

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

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

von

H. Lilienthal, J. Hany, H. Kaya, A. Fastabend, A. Roth-Härer, G. Winneke

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

in Kooperation mit

Alexander Sarasin und Walter Lichtensteiger, Universität Zürich

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

Förderkennzeichen: PUG U 97 004

Juni 1999

WIRKUNG DER KOMBINIERTEN BELASTUNG MIT AUSGEWÄHLTEN PCB-KONGENEREN AUF SPEZIFISCHE VERHALTENSWEISEN, NEUROTRANSMITTER IM GEHIRN UND SCHILDDRÜSENHORMONE BEI DER RATTE

H. Lilienthal, J. Hany, H. Kaya, A. Fastabend, A. Roth-Härer, G. Winneke

Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf

Zusammenfassung

Zweck der Untersuchung war, ein technisches PCB-Gemisch (Aroclor 1254) mit einem Gemisch zu vergleichen, das nach dem Muster der in Muttermilch vorhandenen PCB-Kongeneren rekonstituiert wurde und dann für das rekonstituierte Gemisch eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu erstellen. Bei den Experimenten standen Einflüsse auf die geschlechtsspezifische Differenzierung des Gehirns und des Verhaltens nach maternaler Belastung im Vordergrund. Dabei ergaben sich im ersten Teil deutlichere Wirkungen des rekonstituierten PCB-Gemisches auf die Aromatase-Aktivität (CYP19) im Hypothalamus neugeborener Rattenmännchen und die Süßpräferenz im adulten Stadium, die beide für anti-androgene Wirkungen sprechen. Diese wurden begleitet von verminderten Hodengewichten und reduzierten Testosteron-Spiegeln im Serum adulter Rattenböcke. In Übereinstimmung damit fanden sich im zweiten Teil ein erniedrigtes Prostatagewicht und eine erhöhte Süßpräferenz in den beiden höheren Dosierungsstufen (20 und 40 mg/kg Futter). Bei der höchsten Belastung war zudem die Wirkung von Testosteron in der Platzpräferenz ausgeprägt. Besonders sensitiv sprachen auf die Belastung die Serumkonzentration des Steroidhormons 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ und im Verhalten die passive Vermeidung an, bei denen schon in der niedrigsten Expositionsgruppe (5 mg/kg Futter) signifikante Veränderungen auftraten. Beim Vergleich der inneren Belastung mit PCB ergibt sich ein Sicherheitsfaktor von etwa 20 im Mittel für diese Wirkungen, der aber am oberen Rand der Verteilung nur etwa 10 beträgt. Da der NOEL demnach bei noch geringeren Belastungen liegt, nähert er sich dem Bereich der gegenwärtigen Exposition beim Menschen.

EFFECTS OF COMBINED EXPOSURE TO SELECTED PCB CONGENERS ON BEHAVIOR, NEUROTRANSMITTERS IN THE BRAIN, AND THYROID HORMONES IN RATS

H. Lilienthal, J. Hany, H. Kaya, A. Fastabend, A. Roth-Härer, G. Winneke

Summary

The aim of this study was 1) to compare a technical mixture of PCBs (Aroclor 1254) with a mixture reconstituted according to the congener pattern found in breast milk and 2) to describe the dose-response relation for the reconstituted mixture. In particular, effects on sex-specific differentiation of the brain and behavior following maternal exposure were examined. In the first part, effects on the activity of aromatase (CYP19) in the hypothalamus of newborn male offspring and on saccharin preference in adult males were more pronounced after maternal exposure to the reconstituted mixture, suggesting anti-androgenic actions of PCBs. In addition, testes weights and testosterone concentration

in the serum were reduced in adult male offspring. In general accordance with this, decreased prostata weights and elevated saccharin preference were detected in both of the higher exposed groups (20 and 40 mg/g diet). At the highest exposure level, affective properties of testosterone were also found in a place preference test. The level of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ and passive avoidance behavior were found to be particularly sensitive to PCB exposure as effects on these variables were detected in the lowest exposure group (5 mg/kg diet). In comparison to the internal exposure values in human beings, the safety factor is about 20 considering these effects, but only about 10 for persons in the upper range of the distribution. As a consequence, the NOEL can be found at even lower levels. Thus, it approaches the range of recent human exposure.

1 Einleitung

Sowohl epidemiologische Befunde an Kindern als auch experimentelle Ergebnisse an Ratten sprechen für eine besondere Sensitivität des sich entwickelnden Nervensystems gegenüber PCB-Belastung (ROGAN et al. 1986; LILIENTHAL et al. 1991). Als mögliche Mechanismen für PCB-Wirkungen auf das ZNS wurden Veränderungen im Dopaminhaushalt (SEEGAL 1996) durch ortho-chlorierte Kongenere sowie Einflüsse auf Schilddrüsenhormone durch coplanare PCB genannt (BROUWER 1991), da Schilddrüsenhormone als Regulatoren der neuronalen Entwicklung wirken (PORTERFIELD & HENDRICH 1993). Der Vergleich eines coplanaren PCB mit einem Thyreostatikum als Positivkontrolle ergab unterschiedliche Wirkungen beider Behandlungen auf Neurotransmitter in verschiedenen Gehirnbereichen (WEINAND-HÄRER et al. 1994), aber ähnliche Effekte im Substanz-Diskriminationslernen, das rezeptorvermittelte Prozesse funktionell auf der Verhaltensebene prüft (LILIENTHAL et al. 1997). Dabei zeigte sich, daß serotonerge Prozesse oder die Interaktion zwischen serotonergen und dopaminergen Vorgängen deutlicher durch die Belastung verändert sind als die rein dopaminergen Funktionen. Dies stimmt mit Ergebnissen zum Serotoninumsatz nach PCB-Exposition während der Entwicklung (MORSE et al. 1995) und bei akuter Belastung mit TCDD (UNKILA et al. 1995) überein.

Darüber hinaus traten Wirkungen auf die verzögerte räumliche Alternation nach maternaler Exposition mit mono- und di-ortho-chlorierten PCB-Kongeneren nur bei weiblichen Ratten auf (SCHANTZ et al. 1995). Geschlechtsspezifische Beeinträchtigungen wurden auch im Elektretinogramm bei adulten Ratten nach maternaler Belastung mit einem coplanaren PCB beobachtet (KREMER et al. 1998). Ferner induzierte das coplanare PCB bei Geschwistern dieser Tiere Unterschiede in einem Verhaltenstest, bei dem Estradiol als aversiver Reiz eingesetzt wurde (LILIENTHAL et al. 1997).

Eine Beeinflussung östrogenabhängiger Prozesse durch PCB und verwandte Verbindungen wie 2,3,7,8-TCDD ist wiederholt aufgezeigt worden (SAFE 1995; NESARETNAM et al. 1996). Veränderte Spiegel von Östrogenen und Progesteron und Wirkungen auf die Östrogenrezeptor-mRNA wurden bei mehreren Spezies und in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben gefunden (CHAFFIN et al. 1996; LUNDKVIST et al. 1987; PATNODE & CURTIS 1994). PCB und andere chlorierte Kohlenwasserstoffe reduzieren auch die Rezeptorbindung von Progesteron im Endometrium des Kaninchenuterus (LUNDHOLM 1988). Außerdem ist nach Belastung mit TCDD während der Entwicklung eine Demaskulinisierung und Feminisierung

des Verhaltens männlicher Ratten beobachtet worden (BJERKE et al. 1994; MABLY et al. 1992).

