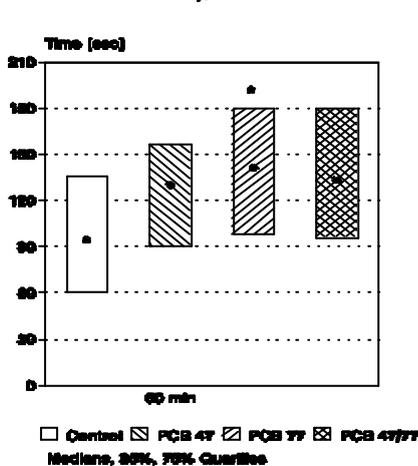


Abb. 4 Geschmacksaversionslernen

### Catalepsy - Test



In Abb. 5 sind die Ergebnisse des Katalepsietests für das Gitter nach 60 min dargestellt. Es ergab sich eine signifikante Verlängerung der Latenzzeit in der Gruppe mit dem PCB77 im Vergleich zu Kontrollen ( $p < 0.05$ ) sowie einen statistischen Trend für die kombiniert belastete Gruppe ( $p < 0.08$ ). Die Interaktion zwischen PCB47 und PCB77 war nicht signifikant.

Abb. 5: Ergebnisse des Katalepsie-Tests.

In der Untersuchung des räumlichen Lernens im Radiallabyrinth brauchten die Tiere der PCB77-Gruppe an den ersten Versuchstagen weniger Zeit als die Kontrollen, um alle acht Pellets zu finden. Ferner wählten die Ratten dieser Gruppe häufiger Winkel von  $45^\circ$  als die anderen Gruppen. Es gab keine Unterschiede beim eigentlichen Lernen, gemessen an der Fehlerzahl und an der Anzahl der Gänge vor dem ersten Fehler. Auch beim Wiederlernen der Aufgabe 4 Wochen nach Ende der ersten Lernphase zeigten sich keine Unterschiede.

## 2.5 Schlußfolgerungen

Die Bestimmung der inneren Exposition mit PCB im Gehirn und Fettgewebe bestätigte das unterschiedliche Verhalten des ortho-chlorierten PCB47 im Vergleich zum coplanaren PCB77. PCB47 hat bei Ratten mit ca. 9 Tagen eine etwa dreifach längere Halbwertszeit als PCB77. Dementsprechend sind alle Konzentrationen von PCB47 in beiden Geweben sowohl bei Müttern wie Nachkommen höher. Am deutlichsten ist der Unterschied bei den Nachkommen am Ende der Säugephase. Das Verhältnis der Konzentrationen von Nachkommen zu Müttern ist aber an GD19 bei PCB77 größer als bei PCB47, sodaß während der pränatalen Phase ein relativ höherer Anteil von PCB77 zu den Jungtieren transferiert wird als von PCB47.

Die Erhöhung der DOPAC-Konzentrationen sowie die Veränderungen im Umsatz von Dopamin und Serotonin sind im Einklang mit früheren Arbeiten, die funktionell auf der Verhaltensebene eine veränderte Sensitivität gegenüber dem Serotonin-Agonisten und Dopamin-Antagonisten Buspiron zeigten (LILIENTHAL et al. 1997).

Bei den Schilddrüsenhormonen ergaben sich dosisabhängige Erniedrigungen vor allem durch PCB77, bei  $FT_3$  aber auch durch PCB47. Erniedrigte Schilddrüsenhormonspiegel können gleichartige Wirkungen wie eine PCB-Belastung auf das sich entwickelnde Nervensystem ausüben. Dies wurde in Untersuchungen der Hörschwellen nach Belastung mit einem technischen PCB-Gemisch (GOLDEY et al. 1995b) und in verhaltenspharmakologischen Versuchen gezeigt (LILIENTHAL et al. 1997). Aber nicht alle PCB-induzierten neuronalen Wirkungen lassen sich durch derartige Wirkungen erklären, da es bei Verhaltensweisen, die vom medialen präfrontalen Cortex abhängen (SCHANTZ et al. 1995) sowie bei neurochemischen Untersuchungen (ROTH-HÄRER et al., in Vorbereitung) zu Dissoziationen zwischen den neuronalen und den Hormonwirkungen kam.

