

Aus dem Institut für
Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auswirkung niedriger Dosierungen des
Flammschutzmittels 2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether (PBDE 47)
auf die Entwicklung von Ratten nach
prä- und postnataler Exposition

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Zeynep Akkoc
aus Gölhisar (Türkei)

Gutachter: 1. Prof. Dr. I. Chahoud
 2. Prof. Dr. med. G. Schönfelder
 3. Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Datum der Promotion: 04.02.2011

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	5
1.1	Flammschutzmittel Polybromierte Diphenylether (PBDE)	5
1.1.1	Chemische Charakterisierung	6
1.1.2	Einsatz und Entsorgung	7
1.1.3	Vorkommen und Aufnahme	8
1.1.4	Wirkungen von PBDE in epidemiologischen Studien und im Tierexperiment.....	10
1.2	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Tierhaltung und Behandlung	16
2.2	Blut- und Organentnahme	17
2.3	Bestimmung der Schilddrüsenhormone	18
2.4	Wirkungen von PBDE auf die postnatale Entwicklung der Nachkommen	19
2.4.1	Bestimmung der Entwicklungsparameter der Nachkommen	19
2.4.2	Basallokomotorische Aktivität (Mobiltron)	19
2.4.3	Erkundungsverhalten (Open Field).....	20
2.4.4	Angstverhalten (Elevated Plus Maze).....	21
2.5	Statistische Auswertung.....	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Körper- und Organgewichte	23
3.2	Schilddrüsenhormone	27
3.3	Postnatale Entwicklung der Nachkommen	30
3.3.1	Entwicklungsendpunkte.....	30
3.3.2	Basallokomotorische Aktivität (Mobiltron)	35
3.3.3	Erkundungsverhalten (Open Field).....	39
3.3.4	Angstverhalten (Elevated Plus Maze).....	42

4 Diskussion	44
5 Schlussfolgerungen	54
Zusammenfassung	56
Summary	58
Abkürzungen	60
Abbildungsverzeichnis	62
Tabellenverzeichnis	63
Literaturverzeichnis	64
Danksagung	75
Curriculum Vitae	76
Erklärung	77

1 EINLEITUNG

1.1 FLAMMSCHUTZMITTEL POLYBROMIERTE DIPHENYLETHER (PBDE)

In der industriellen Anfertigung von Gebrauchsgütern werden zur Verminderung des Brandrisikos als Flammschutzmittel (FSM) anorganische und organische (halogenstickstoff- und phosphorhaltige) Verbindungen eingesetzt. Bei der Kunststoffherstellung werden häufig halogenhaltige (chlor- oder bromhaltige) FSM verwendet. Die halogenhaltigen Kunststoffe sind schwer entzündbar, weil die bei der Pyrolyse entstehenden Halogen-Radikale die Reaktion brennender Gase mit Sauerstoff hemmen. Die FSM werden zum Teil schon bei der Polymerisation der Kunststoffe eingefügt (reaktive FSM) oder in Form von Additiven eingesetzt (additive FSM). Der Hauptvorteil der reaktiven Flammhemmer besteht in ihrer chemischen Bindung, durch die sie fest in die Polymermatrix eingebunden sind und nicht aus den Produkten entweichen können (Sjodin 2001). So können diese lediglich beim Herstellungsprozess in die Umwelt gelangen. Additive FSM kontaminieren demzufolge deutlich leichter die Umwelt. Allerdings sind reaktive FSM meist teurer und ihr Einsatz ist auf bestimmte Polymere beschränkt.

In der Gruppe der bromierten FSM sind vor allem die polybromierten Diphenylether (PBDE) und Biphenyle (PBB) sowie Hexabromcyclododecan (HBCD) und Tetrabrombisphenol A (TBBPA) von Bedeutung. Die PBDE gehören zur Gruppe der additiven FSM, während das TBBPA ein reaktives FSM darstellt. Die PBDE umfassen mehr als 200 Kongenere und werden vorwiegend in drei technischen Mischungen unterschiedlicher Zusammensetzung wie Pentabromdiphenylether (PentaBDE), Octabromdiphenylether (OctaBDE) und Decabromdiphenylether (DecaBDE) eingesetzt. Br4DE besteht hauptsächlich aus 2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether (PBDE 47), Br5DE aus den zwei Komponenten 2,2',4,4',5-Pentabromdiphenylether (PBDE 99, ca. 90 %) und 2,2',4,4',6-Pentabromdiphenylether (PBDE 100). Br6DE setzt sich aus PBDE 153 und PBDE 154 zusammen. Br7DE besteht aus einem Kongener, Br8DE aus drei und Br9DE aus zwei Kongeneren. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der PBDE mit Dioxinen und polychlorierten Biphenylen (PCB) (Darnerud und Thuvander 1999; de Wit 2002) sowie der exponentiellen Zunahme der Konzentration in den letzten Jahrzehnten

in Umwelt und Lebewesen werden sie derzeit bezüglich ihrer toxikologischen Effekte intensiv erforscht (Schechter et al. 2003; Hites 2004).

1.1.1 CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

Zur Substanzklasse der PBDE gehören Moleküle, bei denen zwei Phenylringe über eine Sauerstoffbrücke miteinander verbunden sind. Die Summenformel lautet $C_{12}H_{10-x}Br_{1-10}O$. Alle zehn Wasserstoffatome können durch katalytische Bromierung mit Bromatomen substituiert sein. Abhängig von der Art der Bromsubstitution sind die Phenylringe mit einem C-O-C-Winkel von etwa 120° zueinander verdrillt (Abbildung 1).

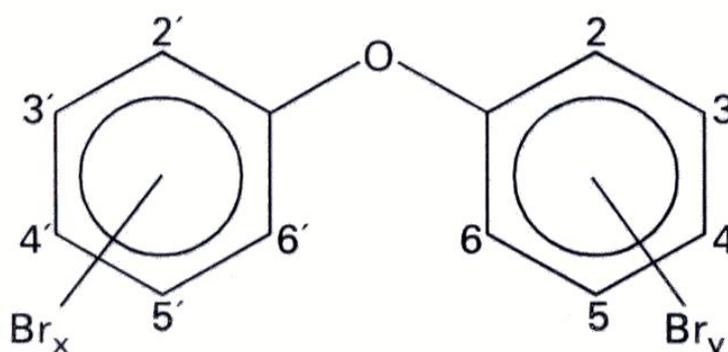


Abb. 1: Strukturformel von PBDE

Daraus ergibt sich eine Anzahl von 209 möglichen Kongeneren. Sie bestehen aus verschiedenen Kongeneren mit zum Teil unterschiedlichem Bromierungsgrad. Die einzelnen Kongenere werden dabei, der Zahl und der Position der Bromatome an den beiden aromatischen Ringen folgend, nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) bezeichnet. Sie werden je nach Bromierungsgrad auch homologen Gruppen zugeteilt. Die für die PCB empfohlene vereinfachte systematische Nomenklatur wurde für die PBDE übernommen. In Anlehnung daran werden die Kongenere auch mit PBDE 1 bis PBDE 209 bezeichnet (de Wit 2002).