Eine PCB-induzierte Veränderung der Steroidspiegel hat möglicherweise Auswirkungen auf die Funktion des Nervensystems. In der neueren Literatur häufen sich Befunde zur Bedeutung von Gonadalsteroiden bei der neuronalen Entwicklung und Regeneration (Zus. bei McEWEN 1992, 1994; SCHUHMACHER et al. 1996), bei der Protektion von Nervenzellen gegenüber toxischen Einflüssen (z.B. SINGER et al. 1996), bei der Neurotransmitterfreisetzung (SMITH 1994) sowie bei neuronalen Plastizitätsvorgängen (WARREN et al. 1995). Rezeptoren für Gonadalsteroidoide und Wirkungen dieser Steroide wurden gerade auch außerhalb der Kerne gefunden, die klassischerweise mit dem Sexualverhalten in Verbindung gebracht werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war deshalb, die Wirkung von PCB-Exposition während der Entwicklung auf die sexuelle Differenzierung des Gehirns, auf Hormonspiegel und geschlechtsspezifisches Verhalten zu prüfen.

2 Experiment I

2.1 Fragestellung

In den bisherigen Arbeiten zur Wirkung von PCB während der Entwicklung sind fast ausschließlich technische Gemische oder Einzelkongenere geprüft worden. Beides wird der Belastungssituation in der Umwelt nicht gerecht. Deshalb sollte die vorliegende Untersuchung ein technisches PCB-Gemisch (Aroclor 1254) mit einem Gemisch vergleichen, das nach dem Muster der in Muttermilch vorhandenen PCB rekonstituiert war, und die Wirkungen dieser Gemische auf die Konzentrationen von Sexualsteroiden im Serum, auf die sexuelle Differenzierung des Gehirns anhand der Aromatase-Aktivität und bei adulten Ratten geschlechtsspezifisches Verhalten prüfen.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere und Exposition

Weibliche Ratten (Long Evans) erhielten Futter, das 40 mg des rekonstituierten Gemisches (RG-Gruppe) oder des technischen Gemisches Aroclor 1254 (A-Gruppe) pro kg Futter enthielt. 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. Bei einer Ratte von 200 g Körpergewicht und einem durchschnittlichen Futtermittelverbrauch von 20 g/Tag ergibt sich daraus eine tägliche Aufnahme von 4 mg PCB/kg KG. Die Exposition begann 50 Tage vor der Verpaarung und dauerte bis zur Geburt der Nachkommen.

Die Zusammensetzung des rekonstituierten Gemisches findet sich in Tabelle 1. Es wurde nach den Ergebnissen einer Reihe von Untersuchungen zusammengestellt, in denen das Muster der PCB-Kongeneren 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 Kongeneren 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 Kongeneren (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 Kongeneren, PCB77, PCB126 und PCB169, deren Mengen nach DEWAILLY et al. (1991) und NOREN & LUNDEN (1991) festgelegt wurden.

Tabelle 1: 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.

Am Tag der Geburt (postnataler Tag - PND0) und am Tag des Absetzens vom Muttertier (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. Zusätzlich wurden männliche Nachkommen bei Geburt getötet und der Hypothalamus mit der präoptischen Region herauspräpariert und in Flüssigstickstoff schockgefroren, um die Aromatase-Aktivität zu bestimmen. Bei den Nachkommen erfolgten an PND110 Tötungen zur Präparation von Hirnarealen für die Bestimmung der Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin und Serotonin sowie ihrer Metabolite.

2.2.2 Bestimmung von Hormonen und der Aromatase-Aktivität (CYP19)

Die Bestimmung der Sexualsteroiden wurde mit kommerziellen ELISA-Kits (DRG) durchgeführt, die für Rattenserum validiert wurden.

Die Bestimmung der Aromatase-Aktivität erfolgte durch Messung triierten Wassers, das bei der Umwandlung von [1α]- ^3H]Androstendion zu Östron gebildet wird.

2.2.3 Verhaltensversuch - Süßpräferenz

Ratten allgemein bevorzugen gesüßte Lösungen, wenn sie die Wahl zwischen diesen Lösungen und normalem Trinkwasser haben. Diese Süßpräferenz ist bei weiblichen Tieren stärker ausgeprägt als bei männlichen (LICHTENSTEIGER & SCHLUMPF 1985). Um geschlechtsspezifische Wirkungen an PCB-exponierten Ratten zu prüfen, erhielten die Tiere im Alter von 180 Tagen eine Flasche mit Trinkwasser und eine andere mit Saccharin-Lösung (0,25%). Der jeweilige Flüssigkeitsverbrauch wurde täglich drei Tage lang bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Innere PCB-Belastung

Daten der inneren PCB-Belastung finden sich zusammengefaßt in Abschnitt 6.1.

3.2 Hormonbestimmungen

Bei den Müttern ergaben sich an PND0 und PND21 kaum Unterschiede der Serumkonzentrationen von Estradiol und Testosteron, obwohl in beiden PCB-Gruppen die Konzentrationen von Östradiol ab- und die von Testosteron an PND0 tendenziell zunahm. Dementsprechend war das Verhältnis Östradiol/Testosteron an PND0 reduziert. Diese Reduktion war in der RG-Gruppe marginal ($p \leq 0.05$, Tab.2).

Bei männlichen Nachkommen war im adulten Stadium an PND170 der Testosteronspiegel im Serum sowohl in der A-Gruppe als auch in der RG-Gruppe deutlich erniedrigt ($p < 0.05$). Die Werte betragen bei den Kontrollen $4,7 \pm 1,6$; in der A-Gruppe $2,0 \pm 0,6$ und in der RG-Gruppe $1,6 \pm 0,7$ ng/ml.

Tabelle 2: Sexualsteroid-Hormone im mütterlichen Serum

	Östradiol (E2)	Testosteron (T)	E2/T
Kontrolle, PND0	10,7 ± 3,3	37,5 ± 9,9	0,285 ± 0,037
A-Gruppe, PND0	6,7 ± 2,3	43,3 ± 10,4	0,169 ± 0,104
RG-Gruppe, PND0	7,1 ± 1,5	49,6 ± 8,5	0,149 ± 0,049*
Kontrolle, PND21	9,2 ± 2,4	60,0 ± 11,7	0,170 ± 0,070
A-Gruppe, PND21	8,0 ± 1,9	55,3 ± 27,1	0,150 ± 0,120
RG-Gruppe, PND21	9,5 ± 2,7	54,7 ± 19,0	0,190 ± 0,060

Werte in pg/ml; Mittel ± SD, n=3/Gruppe bei PND0, n=8/Gruppe bei PND21; *p<0.05 signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

Ebenfalls war die Aromatase-Aktivität im Hypothalamus und der präoptischen Region (HPOA) neugeborener Rattenmännchen in der RG-Gruppe signifikant gegenüber Kontrollen erniedrigt (Abb. 1).

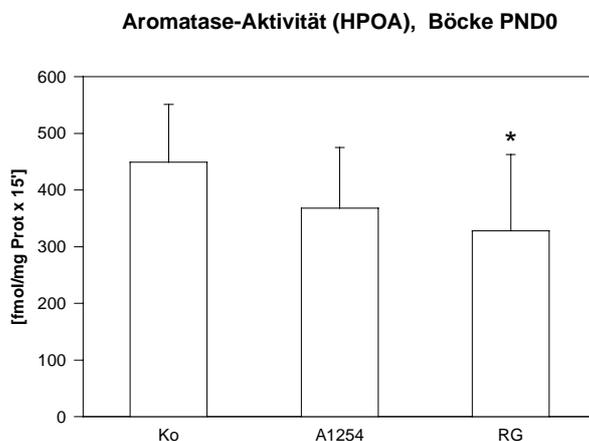


Abb. 1: Aromatase-Aktivität bei Geburt im HPOA männlicher Nachkommen. Ko- Kontrollen; A1254 - Aroclor-Gruppe; RG - rekonstituiertes Gemisch (*p<0.05; n=8).