Im BAEP ergaben sich bei weiblichen Ratten deutliche Wirkungen der Belastung mit dem PCB77 auf die absoluten Latenzen, insbesondere bei Variation des SPL. Während bei den Absolutlatenzen zum Teil ähnliche Veränderungen nach maternaler Belastung mit PCB77 und PTU zu beobachten waren, unterschied sich bei den Interpeak-Latenzen die PCB77-Gruppe deutlich von den PTU-behandelten Ratten. Somit werden die Befunde von GOLDEY et al. (1995a und b), die ähnliche

Veränderungen nach Exposition mit PTU und einem technischen PCB-Gemisch auf Hörschwellen und die akustische Schreckreaktion gefunden hatte, nur zum Teil gestützt. Die Möglichkeit einer Beeinflussung der genannten Parameter über einen anderen Mechanismus als der Wirkung über die Schilddrüsenhormone während der neuronalen Entwicklung verdient weitere Beachtung. PTU-bedingte Gruppenunterschiede traten im wesentlichen bei den absoluten Latenzen auch der Welle I auf, während unter Belastung mit PCB77 auch bei den Interpeak-Latenzen Unterschiede zu sehen waren. Somit sind die PCB-induzierten Veränderungen im BAEP vermutlich cochleären und neuronalen Ursprungs; dagegen sind nach PTU-Belastung während der Entwicklung die cochleären Wirkungen ausgeprägter.

Die Erniedrigung der Amplitude der BWelle im ERG war bei weiblichen Ratten mit maternaler Exposition mit PCB77 signifikant gegenüber den Kontrollen unter mehreren Ableitbedingungen während der Dunkeladaptation. Nach unserer Kenntnis ist dies der erste Befund geschlechtsspezifischer Veränderungen in der Retina nach pharmakologischen oder toxikologischen Behandlungen. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Veränderungen ist noch ungeklärt. Jedoch ist bekannt, daß die Retina wie auch das ZNS generell Progesteron und weitere Neurosteroiden bilden kann (GUARNERI et al. 1994 und 1995). Ein möglicher Mechanismus wäre demnach, eine geschlechtsspezifische Störung der Neurosteroidbalance und somit auch der Erregbarkeit der Retina durch die Exposition in der Frühentwicklung.

Alle diese Wirkungen wurden bei erniedrigten Körpergewichten der PCB77-Gruppe in den frühen Entwicklungsstadien beobachtet. Da diese jedoch beide Geschlechter in ähnlichem Ausmaß betraf, die Veränderungen im BAEP und insbesondere im ERG jedoch vor allem bei weiblichen Ratten zu beobachten waren, lassen sich diese elektrophysiologischen Wirkungen nicht einfach als Folge der Gewichtsreduktionen erklären. Ferner lassen sich die Wirkungen nicht auf die Gesamtdosis von PCB zurückführen, da diese in allen PCB-belasteten Gruppen gleich war.

Die Ergebnisse des Katalepsietests bestätigen frühere Untersuchungen einer Verlängerung der Latenzzeiten bis zum Bewegungsbeginn nach maternaler Belastung von Ratten mit PCB77 (WEINAND-HÄRER et al. 1997). Ähnliche Veränderungen wie in der mit PCB77-belasteten Gruppe traten bei den kombiniert exponierten Tieren auf. Die zusätzliche Exposition gegenüber PCB47 bei