Die PBDE sind in der Umwelt persistent (stabil), lipophil (fettlöslich) und bioakkumulativ (sich anreichernd). Die mehrfach bromierten PBDE sind sehr groß und passieren die Zellmembranen schwerer als kleinere. Damit sinkt mit steigendem Bromierungsgrad der PBDE deren Bioakkumulierbarkeit. Entscheidende Faktoren für die

Bioakkumulierbarkeit der PBDE sind jedoch die hohe Lipophilie (Staskal et al. 2004) und die langen Halbwertszeiten von 1.8, 2.9, 1.6, 6.5 und 3.3 Jahren der dominierenden Kongenere PBDE 47, 99, 100, 153 und 154 im menschlichen Körper (Geyer et al. 2004). Eine globale Verteilung der PBDE ist durch zahlreiche Studien nachgewiesen worden (de Wit 2002), die damit die Eigenschaften von POPs (Persistent Organic Pollutants) aufweisen.

1.1.2 EINSATZ UND ENTSORGUNG

Für viele Gegenstände des alltäglichen Gebrauchs bestehen strenge Flammenschutzvorschriften. Daher werden seit den sechziger Jahren unter anderem die PBDE als additive FSM in großen Mengen vorwiegend in Verbindungen mit Kunststoffen in Kunststoffgehäusen und Leiterplatten von technischen Geräten, wie z. B. in Fernsehern, Computern oder Kopierern; aber auch in Möbeln und geschäumten Stoffen, wie z. B. Autositzen; sowie in Textilfasern, wie z. B. Matratzen oder Gardinen, die feuerfest sein müssen, eingesetzt (Hale et al. 2001; Morf et al. 2005). Sie sollen eine leichte Inbrandsetzung der Produkte, entweder durch Überhitzung des jeweiligen Gerätes oder auch in einem Brandfall, verhindern.

Die wichtigsten kommerziellen Produkte sind PentaBDE, OctaBDE und DecaBDE (de Wit 2002). PBDE sind effektiv und nahezu universell einsetzbar. Ihr weltweiter Verbrauch nahm von 40 000 t im Jahr 1991 (World Health Organization 1994) bis 2001 um etwa 40 % zu. 1992 machten die bromhaltigen Flammhemmer nach Daten der OECD etwa ein Viertel der weltweit verbrauchten FSM aus. Die EU-Mitglieder kamen 2004 überein, Penta- und OctaBDE zu verbieten. Der Gehalt an Penta- und OctaBDE darf demnach in den Produkten, die in die EU eingeführt oder dort hergestellt werden, nicht mehr als 0,1 Gewichtsprozent betragen (Richtlinie 2003/11/EG).

Die Umsetzungs- und Abbauprodukte der additiven FSM können durch Emissionen bei der Herstellung, der Verarbeitung, dem Gebrauch und der Entsorgung in die Umwelt gelangen (Betts 2003; Peng et al. 2008). Durch das Auswaschen von FSM aus Kunststofftextilien gelangen sie in den Klärschlamm, damit ins Trinkwasser und über die Düngung in die Nahrungsmittel oder über die Flüsse und die Atmosphäre in die Weltmeere. Die PBDE gelten schon allein wegen der Entsorgungsproblematik als Risikostoffe. Recyclingverfahren, Deponierung und Müllverbrennung sind die

Haupteintragspfade der PBDE in die Umwelt. Bei der Entsorgung von Elektronikschrott kann ein Abbau von höher bromierten Molekülen zu geringer bromierten und toxischeren Verbindungen beobachtet werden. Bei der Verbrennung von PBDE entstehen hochgiftige Dioxine und Furane, die häufig als eine Gesundheitsgefahr angesehen werden.

1.1.3 VORKOMMEN UND AUFNAHME

Flammhemmer müssen sich im Brandfall mit geringer Energie aus dem Kunststoff freisetzen können, entweichen daher teilweise schon bei Raumtemperatur aus den Kunststoffgehäusen und gelangen so in die Umgebungsluft. In der Atmosphäre werden diese kaum abbaubaren organischen Substanzen über große Distanzen befördert, mit dem Niederschlag ausgewaschen und gelangen auf diese Weise in die Meere und somit auch in die Nahrungskette.

Seit PBDE 1981, als eine der ersten Gruppen von bromierten FSM, in Hechten aus Westschweden gefunden wurde, konnte v. a. diese Stoffgruppe in unterschiedlichen Umweltkompartimenten mit steigender Tendenz nachgewiesen werden (de Boer J. und Denneman 1998; de Boer J. et al. 2003). Besonderes Interesse wurde hierbei den relevanten Tetra-, Penta-, Hexa- und Decakongeneren entgegengebracht. In der Umwelt ließen sich die zunehmenden Konzentrationen in Luft, Boden und Wasser dokumentieren. Dabei waren die PBDE bei den untersuchten Sedimenten und Organismen insbesondere durch PBDE 47 (TetraBDE) und PBDE 99 (PentaBDE) vertreten (Darnerud et al. 2001; de Wit 2002). In allen Studien der letzten beiden Jahrzehnte wurde ein exponentieller Anstieg der Konzentrationen von PBDE in verschiedenen Proben wie in Fischen aus der japanischen Küstenregion (Akutsu et al. 2001), in Robben aus der San-Francisco-Bucht (She et al. 2002), in kanadischen Beluga-Walen (Wilford et al. 2004) und in Humanproben aus Japan, Schweden, Neuseeland und USA gefunden (Meironyte et al. 2001; Choi et al. 2003; Harrad und Porter 2007; Spliethoff et al. 2008).

In fetthaltigen tierischen Lebensmitteln, wie Fleisch, Milchprodukten und Eiern, lagen die Gehalte in den USA über dem europäischen Mittel. Fleisch-, Milch- und Eierproben aus Spanien und Finnland waren mit bis zu 0,17 ng/g Frischgewicht belastet (Bocio et

al. 2003; Kiviranta et al. 2004). Die Proben aus den USA lagen zum Teil deutlich über 1 ng/g Frischgewicht (Schechter et al. 2004; Huwe und Larsen 2005).