3.3 Organgewichte

Das relative Uterusgewicht war bei präpubertären Weibchen der RG-Gruppe zum Zeitpunkt der Separation vom Muttertier (PND21) signifikant erhöht (Abb.2, links). Dagegen war das relative Hodengewicht bei männlichen Nachkommen an PND170 in beiden Belastungsgruppen signifikant verringert (Abb.2, rechts).

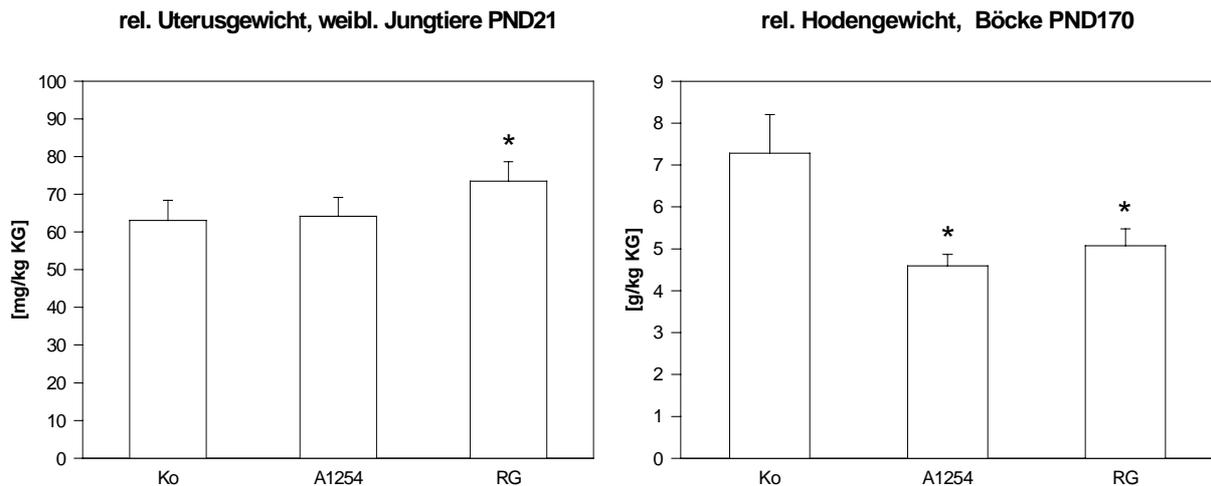


Abb. 2 (Links): Relatives Uterusgewicht weiblicher Ratten an PND21 und (Rechts) relatives Hodengewicht männlicher Tiere an PND170; Beschriftung wie bei Abb. 1; * $p < 0.05$ - signifikant im Vergleich zur Kontrolle; $n=8$.

3.4 Süßpräferenz

Die Ergebnisse der Süßpräferenz männlicher Nachkommen sind in Abb.3 dargestellt. In der RG-Gruppe ergab sich ein signifikant höherer Konsum von Saccharin-Lösung im Vergleich zu Wasser als bei den Kontrollen und den Ratten der A-Gruppe. Bei weiblichen Tieren waren dagegen keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu finden.

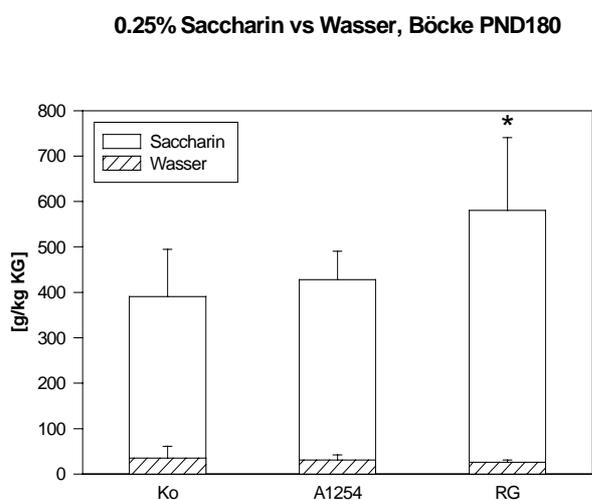


Abb. 3 Süßpräferenz

Kumulative Werte über drei Tage; Beschriftung wie bei Abb. 1; * $p < 0.05$ - signifikant im Vergleich zur Kontrolle; $n=10$. Die ausgeprägtere Bevorzugung der gesüßten Lösung bei den männlichen Ratten der RG-Gruppe spricht für eine Feminisierung des Verhaltens nach maternaler Belastung mit diesem PCB-Gemisch.

4 Schlußfolgerungen

Die maternale Belastung mit dem technischen PCB-Gemisch Aroclor 1254 und dem rekonstituierten Gemisch ergab eine signifikante Hemmung der Aromatase-Aktivität im Hypothalamus und der präoptischen Region bei neugeborenen Rattenmännchen durch das rekonstituierte Gemisch. Bei den Müttern dieser Gruppe eine Verminderung des Verhältnis Östradiol/Testosteron zum gleichen Zeitpunkt. Das relative Uterusgewicht war bei Weibchen vor der Pubertät in der RG-Gruppe erhöht, während das relative Hodengewicht in beiden PCB-Gruppen an PND170 erniedrigt war. Die ausgeprägtere Süßpräferenz bei adulten Männchen der RG-Gruppe zu diesem Zeitpunkt spricht für eine Feminisierung des Verhaltens und steht im Einklang mit der neonatal reduzierten Aromatase-Aktivität. Bei gleicher Dosierung zeigte das nach dem Kongener-Muster der Muttermilch rekonstituierte PCB-Gemisch die deutlicheren Wirkungen. Insgesamt sprechen die Veränderungen für anti-androgene Wirkungen von PCBs.

5 Experiment II

5.1 Fragestellung

Ziel dieses Versuchs war, die Dosis-Wirkungsbeziehung für das rekonstituierte PCB-Gemisch zu prüfen, um Aussagen über das Verhältnis der experimentellen Exposition zur Belastung des Menschen in der Umwelt und zum NOEL zu ermöglichen und Grundlagen für eine bessere Risikoabschätzung zu schaffen.

5.2 Methoden

5.2.1 Tiere und Exposition

Weibliche Ratten (Long Evans) erhielten Futter, das 5; 20 oder 40 mg des rekonstituierten Gemisches (RG05-, RG20-, RG40-Gruppe) pro kg Futter enthielt. 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. Bei einer Ratte von 200 g Körpergewicht und einem durchschnittlichen Futtermittelverbrauch von 20 g/Tag ergibt sich daraus eine tägliche Aufnahme von 0,5; 2 oder 4 mg PCB/kg KG. Die Exposition

begann 50 Tage vor der Verpaarung und dauerte bis zur Geburt der Nachkommen. Die Präparationen erfolgten entsprechend Abschnitt 2.2.

5.2.2 Präparationen und Hormonbestimmungen

An PND 0 und PND 21 wurden jeweils Mütter und Nachkommen zur Blut- und Organentnahme präpariert, um die innere Belastung mit PCB, Hormonwerte und Organgewichte zu ermitteln. Weiter wurde an PND 240 ein Teil der Rattenböcke präpariert.

5.2.3 Verhaltenstests

Emotionales Verhalten und Aktivität

An PND 30 und PND 100 wurde die lokomotorische Aktivität im „open field“ durchgeführt. Dies ist eine oktagonale Apparatur mit einem Durchmesser von 35 cm für juvenile und von 75 cm für adulte Ratten. Die Aufzeichnung der zurückgelegten Distanz erfolgte mit einem digitalen Video-Imaging-System über 9 Minuten.