kombiniert belasteten Ratten ergab keine signifikante Interaktion, d.h. sie führte demnach zu keiner Wirkungsänderung. Die Lernversuche ergaben keine Änderung im Radiallabyrinth bei den behandelten Ratten, wohl aber beim Geschmacksaversionslernen. Hier waren vor allem die PCB77-Gruppe und die kombiniert belastete Gruppe betroffen. Im Zusammenhang mit früheren Ergebnissen zum passiven Vermeidungslernen (WEINAND-HÄRER et al. 1997) sowie zum räumlichen Lernen im Morris-Wasserbecken und zur Langzeitpotenzierung in verschiedenen Hirnregionen (ALTMANN et al. 1995) deutet dies eher auf eine Beeinträchtigung der Amygdala als des Hippocampus hin. Auch bei der Geschmacks-aversion gab es keine Hinweise auf mögliche Interaktionen bei der kombinierten Belastung.

## **3. Experiment II**

### **3.1 Fragestellung**

Im Gegensatz zum Experiment I, in dem eine einfache Kombination aus einem ortho-chlorierten und einem coplanaren PCB-Kongener untersucht wurde, sollte im anschließenden Versuch ein PCB-Gemisch geprüft werden, das nach dem Muster der in Muttermilch vorhandenen Kongenere zusammengesetzt war. Die neuro- und verhaltenstoxischen Wirkungen einer Belastung mit diesem rekonstituierten Gemisch während der neuronalen Entwicklung sollten mit denen eines technischen Gemisches verglichen werden. Entsprechend den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente lag in diesem Versuchsteil der Schwerpunkt auf der Prüfung der Katalepsie sowie der emotionalen Komponenten des Verhaltens.

### **3.2 Methoden**

#### **3.2.1 Tiere und Exposition**

Weibliche Ratten (Long Evans) erhielten Futter, das 40 mg des rekonstituierten Gemisches (G-Gruppe) oder des technischen Gemisches Aroclor 1254 (A-Gruppe) pro kg Futter enthielt. Für ein Tier mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g und einem Futtermittelverbrauch von 20g pro Tag entspricht dies einer täglichen PCB-Zufuhr von 4 mg /kg KG. Die Konzentrationen im Futter wurden analytisch überprüft. Die Abweichungen vom angestrebten Wert waren geringer als 1%.

Kontrollen erhielten Futter, das nur das Vehikel (Olivenöl) enthielt. Die Exposition begann 50 Tage vor der Verpaarung und dauerte bis zur Geburt der Nachkommen.

Die Zusammensetzung des rekonstituierten Gemisches findet sich in Tabelle 7. Es wurde nach den Ergebnissen einer Reihe von Untersuchungen zusammengestellt, in denen das Muster der PCB-Kongenere in der Muttermilch analysiert worden war (DUARTE-DAVIDSON et al. 1992, JENSEN 1991, NOREN & LUNDEN 1991, SAFE et al. 1985, SCHULTE & MALISCH 1984). Die Kriterien der Auswahl der Kongenere für das rekonstituierte Gemisch waren: Nachweis in mindestens drei der fünf Quellen und ein Prozentanteil von mehr als 2% im Mittel. Daraus ergaben sich acht Kongenere (s.u.). Dazu kamen die mono-ortho-chlorierten PCB28 und PCB105 sowie das di-ortho-chlorierte PCB101, die auch häufig in Muttermilch und Fettgewebe nachgewiesen werden. Ferner drei coplanare Kongenere, PCB77, PCB126 und PCB169, deren Mengen nach DEWAILLY et al. (1991) und NOREN & LUNDEN (1991) festgelegt wurden.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des rekonstituierten PCB-Gemisches**

PCB28	PCB101	PCB105	PCB118	PCB138	PCB146	PCB153
177	42	75	219	663	94	828
PCB156	PCB170	PCB180	PCB187	PCB77	PCB126	PCB169
115	222	421	143	53.8	248.4	111.8

Angaben in mg; PCB77, PCB126, PCB169 in µg; Mengen bezogen auf 3 g Gemisch.