In Fischen war das vorherrschende Kongener PBDE 47, während in den übrigen tierischen Lebensmitteln PBDE 47 und PBDE 99 in ähnlichen Anteilen den größten Anteil ausmachten (Labandeira et al. 2007). In einer anderen Untersuchung von Lebensmitteln und Humanmilch wurden PBDE 47, 99, 100, 153 und 209 als häufigste Kongenere gefunden (Krupp und Lee 1988; de Wit 2002; Kalantzi et al. 2004; Schechter et al. 2004, Sjodin et al. 2004). Der Verbleib des in großen Mengen produzierten DecaBDE 209 ist noch immer ungeklärt (de Boer J. und Denneman 1998; Zennegg et al. 2003; Law et al. 2003). DecaBDE überwiegt in Sedimenten, Klärschlämmen und Staub. Die höher bromierten Diphenylether wie Octa- und DecaBDE können in der Luft aufgrund ihres niedrigen Dampfdruckes schlecht befördert werden. Sie debromieren unter Sonnenlicht und UV-Licht (Eriksson et al. 2001) in organischen Lösungsmitteln zu niedriger substituierten Kongeneren und können dann über die Luft transportiert werden (Bjorklund et al. 2003; Soderstrom et al. 2004). Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass sich Octa- bis DecaBDE in Fischen zu niedriger bromierten Tetra- und PentaBDE umwandeln (Stapleton und Baker 2003; Labandeira et al. 2007). Eine mögliche Umwandlung zu Methoxy- (MeO-) und Hydroxy-Verbindungen (OH-) der bromierten Diphenylether wurde in verschiedenartigen Fischen, Algen und Schwämmen beobachtet (Haglund et al. 1997; Letcher und Behnisch 2003). Da diese MeO- und OH-PBDE kommerziell nicht angefertigt werden, geht man davon aus, dass es sich um eine Metabolisierung handelt. Bei der Metabolisierung können auch persistente und toxische Verbindungen entstehen, die über den Verzehr von Fisch ins menschliche Fettgewebe gelangen, wo sie sich anreichern (Schechter et al. 2004).

Die Anreicherung der PBDE oder ihrer Metabolite im Menschen findet durch Aufnahme über die Nahrungskette, Einatmen und durch Kontakt mit der Haut statt (Hites 2004; Clive et al. 2006). Sjodin et al. (2003) untersuchten die Konzentrationen in Lebensmitteln, die neben Hausstaub als Hauptaufnahmequelle des Menschen gelten. Es zeigte sich, dass der Mensch PBDE hauptsächlich durch Lebensmittel mit einem hohen Fettgehalt, wie fettigen Fisch, aufnimmt, da sich die PBDE im Fettgewebe der Fische sehr gut anreichern und nur langsam abgebaut werden können (Biomagnifikation). Der Gehalt von PBDE in Meerestieren hängt sowohl von deren

Position in der Nahrungskette ab als auch von deren Fähigkeit, PBDE metabolisch abzubauen.

Gespeichert werden diese Substanzen insbesondere im Fettgewebe von Säugetieren, aus dem sie z. B. während der Laktation mobilisiert werden. Dies kann zu Konzentrationen im Milchfett der menschlichen Muttermilch führen, die mit denen im Fettgewebe vergleichbar sind. Der gestillte Säugling ist daher einer wesentlich stärkeren Belastung ausgesetzt als ein Erwachsener. Es wurde nachgewiesen, dass sich die PBDE-Gesamtkonzentration in der Muttermilch schwedischer Frauen zwischen 1972 und 1997 um das 60-Fache von 0,07 auf 4 µg/kg Fett erhöht hat (Meironyte et al. 1999; Darnerud et al. 2001). Im Vergleich zu europäischen Frauen wurden in der Milch US-amerikanischer Frauen 10- bis 70-fach höhere PBDE-Konzentrationen gefunden (She und Holden 2004). Kinder sind diesen Chemikalien am häufigsten ausgesetzt - nicht nur über die Muttermilch, sondern auch durch Hausstaub (Darnerud et al. 2001). In einer epidemiologischen Studie mit PBDE befanden sich im Serum der jüngeren Kinder einer Familie höhere Konzentrationen der Substanz als im Serum der älteren Geschwister oder der Eltern (Fischer et al. 2006). Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass nach Behandlung mit PBDE höhere Konzentrationen der Substanzen im Fettgewebe der Nachkommen von Mäusen und Ratten im Vergleich zu den Muttertieren auftraten (Lilienthal et al. 2006; Staskal et al. 2006). Dies wurde der noch unterentwickelten Ausscheidungsfähigkeit der Jungtiere zugeschrieben.

1.1.4 WIRKUNGEN VON PBDE IN EPIDEMIOLOGISCHEN STUDIEN UND IM TIEREXPERIMENT

In den letzten Jahren ist vielfach vom Einfluss der Umweltschadstoffe auf die Entwicklung und Fortpflanzung von Tieren und Menschen berichtet worden. Das vermehrte Auftreten von Frühgeburten, Missbildungen männlicher Geschlechtsorgane, Lern- und Konzentrationsschwächen, emotionalen Störungen, vorzeitigem Eintritt der Pubertät, Übergewicht und niedriger Spermienqualität wurde mit Umweltchemikalien in Verbindung gebracht (Gill et al. 1978; Colborn et al. 1993). Im Tierexperiment kam es nach prä- und postnataler Exposition von Ratten gegenüber PBDE 99 zu persistierenden Effekten auf das Reproduktionssystem der männlichen Nachkommen, die sich im Erwachsenenalter durch eine leichte Gewichtsveränderung der

Fortpflanzungsorgane und eine signifikante Verringerung der Spermien- und Spermatozoenanzahl bemerkbar machten (Kuriyama et al. 2005).

Für den toxischen Effekt der chemischen Noxen ist die betroffene Entwicklungsphase von Bedeutung. In der Reproduktionstoxikologie werden prä- oder postnatale Wirkungen von Substanzen auf die Reproduktion anhand von Parametern, wie z. B. Veränderungen von Fertilität, pränataler und postnataler Entwicklung der Reproduktionsorgane oder der Hormonkonzentrationen, untersucht. Solche substanzbedingten Veränderungen können unmittelbar nach Einwirkung der Schadstoffe oder auch bis zu zwei Generationen später entstehen. Die bromierten FSM wie hydroxylierte PBDE und TBBPA zeigen das Potential, aktiv in den Hormonhaushalt einzugreifen (Hooper und McDonald 2000). Die hormonelle Wirkung der PBDE untersuchten Wissenschaftler aus den Niederlanden, Großbritannien und Schweden im Rahmen eines Forschungsprojektes der EU (RENCO: Risk of Endocrine Contaminants). Die Gefahren der „Endokrin Aktiven Chemikalien“ (EAC) umfassen einerseits ihren Einfluss auf den hormonellen Feedback-Mechanismus im Gehirn, andererseits ihre schädlichen Wirkungen auf den sich entwickelnden Organismus, die entweder sofort oder erst nach Jahren auftreten und irreversibel sein können (Guillette et al. 1995). Im Gegensatz dazu können die PBDE als EAC in erwachsenen Organismen mit vollständig entwickelten physiologischen Prozessen zu Veränderungen führen, die häufig reversibel sind. PBDE 47 und einige andere PBDE-Kongeneren wirken *in vitro* schwach östrogenartig. Die östrogene Potenz der hydroxylierten PBDE ist deutlich höher als die der Ausgangsverbindungen (Meerts et al. 2001). Hydroxylierte PBDE und TBBPA greifen auch aktiv in den Haushalt des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T₄) ein (Hooper und McDonald 2000). Die einzelnen Metabolite der PBDE besitzen eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit T₄ und weisen eine sehr hohe Affinität zum Schilddrüsentransportprotein Transthyretin (TTR) auf (Meerts IATM et al. 1998; Meerts et al. 2000). Die Affinität der hydroxylierten Verbindungen zu TTR ist stärker als die Affinität der unveränderten PBDE (Meerts et al. 2000).