Die Aufzeichnung der konditionierten Ultraschallvokalisationen erfolgte mit einem Fledermausdetektor, der an einen DAT-Rekorder angeschlossen wurde. Untersucht wurden „long calls“, deren Frequenz zwischen 20 und 30 kHz liegt. Bei der Messung wurden Stromreize (1 mA) durch einen vorhergehenden Sinuston angekündigt. In den ersten Durchgängen an einem Tag wurden dabei immer Ton und Schock gepaart. In den folgenden Durchgängen wurde nur der Ton gegeben. Die Aufzeichnung der Vokalisationen erfolgte jeweils 5 Minuten nach der Darbietung von Ton und Strom oder nur des Tons.

Zur Bestimmung der passiven Vermeidung wurden die Ratten auf eine Plattform in der Mitte einer Box mit einem Metallgitterboden gesetzt. Sobald die Ratte im dritten Durchgang die Plattform verlassen hatte und mit allen vier Pfoten den Gitterboden berührte, erhielt sie einen Stromreiz (1 mA). Sie wurde nach 5 min, 4 h und 24 h wieder auf die Plattform gesetzt. Strom wurde nicht mehr appliziert. Es wurde jeweils die Latenzzeit bis zum Verlassen der Plattform bestimmt.

Geschlechtsspezifisches Verhalten

Die Bestimmung der Süßpräferenz erfolgte bei männlichen und weiblichen Ratten über 5 Tage hinweg nach den Methoden, die bereits im ersten Teil dargestellt wurden.

Für die Prüfung der konditionierten Platzpräferenz wurde eine rechteckige Box mit einem horizontal und einem vertikal gestreiften Abteil verwendet, die durch eine schmale graue Mittelzone getrennt waren. Die Aufzeichnung erfolgte mit einem Video-Imaging-System. Am Prätrainingstag konnten sich die Ratten in allen Abteilen frei bewegen. Es wurde die Aufenthaltsdauer in jedem Abteil bestimmt. An den folgenden acht Tagen bekamen die Ratten entweder Testosteron (70 µg/kg) oder das Vehikel i.p. injiziert und wurden dann in die Box gesetzt. Dabei wurde Testosteron immer mit einem Abteil gepaart, d.h. das Tier darin festgesetzt, und das Vehikel immer mit dem anderen. Für jedes Tier wurde so eines der gestreiften Abteile - entweder das horizontale oder das vertikale - als Testosteron- und das andere als Vehikelabteil festgelegt. Am Testtag wurde kein Testosteron injiziert und die Ratten konnten sich wieder frei in allen Abteilen bewegen. Bestimmt wurde die Aufenthaltsdauer in dem vorher mit Testosteron gepaarten und im ungepaarten Abteil.

6 Ergebnisse

6.1 Innere Belastungswerte

Die inneren Belastungen mit PCB sind in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben.

Tab. 3: Innere Belastung mit PCB im Fettgewebe

Gruppe	Mütter PND 0	Mütter PND 21	F1, Weibchen PND 21
Kontrolle	n.n.	n.n.	n.n.
RG05	26.76 ± 5.51	46.35 ± 13.92	n.b.
RG20	155.79 ± 76.71	123.27 ± 20.38	n.b.
RG40	300.15 ± 87.66	289.66 ± 194.80	60.08 ± 10.02
A1254	127.31 ± 3.01	104.81 ± 27.58	12.87 ± 6.87

(µg/g Frischgewicht; n=3; Mittel ± SD); n.n. - nicht nachweisbar; n.b. - nicht bestimmt.

Durch einen technischen Fehler konnten keine PCB-Konzentrationen im Fettgewebe weiblicher Nachkommen der Gruppen RG05 und RG20 bestimmt werden. Da die übrigen

Werte in den RG-Gruppen zeigen, daß ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration im Futter und der Konzentration im Fettgewebe besteht, lassen sich die fehlenden Werte gut extrapolieren. Sie dürften bei etwa 7.5 µg/g in der RG05-Gruppe sowie bei etwa 30 µg/g in der RG20-Gruppe liegen.

Tab. 4: Innere Belastung mit PCB im Gehirn

Gruppe	Mütter PND 0	F1, Weibchen PND 0	Mütter PND 21	F1, Weibchen PND 21
Kontrolle	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RG05	0.44 ± 0.28	0.15 ± 0.06	0.25 ± 0.19	1.05 ± 0.42
RG20	2.81 ± 0.16	2.19 ± 0.59	0.86 ± 0.08	3.42 ± 0.57
RG40	5.65 ± 0.29	4.63 ± 0.57	2.13 ± 0.92	8.18 ± 4.14
A1254	0.43 ± 0.14	0.56 ± 0.25	0.30 ± 0.20	0.96 ± 0.56

(µg/g Frischgewicht; n=3, RG40: n=6; Mittel ± SD)

Bei einem Teil der Mütter wurde orientierungshalber an PND0 Blut zur PCB-Bestimmung im Serum entnommen. In der RG40-Gruppe ergab sich ein Wert von 5.715 mg/l und in der A-Gruppe ein Wert von 2.093 mg/l.

Insgesamt fällt auf, daß in allen Matrices und zu allen Entnahmezeitpunkten die Gewebekonzentrationen der A-Gruppe niedriger als die der RG40-Gruppe sind, obwohl die Konzentration im Futter in beiden Gruppen gleich war. Die Faktoren liegen zwischen 3 und 8. Ferner ist an PND21 die PCB-Konzentration im Fettgewebe der weiblichen Nachkommen um etwa den Faktor 5 in der RG40-Gruppe niedriger als die der entsprechenden Muttertiere. In der A-Gruppe beträgt dieser Faktor etwa 8. Im Gehirn sind zum Zeitpunkt der Geburt die PCB-Werte bei Müttern und Nachkommen gleich. Am Ende der Säugephase (PND21) übersteigt die Konzentration im Gehirn der Nachkommen die der Mütter um den Faktor 3-4 in sowohl in den RG-Gruppen als auch in der A-Gruppe.

Erwartungsgemäß sind die Konzentrationen im Gehirn wesentlich niedriger als im Fettgewebe.

6.2 Hormonbestimmungen

Vitamin D₃ ist ein Secosteroid, d.h. einer der Ringe (die Bindung vom Kohlenstoff 9 zu Kohlenstoff 10 im B-Ring) im Molekül ist durchbrochen. Es wird in zwei Schritten, der erste

in der Leber, der zweite in der Niere, in die hormonell aktive Form 1,25-(OH)₂- Vitamin D₃ (1,25-D) oder Calcitriol überführt. Außer in den klassischen Zielorganen wie Dünndarm, Niere oder Osteoblasten sind Rezeptoren für 1,25-D in den letzten Jahren in vielen nicht-klassischen Geweben gefunden worden, u.a. in Hoden, Ovarien, Langerhans-Inselzellen im Pankreas, Hypophyse und auch im Gehirn gefunden. Da ein bevorzugter Bindungsort im Gehirn der zentrale Kern der Amygdala ist und unsere vorangegangenen Untersuchungen zur PCB-Belastung zeigten, daß aufgrund des Musters der Verhaltensänderungen vermutlich die Amygdala durch die Belastung betroffen sind, wurden die Serumspiegel von 25-OH-Vitamin D₃ und 1,25-D bei Rattenmüttern und Nachkommen bestimmt. Bei den Müttern ergaben sich dabei an PND 0 dosisabhängige Reduktionen der Konzentrationen von 25-D und 1,25-D. 1,25-D war auch an PND 21 dosisabhängig vermindert, nicht aber 25-D. Bei männlichen Nachkommen aus Exp. I waren dagegen bei PND170 keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Aufgrund des explorativen Charakters dieses Untersuchungsteils stand in Exp. II kein Serum von Nachkommen an PND21 zur Bestimmung von 25-D und 1,25-D zur Verfügung. In einem zweiten Ansatz sollen noch Werte für die Zeitpunkte PND21 und PND170 erhoben werden.