An PND0 und PND21 wurde ein Teil der Mütter und Nachkommen zur Blut- und Organentnahme (Gehirn, Leber, perirenales Fett, Uterus) getötet, um die innere Exposition und Hormone zu bestimmen. Bei den Nachkommen erfolgten an PND110 Tötungen zur Präparation von Hirnarealen für die Bestimmung von Neurotransmittern.

### 3.2.2 Neurotransmitterbestimmung

Die Analyse der Neurotransmitter wurde wie unter 2.3.2 beschrieben durchgeführt.

### **3.2.3 Verhaltenstests**

An PND30 und PND90 wurde die lokomotorische Aktivität im „open field“ wie unter 2.3.5 beschrieben bestimmt.

An PND110 erfolgte die Prüfung von ängstlichem Verhalten im Plus-Labyrinth. Dieser Test ist zur Prüfung anxiogener oder anxiolytischer Wirkungen in der Verhaltenspharmakologie etabliert. Dies ist eine Apparatur mit zwei offenen Armen und zwei Armen mit hohen Seitenwänden, die sich gegenseitig überkreuzen. Die absolute und relative Aufenthaltsdauer sowie die Häufigkeit des Betretens der offenen Arme wurden in einem Zeitraum von 10 min pro Tier erfaßt.

An PND120 wurde die passive Vermeidung wie unter 2.3.5 beschrieben gemessen. Die Testung der Haloperidol-induzierten Katalepsie wurde an PND140 wie unter 2.3.5 dargestellt durchgeführt. Die einzige Veränderung war, daß anstelle des Blocks ein Lochbrett benutzt wurde, in das die Ratten mit allen vier Beinen eingesetzt wurden. Es wurde die Zeit bis zum Aufstellen eines Vorder- und eines Hinterbeins auf das Brett bestimmt.

## **3.3 Ergebnisse**

### **3.3.1 Verhaltenstests**

Die Bestimmung der lokomotorischen Aktivität an PND90 ergab keine Veränderung der Gesamtaktivität im „open field“. Dagegen war die Verteilung der Aktivität auf die äußere und innere Zone je nach Belastungsgruppe verschieden: Die Kontrollratten wiesen eine signifikant höhere prozentuale Aufenthaltsdauer in der inneren Zone auf als beide PCB-belasteten Gruppen ( $p < .05$ ; Abb.6). Der zurückgelegte Weg in der inneren Zone war bei den Kontrollen gleichfalls signifikant höher ( $p < .05$ ).

## Aktivitätsmessung Aufenthaltsdauer in innerer Zone

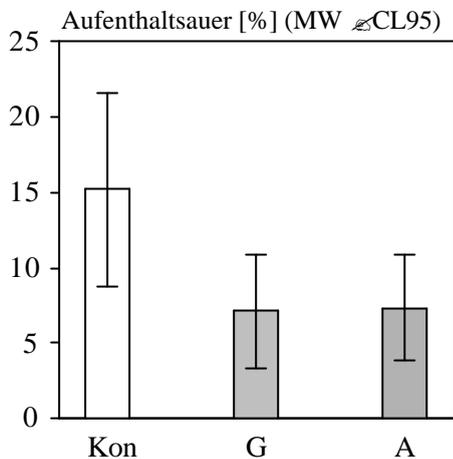


Abb.6: Aktivität im „open field“.

Kon - Kontrolle, G - rekonstituiertes PCB-Gemisch, A - Aroclor 1254, n=12.

Im Plus-Labyrinth unterschied sich die Häufigkeit des Betretens der offenen Arme sowie die Aufenthaltsdauer in diesen Armen nicht zwischen den Gruppen. Jedoch war die mittlere Aufenthaltsdauer pro Besuch der offenen Arme bei den mit dem rekonstituierten Gemisch belasteten Ratten (G-Gruppe) signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht ( $p < .05$ ). Die Veränderungen in der Aroclor-Gruppe waren dagegen nicht signifikant (Abb.7).