Ein normales Schilddrüsenhormongleichgewicht ist für die Entwicklung vieler Organe wichtig. Die Schilddrüsenfunktion reguliert u. a. in frühen Lebensjahren das Wachstum und die Funktion der Hoden. Wenn Ratten während einer kritischen Phase der neonatalen Entwicklung eine Unterversorgung an Schilddrüsenhormonen aufweisen, zeigen sich im Erwachsenenalter bleibende Veränderungen der Hodengröße und der

Spermienproduktion (Cooke et al. 1992). Auch die normale Entwicklung des Gehirns ist abhängig von der physiologischen Feinregulation des Schilddrüsenhormonhaushalts (Porterfield 2000). Jeder Eingriff in die Schilddrüsenhormonregulation des mütterlichen Organismus spielt eine entscheidende Rolle für die Entstehung von Störungen der neuronalen Entwicklung (Morreale de et al. 2000; Porterfield 2000), da diese Hormone die Gehirnentwicklung der Nachkommen v. a. in der fetalen und neonatalen Phase entscheidend steuern. Durch die Bindung einiger PBDE-Metabolite an TTR (Meerts et al. 2000) werden diese anstelle von T4 über die Plazenta in das Gehirn der Nachkommen transportiert. Auch beim Menschen wurde gezeigt, dass geringe Veränderungen im Schilddrüsenhormongleichgewicht bleibende Schäden im wachsenden Organismus verursachen können (Porterfield 1994; Porterfield 2000). Die Entwicklung des menschlichen Gehirns beginnt in der dritten Woche der Schwangerschaft und dauert bis zum zweiten Lebensjahr. Eine Beeinträchtigung des Schilddrüsenhormonhaushalts in dieser Zeit beeinflusst die Entwicklung des Gehirns, der Intelligenz und der Koordination (Pop et al. 1999; Haddow et al. 1999; Howdeshell 2002).

Für verschiedene PBDE-Kongenere, darunter auch 2,2',4,4',5-BDE 99, ist eine Bindung an den Ah-Rezeptor (Arylhydrocarbon receptor, Dioxin-Rezeptor) nachgewiesen (Meerts et al. 1998; de Wit 2002). Darüber hinaus besteht die Fähigkeit der PBDE, an Schilddrüsenhormonrezeptoren zu binden, wenn auch mit einer geringeren Affinität (Marsh et al. 1998). Nach oraler Exposition von trächtigen Rattenweibchen gegenüber Tetra- und PentaBDE konnte ein verringerter T4-Plasmaspiegel bei den Muttertieren und ihren Nachkommen beobachtet werden (Zhou et al. 2002). Bei Mäusen wurden nach PBDE-Exposition klinische Zeichen einer Hypothyreose mit supprimierten Schilddrüsenhormonspiegeln im Plasma und thyroidaler Hyperplasie sowie ein gehäuftes Auftreten von Schilddrüsenkarzinomen beobachtet (Hallgren et al. 2001). Über eine Induktion der hepatischen Phase I- als auch Phase II-Enzyme können die technischen Mischungen oder individuelle Kongenere der PBDE den Abbau von T4 bei Nagern und in Zelllinien beschleunigen und so eine Hypothyreose verursachen (Fowles et al. 1994; Brouwer et al. 1999; Chen et al. 2001; Zhou et al. 2001; Zhou et al. 2002).

Die kommerziellen PBDE zeigten im Tierexperiment neurotoxische Effekte (Eriksson et al. 2001; Eriksson et al. 2002; Viberg et al. 2003a). Sowohl die motorischen als auch die kognitiven Entwicklungsstörungen von neonatal gegenüber PBDE exponierten Mäusen

bewirkten in der Adoleszenz deutliche Effekte (Eriksson 1997). In Tierversuchen an neugeborenen Mäusen zeigten sich bei Exposition gegenüber PBDE 47, PBDE 99, PBDE 153 und PBDE 209 als Einzelsubstanzen neurotoxische Wirkungen im Lernverhalten, die sich im Laufe der Entwicklung verstärkten (Eriksson et al. 2001; Branchi et al. 2002; Viberg et al. 2003b).

Schon sehr geringe Mengen lösten in einer Studie an Rattennachkommen irreversible Gehirnschäden aus, die zu einer verminderten Lernkapazität sowie hyperaktivem Verhalten führten (Kuriyama et al. 2005). Ausschlaggebend ist scheinbar die Exposition während eines sehr frühen Entwicklungsstadiums, in dem das Gehirn stark wächst. Ein möglicher Weg, auf dem PBDEs die Entwicklung des zentralen Nervensystems beeinflussen können, ist eine Störung verschiedener Neurotransmittersysteme. So wurde bereits ein signifikanter Zusammenhang zwischen verhaltensneurologischen Effekten und Veränderungen im cholinergen Transmittersystem nach Exposition mit PBDEs beschrieben (Eriksson 1997; Viberg et al. 2002).

Einen weiteren möglichen Weg stellt der Eingriff in die Schilddrüsenhormonregulation dar, welcher sowohl bei Nagern als auch beim Menschen zu Störungen der neuronalen Entwicklung führt (Porterfield 2000), da diese Hormone v. a. in der fetalen und neonatalen Phase die Gehirnentwicklung entscheidend steuern. Bei Kindern können vor allem die niedrig (tetra- bis hexa-) bromierten PBDE-Kongenere zu endokrinen Funktionsstörungen und neurologischen Entwicklungsstörungen des zentralen Nervensystems in der prä- und postnatalen Phase führen (Porterfield 1994; Haddow et al. 1999). So werden immer häufiger Schilddrüsenunterfunktionen und Störungen der neuronalen Entwicklung bei Kindern beobachtet, die sich in Lern- und Verhaltensstörungen äußern (Chen et al. 1994; Huisman et al. 1995a; Huisman et al. 1995b).