Tab. 5: Konzentrationen von Vitamin D₃-Metaboliten im Serum

Mütter, PND 0 (n=3)	25-OH-D ₃ [nmol/l]	1,25-(OH) ₂ -D ₃ [pg/ml]
Kontrolle	28.9 ± 1.2	10.0 ± 3.5
RG05	22.9 ± 2.5*	4.5 ± 1.7*
RG20	18.5 ± 3.5*	n.d.*
RG40	18.8 ± 2.4*	n.d.*
Mütter, PND 21 (n=5-7)	25-OH-D ₃ [nmol/l]	1,25-(OH) ₂ -D ₃ [pg/ml]
Kontrolle	33.2 ± 3.7	94.3 ± 54.4
RG05	33.4 ± 3.3	74.3 ± 37.2
RG20	36.5 ± 7.0	56.5 ± 52.5
RG40	32.7 ± 6.6	24.2 ± 13.2*
F1, Böcke, PND 170 (n=6)	25-OH-D ₃ [nmol/l]	1,25-(OH) ₂ -D ₃ [pg/ml]
Kontrolle	42.6 ± 4.9	24.3 ± 11.9
A 1254	40.1 ± 5.1	27.8 ± 20.2
RG40	37.9 ± 4.7	20.0 ± 11.4

Mittel \pm SD; * $p < .05$, signifikant gegen Kontrollen

6.3 Organgewichte

An PND 0 war das relative Lebergewicht der Mütter dosisabhängig erhöht, während keine signifikanten Veränderungen am Ende der Säugephase (PND 21) zu finden waren. Bei den Nachkommen traten an PND 0 keine signifikanten Unterschiede im relativen Lebergewicht gegenüber den Kontrollen auf. Dagegen war eine dosisabhängige Erhöhung an PND 21 zu beobachten.

Tab. 6: Relatives Lebergewicht (x 100) der Rattenmütter

Mütter (n=3)	PND 0, relat. Lebergewicht	PND 21, relat. Lebergewicht
Kontrolle	4.29 \pm 0.03	5.10 \pm 0.19
RG05	4.46 \pm 0.38	4.91 \pm 0.35
RG20	4.57 \pm 0.24	5.20 \pm 0.04
RG40	5.14 \pm 0.27*	4.94 \pm 0.36

Mittel \pm SD; * signifikant gegen Kontrollen, $p < .05$.

Tab. 7: Relatives Lebergewicht (x 100) der Nachkommen

Nachkommen (n=3)	PND 0, relat. Lebergewicht	PND 21, relat. Lebergewicht
Kontrolle	3.31 \pm 0.31	3.64 \pm 0.19
RG05	2.91 \pm 0.14	4.12 \pm 0.20*
RG20	4.05 \pm 0.34	4.84 \pm 0.11*
RG40	4.00 \pm 0.78	5.04 \pm 0.29*

Mittel \pm SD; * signifikant gegen Kontrollen, $p < .05$.

Bei den Müttern waren weder die absoluten und relativen Gewichte der Schilddrüse, der Hypophyse noch des Uterus belastungsabhängig verändert. Dagegen war bei den Nachkommen das absolute Hypophysengewicht gegenüber den Kontrollen erniedrigt.

Tab. 8: Absolutes Hypophysengewicht der Nachkommen an PND 21 [mg]

	Kontrolle	RG05	RG20	RG40
abs. Hypophysengewicht	2.60 \pm 0.72	1.81 \pm 0.73*	2.02 \pm 0.38	1.94 \pm 0.47*

Mittel \pm SD; n=10-11; * signifikant gegen Kontrollen, $p < .05$.

Das Gewicht des ventralen Teils der Prostata war mit zunehmender PCB-Dosierung erniedrigt. Kein behandlungsbedingter Einfluß ließ sich dagegen auf die Hodengewichte nachweisen.

Tab. 9: Absolutes Gewicht der Prostata bei den Nachkommen an PND 240 [mg]

	Kontrolle	RG05	RG20	RG40
abs. Prostatagewicht	1.08 ± 0.15	1.05 ± 0.14	0.97 ± 0.03*	0.89 ± 0.20*

Mittel ± SD; n=8; * signifikant gegen Kontrollen, p<.05.

6.4 Verhaltensversuche

6.4.1 Emotionales Verhalten und Aktivität

Die Bestimmung der lokomotorischen Aktivität im „open field“ erfolgte an PND 30 und PND 100. Bei juvenilen Ratten (PND 30) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (p<.05), die auf einer erhöhten Aktivität der G40-Gruppe beruhen. Besonders ausgeprägt war diese Steigerung der Aktivität, wenn nur die äußere Zone des open fields betrachtet wurde. Keine Unterschiede waren an PND 100 zu beobachten.

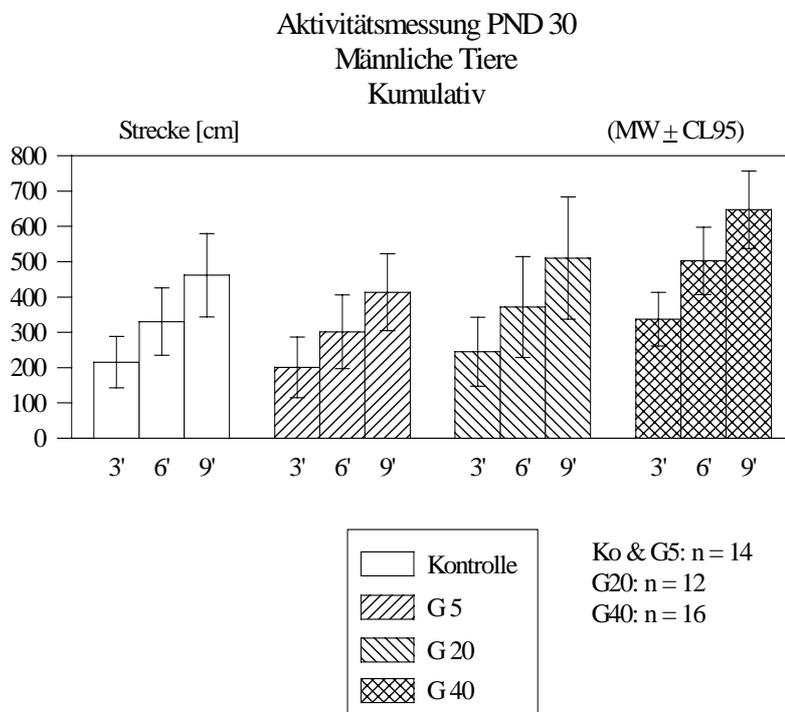


Abb. 4: Lokomotorische Aktivität. G5, G20, G40 - rekonst. PCB-Gemisch 5; 20; oder 40mg/kg Futter. Die Messung ergab signifikante Aktivitätssteigerungen an PND 30 in der RG40-Gruppe ($p < .05$).

An PND 140 wurden männliche Nachkommen auf konditionierte Ultraschallvokalisationen untersucht, da in den vorangegangenen Experimenten insbesondere Verhaltenstests mit emotionalen Komponenten empfindlich auf PCB-Belastung ansprachen. Hierbei ergaben sich signifikante PCB-bedingte Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < .05$). Diese waren am besonders am ersten Tag und weniger deutlich am Tag 10 ausgeprägt. Die Anzahl der konditionierten Vokalisationen war in der RG40-Gruppe gegenüber den Kontrollen reduziert.