## Plus - Labyrinth

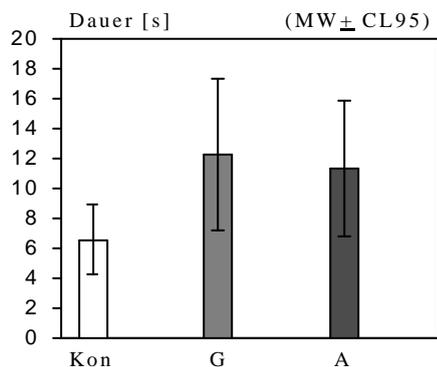


Abb.7 Mittlere Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des Plus-Labyrinths. Kon - Kontrolle, G - rekonstituiertes Gemisch, A - Aroclor 1254.

Bei der passiven Vermeidung traten bei der ersten Messung nach dem Konditionierungs-durchgang längere Latenzzeiten in beiden belasteten Gruppen auf. Diese Unterschiede zu den Kontrollen erreichten aber nicht die statistische Signifikanz.

Beim Katalepsie-Test waren 30 min nach Haloperidol-Injektion die Latenzen an der Stange in der G-Gruppe signifikant gegenüber den Kontrollen verlängert, während nach 60 min die A-Gruppe signifikante Verlängerungen aufwies ( $p < .05$ ; Abb.8).

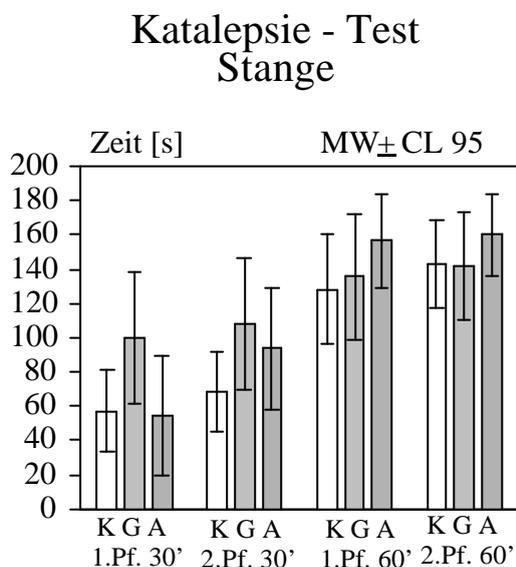


Abb.8: Katalepsie-Test, Latenz bis zum Bewegungsbeginn, K - Kontrolle, G - rekonstituiertes PCB-Gemisch, A - Aroclor 1254, 1.Pf. - Latenz für die erste Pfote, 2.Pf. - Latenz für die zweite Pfote.

### 3.4 Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse der Verhaltenstests mit dem rekonstituierten PCB-Gemisch bestätigen die Annahme, daß nach PCB-Belastung im wesentlichen die emotionalen Komponenten des Verhaltens verändert sind. Unterschiede zwischen den Gruppen fanden sich in der Aktivitätsverteilung im „open field“ und im Plus-Labyrinth. Im „open field“ waren im Gegensatz zur Exposition mit dem coplanaren PCB77 die mit dem rekonstituierten oder technischen Gemisch behandelten Ratten ängstlicher als die Kontrollen. Auch die tendenziellen Veränderungen bei der passiven Vermeidung deuten auf eher ängstlichere Reaktionen in den PCB-Gruppen hin. Da beide Gemische überwiegend ortho-chlorierte Kongenere enthalten, deutet sich hier eine unterschiedliche Wirkung beider Kongenerklassen hinsichtlich der Richtung der Wirkung an. Ähnliche Unterschiede sind auch für die neurochemischen Wirkungen in bestimmten Hirnarealen beschrieben worden (SEEGAL et al. 1997). Die abweichenden