1.2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In der Ätiologie vieler Krankheiten könnte die Exposition des Menschen gegenüber verschiedenen Chemikalien mit toxikologischen Effekten bereits in niedrigen Dosierungen während kritischer Perioden der Entwicklung eine wichtige Rolle spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung möglicher Störungen und ihrer Manifestation nach einer Exposition gegenüber einer in der Umwelt vorkommenden Konzentration des Kongeners 2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether (PBDE 47) während der prä- und postnatalen Entwicklung von Rattennachkommen. Bei PBDE 47 handelt es sich um das in Sedimenten, fettreichen Lebensmitteln und der Muttermilch dominierende 2,2',4,4'-tetrabromierte Kongener (Darnerud et al. 2001; de Wit 2002).

Um möglichst viele Tiere für die Untersuchung zur Verfügung zu haben, mussten die Dosierungen so gewählt werden, dass eine geringe prä-, peri- und postnatale Mortalität auftrat. Einerseits sollte eine Dosis so hoch liegen, dass eine Schädigung zu erwarten war, andererseits sollte eine Dosierung der eingesetzten Substanz in der Höhe gewählt werden, die dem tatsächlichen Expositionsszenario des Menschen entspricht. Dabei wurde bei der Berechnung der untersuchten Dosierungen die im menschlichen Brustfettgewebe gemessene durchschnittliche Konzentration von 33.3 µg PBDE 47/kg Fett zu Grunde gelegt (She et al. 2002).

Den Muttertieren wurde am sechsten Tag der Trächtigkeit eine Einzeldosis von entweder 140 µg oder 700 µg PBDE 47/kg Körpergewicht (KG) per Schlundsonde verabreicht. Entsprechend waren die Nachkommen dem PBDE 47 prä- (via Nabelschnur) und postnatal (via Muttermilch) ausgesetzt. Die Referenzgruppe wurde von Tag 7 der Trächtigkeit bis zum Ende der Laktation mit 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) im Trinkwasser behandelt. PTU ist ein bekanntes Goitrogen mit gut charakterisierten Wirkungen auf die Schilddrüse, das experimentell häufig als Referenzsubstanz eingesetzt wird und daher auch in dieser Arbeit als Positivkontrolle dient.

Nachfolgend werden aus der umfassenden Studie die Parameter, die für die Erfassung der Wirkung auf die neuro-physiologische Entwicklung der Jungtiere von Bedeutung sind, dargestellt und diskutiert. Darüber hinaus werden geschlechtsspezifische

Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Störungen während der Entwicklung analysiert.

Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungsparameter für die Entwicklung der Jungtiere herangezogen:

- Körper- und Organgewichte der Muttertiere und der Jungtiere an postnatal Tag (PND) 1 und PND 22
- Messung der Konzentration der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3), freies Trijodthyronin (FT3), Thyroxin (T4), freies Thyroxin (FT4) und Thyroidea stimulierendes Hormon (TSH) bei Muttertieren und Jungtieren an PND 1 und PND 22
- Untersuchung der Entwicklungsparameter Augenöffnung, Fell- und Zahnentwicklung, Hodenabstieg bei den Jungtieren
- Untersuchung der basallokomotorischen Aktivität der Jungtiere an PND 35 und PND 70
- Untersuchung des Erkundungsverhaltens der Jungtiere an PND 80
- Untersuchung des Angstverhaltens der Jungtiere an PND 150

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 TIERHALTUNG UND BEHANDLUNG

Weibliche Ratten des Stammes Wistar (HsdCpb:WU; Fa. Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, BRD) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200 ± 15 g wurden in Makrolon[®]-Käfigen Typ III auf Weichholzgranulat-Einstreu 8-15[®] (Fa. Altromin; Lage, BRD) in vollklimatisierten Räumen (Temperatur $21 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, relative Luftfeuchtigkeit $50 \% \pm 5 \%$) unter SPF-Bedingungen (spezifisch pathogenfrei) gehalten. Standard-Futter in Pelletform (Altromin[®] 1324; Fa. Altromin GmbH; Lage, BRD) und Leitungswasser ad libitum standen den Tieren zur Verfügung. Ein Tag-Nacht-Rhythmus wurde während der Sommerzeit bei einer Lichtphase von 9:00 bis 21:00 Uhr und während der Winterzeit von 10:00 bis 22:00 Uhr mithilfe einer Zeitschaltuhr künstlich immer konstant eingehalten.

Nach einer vierzehntägigen Adaptationsphase wurden während der Dunkelphase von 6:00 bis 9:00 Uhr täglich für drei Stunden zwei Weibchen zu einem adulten Rattenbock mit einem Körpergewicht von 340 ± 60 g gesetzt, bis im anschließend durchgeführten Vaginalabstrich Spermien zu erkennen waren. Die darauffolgenden 24 Stunden wurden als Tag 0 einer möglichen Trächtigkeit bezeichnet (Chahoud und Kwasigroch 1977).

Die trächtigen Weibchen wurden zur Behandlung randomisiert in vier gleich große Gruppen mit jeweils 20 Muttertieren aufgeteilt und am Tag 6 der Trächtigkeit per Schlundsonde einmalig mit $140 \mu\text{g}$ (PBDE 140) oder $700 \mu\text{g}$ (PBDE 700) PBDE 47/kg KG (2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether, 99 % Reinheit, Lot Nummer: BP-294, Cambridge Isotope Laboratore, Inc, Andover, MA, USA) in Erdnussöl gelöst behandelt. Das applizierte Volumen betrug 10 ml/kg Körpergewicht. Die Kontrollgruppe erhielt nur das Vehikel Erdnussöl. Die Referenzgruppe wurde ab Tag 7 der Trächtigkeit (GD 7) bis Ende der Laktation (PND 22) mit 5 mg/L PTU (6-n-Propyl-2-Thiouracil, Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Steinheim, BRD) im Trinkwasser (PTU-Konzentration = $916 \mu\text{g/kg/d}$ KG) behandelt. Die Jungtiere der einzelnen Gruppen waren somit den Substanzen sowohl über die Plazenta als auch über die Muttermilch prä- und postnatal ausgesetzt.

Drei Tage vor dem errechneten Wurftermin wurden die trächtigen Tiere in Einzelkäfige gesetzt. Am Ende der Trächtigkeit trugen in der Kontrollgruppe 16, in der PTU-Gruppe 17, in der PBDE 140-Gruppe 19 und in der PBDE 700-Gruppe 18 Muttertiere ihre Jungtiere aus (Tabelle 1). Die ersten 24 Std. nach der Geburt wurden als PND 1 definiert.

Tab. 1: Behandlungsschema und Gruppenverteilung zur Untersuchung der Effekte auf die Entwicklung der Nachkommen nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47.

Gruppe	Substanz	Dosis	Behandlungstag	Muttertiere
Kontrolle	Erdnussöl	10 ml/kg KG	GD 6	16
PTU	6-n-Propyl-2-Thiouracil	916 µg/kg/d KG	GD 7 - PND 22	17
PBDE 140	PBDE 47	140 µg/kg KG	GD 6	19
PBDE 700	PBDE 47	700 µg/kg KG	GD 6	18

Das Tierexperiment wurde nach Tierschutzgesetz BGBl. IS. 3082. vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Nummer G 0012/00 am 11.10.2004 genehmigt.