15/10 Ultraschall-Vokalisationen

Anzahl Vokalisationen 5 min. +/- CI95

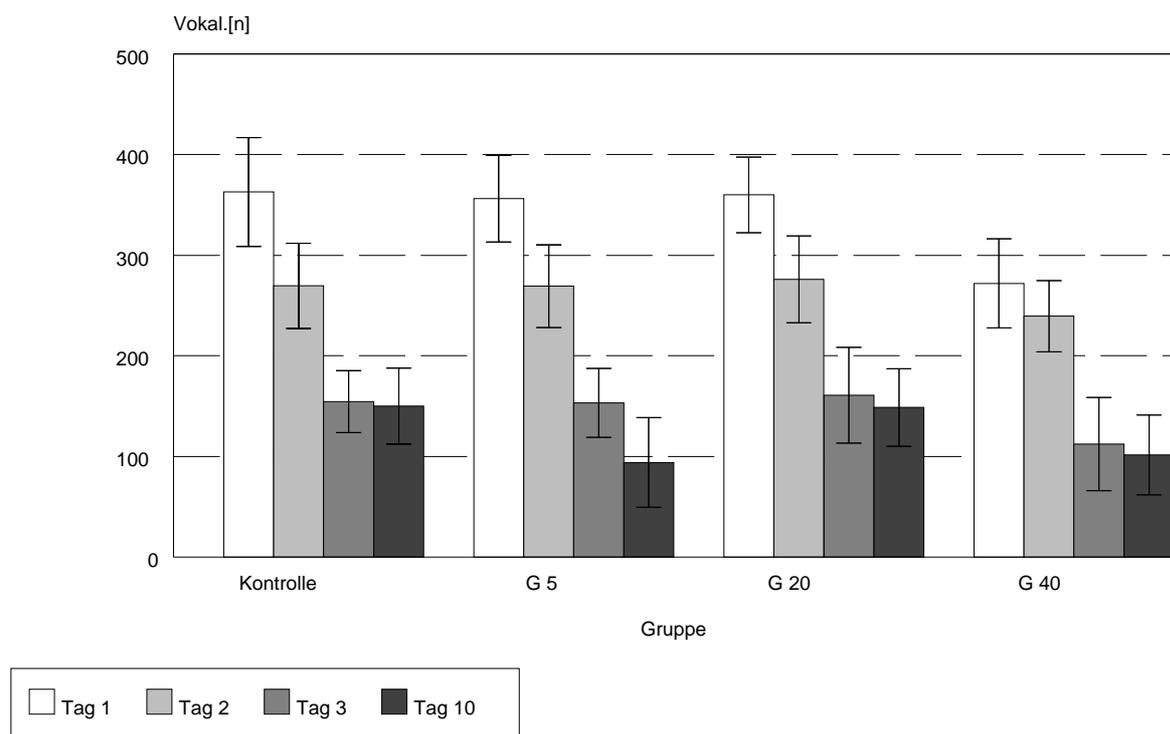


Abb. 5: In der RG40-Gruppe wurden signifikant weniger konditionierte Vokalisationen gemessen als in der Kontrollgruppe ($< .05$). Diese Wirkung war am Tag 1 und etwas weniger deutlich am Tag 10 ausgeprägt.

Als weiterer Test des emotionalen Verhaltens wurde eine Bestimmung der passiven Vermeidung an PND210 durchgeführt. Bei einer Kovarianzanalyse, bei der die Verweildauer auf der Plattform vor der Konditionierung als Kovariate berücksichtigt wurde, ergaben sich signifikante PCB-bedingte Verminderungen der Verweildauern bei den Testzeitpunkten 5 min ($p < .001$) und 4 h ($p < .05$) nach dem Konditionierungsdurchgang. Die Wirkung auf die Verweildauer war auch in der niedrigsten Belastungsstufe (RG05-Gruppe) schon signifikant ($p < .05$).

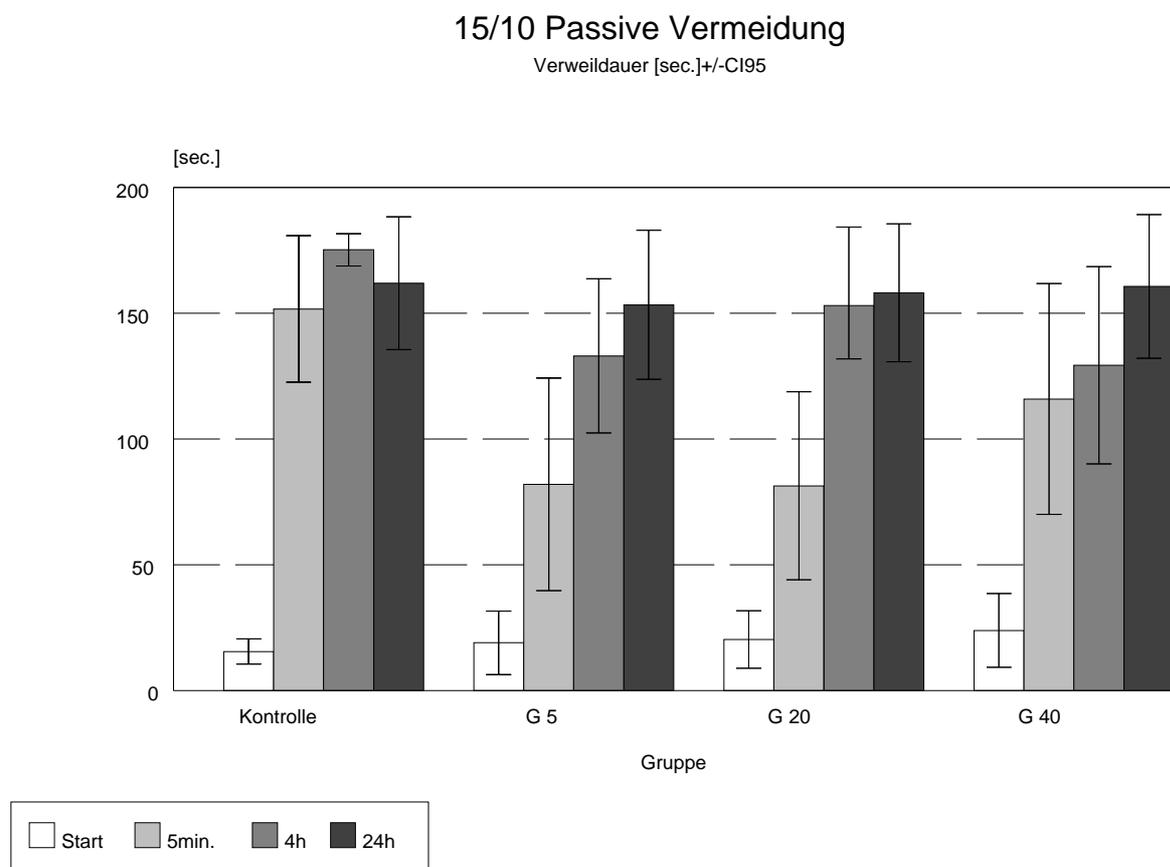


Abb. 6: Die Latenzzeit oder Verweildauer auf der Plattform war 5 min nach dem Konditionierungsdurchgang in allen PCB-behandelten Gruppen signifikant reduziert im Vergleich zu den Kontrollen ($p < .05$).

6.4.2 Geschlechtsspezifische Verhaltenstests

Entsprechend dem ersten Teil wurde die Süßpräferenz männlicher und weiblicher Ratten ab PND 110 untersucht. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < .05$). Beispielhaft ist der Tag 3 der fünftägigen Meßperiode in Abb. 7 dargestellt.