Ergebnisse im Plus-Labyrinth, in dem die behandelten Ratten längere Zeiten pro Besuch eines offenen Armes im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen, also eher weniger ängstlich reagierten, sind im Einklang mit Unterschieden in der pharmakologischen Beeinflussbarkeit des Verhaltens im Plus-Labyrinth verglichen mit anderen Angstmodellen. So sind im Plus-Labyrinth nur Benzodiazepine, nicht aber atypische Anxiolytika wie Agonisten des Serotonin-1A-Rezeptors wirksam. Deshalb sollte eine mögliche GABAerge Wirkung der PCB-Belastung geprüft werden.

Die Ergebnisse des Katalepsie-Tests bestätigen frühere Ergebnisse zur PCB-Wirkung in diesem Test. Konsistente Veränderungen wurden unter verschiedenen Belastungsbedingungen und unterschiedlichen PCB-Kongeneren gefunden. Ihnen liegen vermutlich Veränderungen in der Interaktion zwischen dopaminergen und serotonergen Mechanismen zugrunde, die beide die Ergebnisse dieses Tests beeinflussen (WADENBERG 1996). Dies bestätigt frühere Experimente, die ähnliche Veränderungen im Substanz-Diskriminationslernen bei Ratten nach PCB-Exposition aufzeigten (LILIENTHAL et al. 1997).

Auffallend beim Vergleich des rekonstituierten mit dem technischen PCB-Gemisch Aroclor 1254 war, daß die Wirkungen beider Gemische auf das Verhalten in diesen Versuchsmodellen relativ ähnlich sind. Anders stellt sich die Situation in den Wirkungen auf Steroidhormone und deren Funktionen dar, die gegenwärtig in unserem Labor untersucht werden. Dabei verursacht das rekonstituierte Gemisch deutlichere Veränderungen.

Zusammenfassend läßt sich anhand dieser Ergebnisse feststellen, daß eine Belastung mit PCB während der prä- und frühen postnatalen Entwicklung der Ratte zu lang anhaltenden Veränderungen im Nervensystem und Verhalten führt. Es konnte gezeigt werden: 1) Daß bei der Kombination eines coplanaren mit einem ortho-chlorierten PCB die Wirkungen bei der gewählten Dosis fast ausschließlich von dem coplanaren Kongener ausgehen. 2) Zum ersten Mal konnten Störungen des visuellen Systems, die in Japan bei Yusho-Patienten beobachtet waren, experimentell nachgewiesen werden. 3) Ferner ergibt sich aus dem Muster der Verhaltensänderungen, welche Hirnareale durch PCB-Exposition verändert sind (eher die Amygdala als der Hippocampus) und infolgedessen welche Verhaltensbereiche (emotional eher als kognitiv). 4) Darüber hinaus ergaben sowohl neurochemische als auch funktionelle Veränderungen, daß PCB-Exposition das serotonerge System beeinflusst. 5) Ferner ergaben die Untersuchungen, welche neuro- und verhaltenstoxischen Wirkungen durch

Veränderungen der Schilddrüsenhormonspiegel während der neuronalen Entwicklung bedingt sein könnten. 6) Weiter liegen jetzt auch Daten zum Vergleich eines rekonstituierten PCB-Gemisches mit einem technischen Gemisch im Hinblick auf neuronale Wirkungen vor.