2.2 BLUT- UND ORGANENTNAHME

An PND 1 wurden nach Ermittlung der Körpergewichte ungefähr die Hälfte der Muttertiere (Kontrolle = 9, PTU = 9, PBDE 140 = 10 und PBDE 700 = 9) und ihr jeweiliger Wurf durch Dekapitation getötet. Das Serum der einzelnen Muttertiere wurde in fünf Aliquots aufgeteilt und bei –20 °C aufbewahrt. Den Muttertieren wurden nach einem Bauchschnitt Leber und Schilddrüse entnommen, gewogen und bei –80 °C eingefroren. Das Serum der Nachkommen gleichen Wurfes wurde nach Geschlecht getrennt gepoolt, in fünf Aliquots aufgeteilt und bei –20 °C aufbewahrt. Am Ende der Laktation (PND 22) wurden nach Ermittlung der Körpergewichte die restlichen Muttertiere (Kontrolle = 7, PTU = 8, PBDE 140 = 9 und PBDE 700 = 9) und jeweils zwei weibliche und zwei männliche Nachkommen aus ihren Würfen durch Dekapitation getötet. Das Serum der einzelnen Muttertiere wurde in fünf Aliquots aufgeteilt und bei

–20 °C aufbewahrt. Den Muttertieren wurden die gleichen Organe wie an PND 1 und den Nachkommen Leber und Gehirn (nach Geschlecht gleichen Wurfes gepoolt) entnommen, gewogen und bei –80 °C eingefroren. Mit dem Serum der Nachkommen wurde wie an PND 1 verfahren.

2.3 BESTIMMUNG DER SCHILDDRÜSENHORMONE

Die Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum der Muttertiere und der Nachkommen wurde am Anfang (PND 1) und Ende der Laktation (PND 22) bestimmt. Das bei der Dekapitation der Tiere aufgefangene Blut wurde zur Gerinnung für zwei Stunden in ein Eisbad mit einer Temperatur von 4 °C gestellt, anschließend zentrifugiert (2500 rpm für 15 min) und bei –20 °C aufbewahrt.

Mittels ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) Kit wurden nach Anleitung des Herstellers (DRG Diagnostics GmbH, Deutschland) die Schilddrüsenhormone T3 (Trijodthyronin), FT3 (Freies Trijodthyronin), T4 (Thyroxin), FT4 (Freies Thyroxin) und TSH (Thyroidea stimulierendes Hormon) bestimmt. In diesem heterogenen Enzym-Immunassay wurde die zu untersuchende Serumprobe mit dem nachzuweisenden Antigen, im vorliegenden Fall das Schilddrüsenhormon unbekannter Menge und ein mit einem Enzym markiertes Kompetitor-Antigen bekannter Menge, auf den coating-Antikörper, der an die feste Phase einer Mikrotiterplatte gebunden war, geschüttet und dort zum Inkubieren belassen. Am Ende der Inkubationsphase nach Abschluss der Konkurrenz zwischen den beiden Antigenen um einen Bindungsplatz am coating-Antikörper und der Bildung von Antigen-Antikörper-Reaktionen wurde die Platte gewaschen und nur das am coating-Antikörper gebundene enzym-gekoppelte Kompetitor-Antigen blieb auf den Wells zurück. Anschließend wurde auf den entstandenen Immunkomplex ein Antikörper mit einer photometrischen Substanz gegeben. Diese reagierte auf der Mikrotiterplatte zu einem Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (sog. Sandwichmethode). Die gesuchte Konzentration des Antigens, d. h. die Konzentration des Schilddrüsenhormons im Serum, ist indirekt proportional zur photometrisch gemessenen optischen Dichte (OD) und wurde nach Erstellung einer Standard-Kurve abgelesen (Spectrophotometer).

2.4 WIRKUNGEN VON PBDE AUF DIE POSTNATALE ENTWICKLUNG DER NACHKOMMEN

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Behandlung mit PBDE auf die postnatale Entwicklung der Nachkommen wurden die Entwicklungsparameter Augenöffnung, Fellentwicklung, Zahnentwicklung und Hodenabstieg erfasst. Darüber hinaus wurden die neurologischen Entwicklungsendpunkte basallokomotorische Aktivität, Erkundungsverhalten und Angstverhalten der Nachkommen während der Pubertät und im Erwachsenenalter untersucht. Auf diese Weise wurde der Langzeiteffekt von PBDE auf die Nachkommen nach Exposition im Mutterleib untersucht.

2.4.1 BESTIMMUNG DER ENTWICKLUNGSPARAMETER DER NACHKOMMEN

Der Lebenstag, an dem ein erstes Auseinanderweichen der Membran, die die Augen des neugeborenen Jungtieres verschließt, zu erkennen war, wurde als Tag der Augenöffnung bezeichnet. Der Tag, an dem erster weißer Flaum am Jungtier zu sehen war, wurde als Tag der Fellentwicklung bezeichnet. Der Lebenstag, an dem am Unter- oder Oberkiefer des Jungtieres ein erstes Durchbrechen der Schneidezähne zu ertasten war, wurde als Tag der Zahnentwicklung, und der Tag, an dem der Hoden im Skrotum zu tasten war, als Tag des Hodenabstieges bezeichnet. Alle Daten wurden bis einschließlich Tag 21 postnatal erfasst und in drei bis vier Klassen (nach PND sortiert) eingeteilt. Die Daten von männlichen und weiblichen Jungtieren wurden für die Parameter Augenöffnung, Fellentwicklung und Schneidezahndurchbruch zusammengefasst und als kumulative Ereignisse präsentiert.

2.4.2 BASALLOKOMOTORISCHE AKTIVITÄT (MOBILITRON)

An PND 35 und 70 wurde nach einer Gewöhnungsphase von 24 Stunden die Bewegungsaktivität je eines weiblichen und eines männlichen Nachkommens pro Wurf (Kontrolle = 17, PTU = 17, PBDE 140 = 22 und PBDE 700 = 18) an PND 35 und 15 Tiere pro Geschlecht und Gruppe an PND 70 für 24 Stunden in einem Apparat, genannt Mobiltron[®] (Abb. 2), unter ansonsten unveränderten Umweltbedingungen einzeln gemessen. Die Messtechnik basiert auf der Verwendung von drei Infrarot-Lichtschranken, die auf die Längsachse eines Käfiges verteilt und so miteinander

verschaltet wurden, dass ein Impuls nur dann ausgelöst wurde, wenn das Tier eine Lichtschranke verließ und anschließend eine andere erreichte (LBI = total light beam interruptions). Mit dieser Versuchsanordnung wurde sichergestellt, dass ausschließlich die lokomotorische Aktivität eines Tieres gemessen wurde und keine Ruhephase. Der Apparat ermöglichte eine gleichzeitige Untersuchung der lokomotorischen Aktivität von 48 einzelnen Tieren (Thiel et al. 1989). Die Berechnung der Bewegungsaktivität jedes einzelnen Tieres erfolgte mit Hilfe eines an das Mobiltron[®] angeschlossenen Computers in 5-min-Intervallen. Die lokomotorische Aktivität wurde als totale Unterbrechung der Lichtschranken (LBI) und Dauer der Aktivität pro Tag und pro Phase ausgedrückt. Eine Phase ist definiert als Beginn der Bewegung des Tieres (LBI messbar) bis zur nächsten Bewegungspause (LBI nicht messbar).