Besonders deutlich wurden die Unterschiede, wenn die Werte männlicher Ratten auf die weiblichen Werte bezogen wurden, um ein Maß für die Feminisierung des Verhaltens zu erhalten. Insbesondere die RG20- und die RG40-Gruppe wiesen deutliche Erhöhungen im Vergleich zu den Kontrollen auf. In diesen Gruppen gab es auch Rattenböcke, die bezogen auf das Körpergewicht einen höheren Saccharinkonsum als die Weibchen aufwiesen.

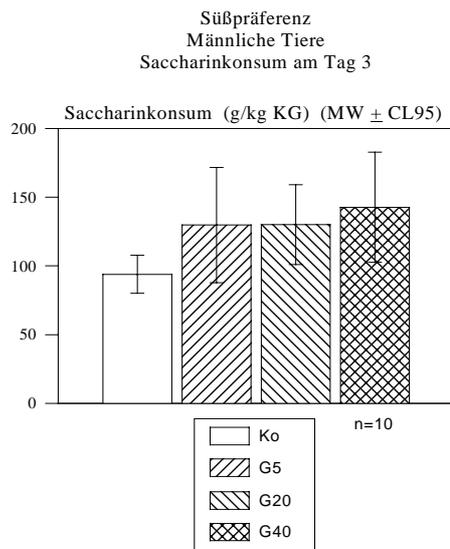


Abb. 7: Die Süßpräferenz wurde über 5 Tage bestimmt. Dargestellt ist beispielhaft der dritte Tag. Es gab signifikante Erhöhungen des relativen Saccharinkonsums in der RG20- und in der RG40-Gruppe ($p < .05$), wobei der separat gemessene basale Wasserverbrauch als Kovariate in einer Kovarianz-analyse berücksichtigt wurde.

Als zusätzlicher Test für Geschlechtshormon-abhängiges Verhalten wurde die affektive Wirkung von Testosteron mittels der Platzpräferenz geprüft. Der Test ergab, daß sich Rattenböcke der RG40-Gruppe signifikant ($p < .05$) länger in dem Kompartiment der Platzpräferenzbox aufhielten, das vorher mit Testosteron gepaart worden war.

Platzpräferenz
Männliche Tiere, PND 160
Aufenthaltsdauer auf gepaarter Seite

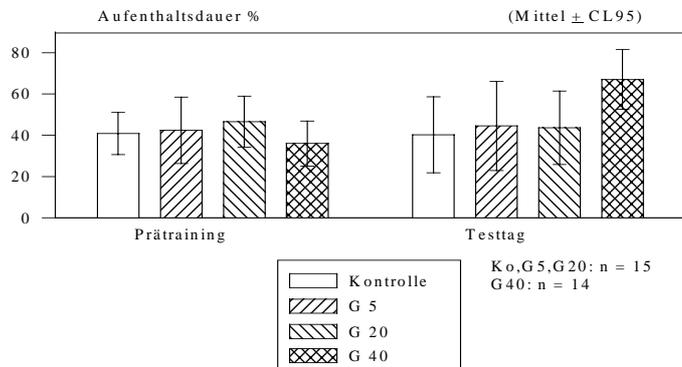


Abb. 8: Konditionierte Platzpräferenz. Am Testtag ergab sich eine signifikant längere Aufenthaltsdauer auf der vorher mit Testosteron gepaarten Seite der Präferenzbox in der RG40-Gruppe. Dies deutet auf eine größere affektive Wirkung von Testosteron bei diesen Ratten hin.

7 Diskussion und Schlußfolgerungen

Im Verhaltensbereich traten sowohl bei der passiven Vermeidung als auch bei den konditionierten Ultraschall-Vokalisationen Wirkungen nach maternaler PCB-Exposition auf. Dabei erwies sich die passive Vermeidung als die sensitivere Aufgabe. Dieser Test ergab sowohl bei Belastung mit einem coplanaren PCB-Kongener in früheren Untersuchungen aus unserem Labor als auch bei dem rekonstituierten Gemisch konsistente Ergebnisse. Zusammen mit anderen Verfahren zur Erfassung emotionalen Verhaltens wie der konditionierten Geschmacksaversion erhärtet sich dadurch die Annahme, daß PCB-Belastung während der Entwicklung insbesondere die emotionalen Komponenten des Verhaltens verändert, während das räumliche Lernen nicht beeinflusst wird. Insgesamt spricht dies für PCB-bedingte Veränderungen der Amygdala, während der Hippocampus nach den vorliegenden Ergebnissen nicht betroffen ist. Dies bestätigen auch elektrophysiologische Untersuchungen (ALTMANN et al. 1998) und Arbeiten über den NMDA-Rezeptor (MUNDY, noch unveröffentlicht), die beide Material von unseren Ratten verwendeten und übereinstimmend keine Veränderungen im Hippocampus fanden, wohl aber im cerebralen Cortex.

Bei den geschlechtshormon-abhängigen Parametern fanden sich im ersten Teil Wirkungen auf die Hormonspiegel insbesondere adulter männlicher Ratten, die relativen Hordengewichte, die

Aromatase-Aktivität im Hypothalamus bei Geburt sowie auf eine erhöhte Süßpräferenz bei Rattenböcken nach Behandlung mit dem rekonstituierten PCB-Gemisch. Insgesamt spricht dies für anti-androgene Wirkungen. Die Verringerung der Aromatase-Aktivität führt zu einer eher weiblichen Ausprägung des Gehirns, die sich im Verhaltensbereich in der gesteigerten Süßpräferenz zeigt. Im zweiten Teil wurde dieses Bild ergänzt durch dosis-abhängige Reduktionen des Steroidhormons 1,25-D, ein erniedrigtes Prostatagewicht in den beiden höheren Dosierungsstufen und im Verhalten durch die größere positiv affektive Wirkung von Testosteron bei der Platzpräferenz bei Männchen der höchsten Belastungsgruppe. Das Hodengewicht war im zweiten Teil nicht signifikant verändert, aber es wurde wieder die erhöhte Süßpräferenz bei den beiden höheren Dosierungen gefunden. Insgesamt ergibt sich daraus ein überwiegend konsistentes Bild. Unterschiede sind vermutlich dadurch bedingt, daß im ersten Teil durch eine fehlerhafte Lieferung ein Inzuchtstamm von Long Evans zum Einsatz kam, während im zweiten Teil der Auszuchtstamm verwendet wurde.

Erwartungsgemäß ergaben sich für die einzelnen Endpunkte unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Die sensitivsten Veränderungen gab es bei dem Spiegel von 1,25-D und im Verhaltensbereich bei der passiven Vermeidung. Hier traten schon in der niedrigsten Belastungsstufe (5 mg/kg Futter) signifikante Wirkungen auf.

Um die diesen Veränderungen zugrunde liegenden innere Exposition zu inneren Belastungen beim Menschen in Bezug zu setzen, müssen vor allem die PCB-Werte zum Zeitpunkt der Geburt (PND 0) herangezogen werden. Zwar sind die Werte der Nachkommen am Ende der Säugephase (PND 21) höher, doch sind die Auswirkungen der pränatalen Belastung auf das Verhalten und die neuropsychologische Entwicklung bedeutender, wie tierexperimentelle Untersuchungen (LILIENTHAL & WINNEKE 1991) und prospektive Studien an Kindern zeigen (ROGAN et al. 1986; GLADEN et al. 1988). In einer neuen prospektiven Arbeit aus den Niederlanden (HUISMAN et al. 1995) betrug die fettbezogene PCB-Konzentration in Muttermilch etwa 400 ng/g im Mittel (Spannweite etwa 150-1000 ng/g). Demgegenüber betrug die PCB-Konzentration im Fettgewebe der Rattenmütter dieses Versuchs an PND 0 etwa 25 µg/g bei der niedrigsten Dosierung und etwa 300 µg/g bei der höchsten, so daß sich ein Faktor von etwa 50 ergibt, um den die innere Exposition der Ratte die der Menschen übersteigt, bei den Spitzenwerten der menschlichen Belastung beträgt dieser Faktor etwa 25.