Ein Vergleich der inneren Belastungen des Menschen mit den Gewebkonzentrationen der Ratten ist für das Experiment mit der einfachen Kombination aus zwei Kongeneren schwierig, da das Muster der PCB-Kongeneren in menschlichem Fettgewebe bekanntermaßen komplex ist. Außerdem sind die Gewebkonzentrationen im Gehirn des Menschen nicht zugänglich. Ein Vergleich kann daher nur versuchsweise und unter Vorbehalt bei folgenden Annahmen erfolgen, (I) daß die lipidbezogene Konzentration in Muttermilch der lipidbezogenen Konzentration im Fettgewebe entspricht, (II) daß das Verhältnis zwischen den Konzentrationen im Nervensystem und Fettgewebe bei Mensch und Ratte gleich ist und (III) daß ein ähnliches Verhältnis von mütterlichen Belastungen zu denen der Nachkommen bei Mensch und Ratte besteht. In der Kombinationsgruppe war eine Konzentration von 20 µg/g Fett (Wert am Ende der Behandlungsphase) wirksam. Nach neuesten Untersuchungen an menschlichen Säuglingen aus Nordrhein-Westfalen beträgt die Konzentration in der Muttermilch im Mittel 0,424 µg/g Fett (Spannweite: 0,097-1,011 µg/kg Fett). Dies ergibt einen Faktor von <50 für das Verhältnis der experimentellen Belastung zur Humanexposition. Genauere Aussagen lassen sich erst treffen, wenn die entsprechenden inneren Belastungswerte für das rekonstituierte Gemisch vorliegen.

## 4 Literatur

ALTMANN, L., WEINAND-HÄRER, A., LILIENTHAL, H., WIEGAND, H: (1995): Maternal exposure to polychlorinated biphenyls inhibits long-term potentiation in the visual cortex of adult rats. *Neurosci. Lett.* **202**, 53-56.

BROUWER, A. & K.J. VAN DEN BERG (1986): Binding of a metabolite of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **85**, 301 - 312.

BUBSER, M. & W.J. SCHMIDT (1990): 6-Hydroxydopamine lesion of rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impairs acquisition of delayed alternation tasks, but does not affect uninterrupted tasks in the radial maze. *Behav. Brain Res.* **37**, 157-168.

DEWAILLY, E., WEBER, J.P., GINGRAS, S., LALIBERTE, C. (1991): Coplanar PCBs in human milk in the province of Quebec, Canada: Are they more toxic than dioxin for breast fed infants? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 491-498.