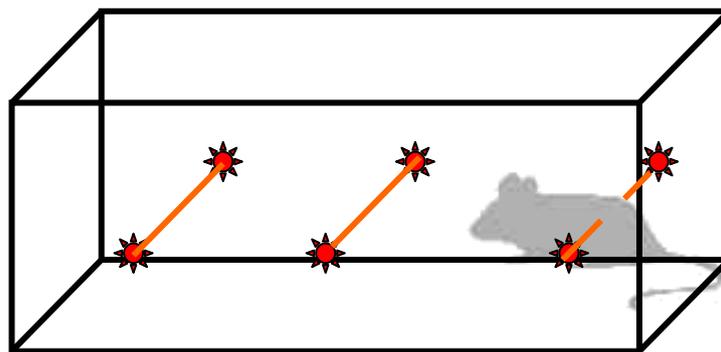


Abb. 2: Schematische Darstellung des Untersuchungsgerätes für basallokomotorische Aktivität (Mobiltron)

2.4.3 ERKUNDUNGSVERHALTEN (OPEN FIELD)

An PND 80 wurde das Erkundungsverhalten von 15 weiblichen und 15 männlichen Tieren pro Gruppe untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Tiere morgens zwischen 9:00 und 11:00 Uhr nacheinander für fünf Minuten in die Mitte einer runden Arena mit 1 m Durchmesser gesetzt (Abb. 3). Die Fläche dieser Arena (Open Field) war in 19 gleiche zentrale und periphere Sektoren, umgeben von einer 40 cm hohen weißen Mauer, eingeteilt und mit einer weißen 60-W-Glühbirne im Abstand von 80 cm beleuchtet. Während des Versuches wurden die Tiere mit einer DVD-Kamera (Sony, DCR-DVD 101) gefilmt und anschließend wurde jeweils die Anzahl der überquerten

Sektoren als zurückgelegte Strecke, die Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine, die Zeit der eigenen Fellpflege, die Zeit des Aufenthaltes im Zentrum und die Anzahl der abgesetzten Kot-Kügelchen ausgewertet. Nach jeder Aufnahme wurden die Flächen mit einer Ethanol Lösung (10 %) gereinigt, um eine geruchsbedingte Beeinflussung der Tiere zu verhindern.



Abb. 3: Arena zur Untersuchung des Erkundungsverhaltens (Open Field)

2.4.4 ANGSTVERHALTEN (ELEVATED PLUS MAZE)

An PND 150 wurde das Angstverhalten von 15 weiblichen und 15 männlichen Tieren pro Gruppe durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere nacheinander für fünf Minuten in die Mitte eines Apparates gesetzt, der 60 cm über dem Boden auf einer Stütze installiert wurde und aus zwei wandlosen und zwei seitlich geschlossenen Armen bestand (Abb. 4). Für die Untersuchung des Angstverhaltens wurde die Zeit des Aufenthaltes jeweils in den geschlossenen oder offenen Armen sowie die Anzahl der jeweiligen Wechsel gemessen.



Abb. 4: Apparat zur Untersuchung des Angstverhaltens (Elevated Plus Maze)

2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die parametrischen Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung ($M \pm SD$) ausgedrückt und mittels ANOVA (Analysis of Variance) verglichen. Gleichzeitig wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Dunnett-t-Test getestet und bei $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %) als statistisch signifikant angesehen.

Die nicht parametrischen Werte wurden einem Kruskal-Wallis-Test unterzogen und die Signifikanz gleichzeitig mit dem Mann-Whitney-U-Test gegen die Kontrolle getestet, und die Unterschiede wurden ebenfalls als statistisch signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$.

Die Verteilungseigenschaften der Entwicklungsparameter wurden mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) untersucht.

Die statistische Analyse und die Erstellung der Abbildungen erfolgten mit dem SPSS-Programm der Version 11.5 für Windows.

3 ERGEBNISSE

3.1 KÖRPER- UND ORGANGEWICHTE

Zu Beginn der Laktation (PND 1) trat, wie erwartet, im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Erhöhung sowohl des absoluten als auch des relativen Schilddrüsengewichtes bei den mit PTU behandelten Muttertieren auf.

An PND 22 waren die Körpergewichte der Muttertiere in der PTU- und der PBDE 700-Gruppe signifikant verringert im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die absoluten Lebergewichte in der PBDE 700-Gruppe waren statistisch signifikant verringert, während das absolute und relative Gewicht der Schilddrüse unter PTU eine signifikante Erhöhung aufwies. Im Gegensatz dazu trat unter PTU-Einfluss eine signifikante Erhöhung des relativen Lebergewichtes auf. Nach Behandlung mit 140 µg PBDE 47/kg KG wurden bei den Muttertieren keine Veränderungen an Körper- oder Organgewichten festgestellt (Tab. 2).

Tab. 2: Körpergewichte sowie absolute und relative Organgewichte der Muttertiere während der Laktation an PND 1 und 22 nach Behandlung mit einer Einzeldosis von 140 oder 700 µg PBDE 47/kg KG am Tag 6 der Trächtigkeit (GD 6) oder mit 5 mg/L PTU im Trinkwasser von GD 7 bis PND 22.

	n	Kontrolle	n	PTU	n	PBDE 140	n	PBDE 700	
PND 1	Körpergewicht (g)	9	233,1 ± 24,7	9	216,4 ± 12,0	10	228,2 ± 18,0	9	219,6 ± 25,4
	Leber (g)	9	9,5 ± 1,6	9	8,9 ± 1,4	10	9,0 ± 1,4	9	9,5 ± 1,5
	Leber (%)	9	4,1 ± 0,4	9	4,1 ± 0,5	10	3,9 ± 0,5	9	4,3 ± 0,4
	Schilddrüse (mg)	9	6,1 ± 1,2	9	11,1 ± 1,9*	10	5,9 ± 0,6	9	6,0 ± 0,8
	Schilddrüse (‰)	9	2,6 ± 0,6	9	5,1 ± 0,7*	10	2,6 ± 0,3	9	2,7 ± 0,6
PND 22	Körpergewicht (g)	7	279,4 ± 16,8	8	252,8 ± 6,6*	9	272,8 ± 14,2	9	257,0 ± 11,4*
	Leber (g)	7	14,2 ± 1,6	8	13,8 ± 0,7	9	13,9 ± 1,4	9	12,7 ± 0,7*
	Leber (%)	7	5,1 ± 0,3	8	5,5 ± 0,2*	9	5,1 ± 0,4	9	4,9 ± 0,3
	Schilddrüse (mg)	7	6,2 ± 0,6	8	16,1 ± 4,3*	9	5,8 ± 1,3	9	5,0 ± 1,5
	Schilddrüse (‰)	7	2,2 ± 0,3	8	6,4 ± 1,7*	9	2,1 ± 0,5	9	1,8 ± 0,6

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung.