Auf der Basis der PCB-Werte im Gehirn ergibt sich ein ähnliches Bild: Hier fand sich in dieser Untersuchung ein Wert von 150 ng/g Frischgewicht für Nachkommen der Ratten oder hochgerechnet auf den Lipidgehalt etwa 1500 ng/g. Dem steht ein mittlerer Wert von 50 ng/g Fett für die Summe von 4 Kongeneren im Gehirn von Humanfeten (Spannweite 22-122 ng/g) entgegen, der bei Hochrechnung auf den Gesamtgehalt an PCB etwa 75 ng/g Fett (33-183 ng/g) beträgt. Somit ergibt sich ein Faktor von etwa 20 im Mittel oder für die Spitzenwerte von <10, um den die Rattenwerte die Humanwerte im Gehirn übersteigen. Bei diesen Belastungswerten der Ratten konnte überraschenderweise für einige Endpunkte kein NOEL beobachtet werden, so muß dieser bei noch kleineren inneren Belastungen vermutet werden. Das bedeutet aber, daß die Sicherheitsabstände für mittlere menschliche Belastungen kleiner als 20 sind, für die höhere Belastungen am Rand der Verteilung liegen sie noch darunter. Zu beachten ist dabei, daß es sich bei diesen Wirkungen nicht um klinische Veränderungen handelt, die am Einzelfall gesichert werden können, sondern um Wirkungen, die für die Betrachtung von Populationen relevant sind.

8 Literatur

ALTMANN, L., LILIENTHAL, H., HANY, J., WIEGAND, H. (1998): Inhibition of long-term potentiation in developing rat visual cortex but not hippocampus by in utero exposure to polychlorinated biphenyls. *Dev. Brain Res.* **110**, 257-260.

BJERKE, D.L., BROWN, T.J., MACLUSKY, N.J., HOCHBERG, R.B., PETERSON, R.E. (1994): Partial demasculinization and feminization of sex behavior in male rats by in utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is not associated with alterations in estrogen receptor binding or volumes of sexually differentiated brain nuclei. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**, 258-267.

BROUWER, A. (1991): Role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism in laboratory and wildlife species. *Biochem Soc Transact* **19**, 731-737.

CHAFFIN, C.L., PETERSON, R.E., HUTZ, R.J. (1996): In utero and lactational exposure of female Holtzman rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Modulation of the estrogen signal. *Biol. Reprod.* **55**, 62-67.

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.

GLADEN, B.C., ROGAN, W.J., HARDY, P., THULLEN, J., TINGELSTAD, J., TULLY, M. (1988): Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorophenyl dichloroethene transplacentally and through human milk. *J. Pediatr.* **113**, 991-995.

HUISMAN, M., KOOPMAN-ESSEBOOM, C., FIDLER, V., HADDERS-ALGRA, M., PAAUW, C.G., TUINSTRAL, L.G.M.Th., WEISGLAS-KUPERUS, N., SAUER, P.J.J., TOUWEN, B.C.L., BOERSMA, E.R. (1995): Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins and its effect on neonatal neurological development. *Early Hum. Dev.* **41**, 111-127.

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.

KREMER, H., LILIENTHAL, H., HANY, J., ROTH-HÄRER, A., WINNEKE, G. (1998): Sex-dependent effects by maternal PCB exposure on the electroretinogram in rats. (eingereicht).

LICHTENSTEIGER, W., SCHLUMPF, M. (1985): Prenatal nicotine affects fetal testosterone and sexual dimorphism of saccharin preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **23**, 439-444.

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., WEINAND-HÄRER, A., HANY, J., HUPPA, C., KREMER, H., WINNEKE, G. (1997): Wirkung der kombinierten Belastung mit ausgewählten PCB-Kongeneren auf spezifische Verhaltensweisen, Neurotransmitter im Gehirn und Schilddrüsenhormone bei der Ratte“, *FZKA-PUG* **27**, 253-261.

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.

LUNDHOLM, C.E. (1988): The effects of DDE, PCB and chlordane on the binding of progesterone to its cytoplasmic receptor in the eggshell gland mucosa of birds and the endometrium of mammalian uterus. *Comp. Biochem. Physiol.* **89C**, 361-368.

- LUNDKVIST, U., KINDAHL, H., MADEJ, A. (1987): Urinary levels of estrone sulfate and 11-ketotetranor prostaglandin F metabolite in pregnant guinea pigs given Clophen A50 (polychlorinated biphenyls). *Biol. Reprod.* **36**, 109-116.
- MABLY, T.A., MOORE, R.W., GOY, R.W., PETERSON, R.E. (1992): In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114**, 108-117.
- McEWEN, B.S. (1992): Steroid hormones: Effect on brain development and function. *Horm Res* **37**, Suppl. 3, 1-10.
- McEWEN, B.S. (1994): Steroid hormone effects on brain: Novel insights connecting cellular and molecular features of brain cells to behavior. *Meth Neurosci* **22**, 525-542.
- MORSE, D.C., SEEGAL, R.F., BROSCHE, K.O., BROUWER, A. (1996): Long-term alterations in regional brain serotonin metabolism following maternal polychlorinated biphenyl exposure in the rat. *Neurotoxicology* **17**, 631-638.
- NESARETNAM, K., CORCORAN, D., DILS, R.R., DARBRE, P. (1996): 3,4,3',4'-tetrachloro-biphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo. *Molec Endocrinol* 1996, 10, 923-936.
- NOREN, K., LUNDEN, A. (1991): Trend studies of polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in human milk. *Chemosphere* **23**, 1895-1901.
- PATNODE, K.A., CURTIS, L.R. (1994): 2,2',4,4',5,5'- and 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl alteration of progesterone and estrogen receptors coincides with embryotoxicity in mink (*Mustela vison*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**, 9-18.
- PORTERFIELD, S.P., HENDRICH, C.E. (1993): The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development - Current perspectives. *Endocrine Rev* **14**, 94-106.
- 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. (1995): Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmac. Ther.* **67**, 247-281.
- 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.
- SCHANTZ, S.L., MOSHTAGHIAN, J., NESS, D.K. (1995): Spatial learning deficits in adult rats exposed to ortho-substituted PCB congeners during gestation and lactation. *Fund. Appl. Toxicol.* **26**, 117-126.
- SCHUHMACHER, M., ROBEL, P., BAULIEU, E.E. (1996): Development and regeneration of the nervous system: A role for neurosteroids. *Develop. Neurosci.* **18**, 6-21.
- 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. (1996): Epidemiological and laboratory evidence of PCB-induced neurotoxicity. *Critic. Rev. Toxicol.* **26**, 709-737.
- SINGER, C.A., ROGERS, K.L., STRICKLAND, T.M., DORSA, D.M. (1996): Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci. Lett.* **212**, 13-16.
- SMITH, S.S. (1994): Female sex steroid hormones: From receptors to networks to performance - Actions on the sensorimotor system. *Prog. Neurobiol.* **44**, 55-86.

UNKILA, M. (1995): Biochemical effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 443-455.

WARREN, S.G., HUMPHREYS, A.G., JURASKA, J.M., GREENOUGH, W.T. (1995): LTP varies across the estrous cycle: Enhanced synaptic plasticity in proestrous rats. *Brain Res.* **703**, 26-30.

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.

WEINAND-HÄRER, A., LILIENTHAL, H., BUBSER, M., SCHMIDT, W., WINNEKE, G. (1994): Comparison of effects by a coplanar PCB or PTU on neurotransmitter levels in the brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 350 Suppl., R22.