- DUARTE-DAVIDSON; R., HARRAD, S.J., ALLEN, S.C., JONES, K.C. (1992): The relative contribution of individual PCBs, PCDDs, and PCDFs to toxic equivalent values derived from bulked human breast milk samples from the UK. *Chemosphere* **25**, 1653-1663.
- GOLDEY, E.S., KEHN, L.S., REHBERG, G.L., CROFTON, K.M. (1995a): Effects of developmental hypothyroidism on auditory and motor function in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **135**, 67 - 76.
- GOLDEY, E.S., KEHN, L.S., LAU, C., REHBERG, G.L., CROFTON, K.M. (1995b): Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **135**, 77 - 88.
- GUARNERI, P., GUARNERI, R.; CASCIO, C., PAVASANT, P., PICCOLI, F., PAPADOPOULOS, V. (1994): Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J. Neurochem.* **63**, 86-96.
- GUARNERI, P., GUARNERI, R.; CASCIO, C., PICCOLI, F., PAPADOPOULOS, V. (1995):  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A/benzodiazepine receptors regulate rat retina neurosteroidogenesis. *Brain Res.* **683**, 65-72.
- JACOBSON, S.W., FEIN, G.G., JACOBSON, J.L., SCHWARTZ, P.M., DOWLER, J.K. (1985): The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Developm.* **56**, 853 - 860.
- JENSEN, A.A. (1991): Levels and trends of environmental chemicals in human milk. In: JENSEN, A.A., SLORACH, S.A. (Hrsg.) *Chemical Contaminants in Human Milk*. CRC Press, S. 45-198
- KIHLSTRÖM, J.E., OLSSON, M., JENSEN, S., JOHANSSON, A., AHLBOM, J., BERGMAN, A. (1992): Effects of PCB and different fractions of PCB on the reproduction of the mink (*Mustela vison*). *Ambio* **21**, 563 - 569.
- KURATSUNE, M., YOSHIMURA, T., MATSUZAKA, J., YAMAGUCHI, A. (1972): Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Persp.* **1**, 119-128.
- LAVOND, D.G., KIM, J.J., THOMPSON, R.F. (1993): Mammalian brain substrates of aversive classical conditioning. *Annu. Rev. Psychol.* **44**, 317 - 342.
- LILIENTHAL, H., WEINAND-HÄRER, A., WINTERHOFF, H., WINNEKE, G. (1997): Effects of maternal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl or propylthiouracil in rats trained to discriminate apomorphine from saline. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146**, 162-169.
- LILIENTHAL, H., KOHLER, K., TURFELD, M., WINNEKE, G. (1994): Persistent increases in scotopic b-wave amplitudes after lead exposure in monkeys. *Exp. Eye Res.* **59**, 203-209.
- LILIENTHAL, H., NEUF, M., MUNOZ, C., WINNEKE, G. (1990): Behavioral effects of pre- and postnatal exposure to a mixture of low chlorinated PCBs in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* **15**, 457-467.
- LILIENTHAL, H. & G. WINNEKE (1996): Lead effects on the brainstem auditory evoked potential in monkeys during and after the treatment phase. *Neurotoxicol. Teratol.* **18**, 17-32.
- LILIENTHAL, H. & G. WINNEKE (1991): Sensitive periods for behavioral toxicity of polychlorinated biphenyls: Determination by cross-fostering in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* **17**, 368 - 375.
- MUNOZ, C., GARBE, K., LILIENTHAL, H., WINNEKE, G. (1988): Significance of hippocampal dysfunction in low level lead exposure of rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **10**, 245-253
- NOREN, K., LUNDEN, A. (1991): Trend studies of polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in human milk. *Chemosphere* **23**, 1895-1901.
- PARKINSON, A., ROBERTSON, L.W., SAFE, S. (1980): Reconstituted human breast milk PCBs as potent inducers of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 882 - 889.

- ROGAN, W.J., GLADEN, B.C., MCKINNEY, J.D., CARRERAS, N., HARDY, P., THULLEN, J., TINGLESTAD, J., TULLY, M. (1986): Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE. *J. Pediatr.* **109**, 335 - 341.
- SAFE, S., SAFE, L., MULLIN, M. (1985): Polychlorinated biphenyls: Congener-specific analysis of a commercial mixture and a human milk extract. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 24-29.
- SARGENT, L., ROLOFF, B., MEISNER, L. (1989): In vitro chromosome damage due to PCB interactions. *Mutat. Res.* **224**, 79 - 88.
- SARGENT, L., SATTLER, G.L., ROLOFF, B., XU, Y.H., SATTLER, C.A., MEISNER, L., PITOT, H.C. (1992): Ploidy and specific karyotypic changes during promotion with phenobarbital, 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl, and/or 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rat liver. *Cancer Res.* **52**, 955 - 962.
- SCHULTE, E., MALISCH, R. (1984): Calculation of the real PCB content in environmental samples. II. Gas chromatographic determination of the PCB concentration in human milk and butter. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **314**, 54-59.
- SEEGAL, R.F., BROSCHE, K.O., OKONIEWSKI, R.J. (1997). Effects of *in utero* and lactational exposure of the laboratory rat to 2,4,2',4'- and 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl on dopamine function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146**, 95-103.
- SHAIN, W., BUSH, B., SEEGAL, R. (1991): Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls: Structure-activity relationship of individual congeners. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **111**, 33 - 42.
- WADENBERG, M.-L. (1996): Serotonergic mechanisms in neuroleptic-induced catalepsy in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **20**, 325-339.
- WEINAND-HÄRER, A., LILIENTHAL, H., WINNEKE, G. (1997): Behavioral effects of prenatal exposure to an ortho-chlorinated or a coplanar PCB congener in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **3**, 97-103.