* P < 0,05, ANOVA und Dunnett-t-Test.

An PND 1 war das Körpergewicht der männlichen und weiblichen Nachkommen in der PTU- und PBDE 700-Gruppe signifikant verringert. In der PBDE 140-Gruppe wurde dagegen eine signifikante Erhöhung des Körpergewichtes bei weiblichen und männlichen Nachkommen beobachtet (Tab. 3).

Tab. 3: Körpergewichte (g) der männlichen und weiblichen Nachkommen an PND 1 nach prä- und postnataler Exposition gegenüber PBDE 47 oder PTU.

	n	Kontrolle	n	PTU	n	PBDE 140	n	PBDE 700
♂ Männl.	46	6,3 ± 0,8	52	5,7 ± 0,5*	49	6,7 ± 0,5*	45	5,9 ± 0,8*
♀ Weibl.	52	6,0 ± 0,6	54	5,5 ± 0,6*	50	6,4 ± 0,5*	54	5,5 ± 0,7*

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung.

* P < 0,05, ANOVA und Dunnett-t-Test.

An PND 22 lag eine signifikante Verringerung des Körpergewichtes der männlichen und weiblichen Nachkommen nach Behandlung in der PTU- und PBDE 700-Gruppe vor.

Bei den männlichen Nachkommen war nach Exposition gegenüber PTU und PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe das absolute Gehirngewicht signifikant verringert, während das relative Gehirngewicht eine signifikante Erhöhung aufwies. Das absolute Lebergewicht war in diesen Behandlungsgruppen signifikant verringert, das relative Lebergewicht jedoch unverändert.

Bei den weiblichen Nachkommen wurde nur nach Exposition gegenüber PTU eine signifikante Verringerung des absoluten Gehirngewichts beobachtet, während die relativen Gehirngewichte in allen drei Behandlungsgruppen signifikant erhöht waren. Die absoluten Lebergewichte zeigten eine signifikante Verringerung nach Exposition gegenüber PTU und PBDE 47 in der Gruppe PBDE 700, die relativen Lebergewichte waren, wie bei den männlichen Nachkommen, unverändert (Tab. 4).

Tab. 4: Körper- und Organgewichte der männlichen und weiblichen Nachkommen an PND 22 nach prä- und postnataler Exposition gegenüber PBDE 47 oder PTU.

	Gewicht	n	Kontrolle	n	PTU	n	PBDE 140	n	PBDE 700
♂ Männlich	Körper (g)	14	42,6 ± 3,7	16	35,1 ± 5,2*	18	39,7 ± 5,8	18	37,2 ± 4,6*
	Gehirn (g)	14	1,42 ± 0,06	16	1,34 ± 0,06*	18	1,38 ± 0,10	18	1,37 ± 0,05*
	Gehirn (%)	14	3,35 ± 0,31	16	3,88 ± 0,51*	18	3,51 ± 0,36	18	3,74 ± 0,37*
	Leber (g)	14	1,47 ± 0,2	16	1,25 ± 0,3*	18	1,41 ± 0,2	18	1,30 ± 0,2*
	Leber (%)	14	3,4 ± 0,3	16	3,3 ± 0,7	18	3,6 ± 0,3	18	3,5 ± 0,2
♀ Weiblich	Körper (g)	14	42,2 ± 3,5	16	34,7 ± 4,2*	18	38,7 ± 5,5	18	36,6 ± 3,7*
	Gehirn (g)	14	1,36 ± 0,06	16	1,32 ± 0,06*	18	1,37 ± 0,07	18	1,32 ± 0,06
	Gehirn (%)	14	3,24 ± 0,25	16	3,85 ± 0,48*	18	3,59 ± 0,39*	18	3,64 ± 0,38*
	Leber (g)	14	1,48 ± 0,21	16	1,23 ± 0,30*	18	1,41 ± 0,23	18	1,33 ± 0,17*
	Leber (%)	14	3,49 ± 0,30	16	3,31 ± 0,75	18	3,65 ± 0,26	18	3,63 ± 0,25

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung.

* P < 0,05, ANOVA und Dunnett-t-Test.

3.2 SCHILDDRÜSENHORMONE

Bei den Muttertieren kam es nach Behandlung mit PTU an PND 1 und 22 zu einer signifikanten Verringerung der Konzentrationen von T4 und FT4. Die Behandlung mit PBDE 47 in der Gruppe PBDE 700 führte nur an PND 1 zu einer signifikanten Abnahme der Konzentrationen von T4 und TSH (Tab. 5).

Tab. 5: Konzentrationen der Schilddrüsenhormone der Muttertiere an PND 1 und 22 nach Behandlung mit einer Einzeldosis von 140 oder 700 µg PBDE 47/kg KG an GD 6 oder mit 5 mg PTU/LTrinkwasser von GD 7 bis PND 22.

Hormone	n	Kontrolle	n	PTU	n	PBDE 140	n	PBDE 700	
PND 1	T3 ng/ml	8	4,37 ± 0,61	9	4,33 ± 0,35	10	4,48 ± 1,08	9	4,00 ± 0,48
	FT3 pg/ml	8	2,11 ± 0,47	9	2,15 ± 0,86	10	2,66 ± 0,50	9	2,13 ± 0,77
	T4 ng/ml	8	108,6 ± 17,28	9	57,90 ± 15,39*	10	103,60 ± 24,59	9	82,62 ± 16,98*
	FT4 pg/ml	8	24,72 ± 3,29	9	17,27 ± 4,04*	10	25,24 ± 4,12	9	23,77 ± 3,29
	TSH ng/ml	8	32,58 ± 8,74	9	39,89 ± 11,48	10	35,96 ± 9,85	9	12,60 ± 10,96*
	PND 22	T3 ng/ml	7	4,15 ± 0,49	8	3,59 ± 0,69	9	4,63 ± 0,61	9
FT3 pg/ml		7	3,08 ± 0,85	8	3,89 ± 1,24	9	3,35 ± 0,47	9	3,68 ± 0,62
T4 ng/ml		7	71,84 ± 11,15	8	41,87 ± 5,62*	9	70,54 ± 5,94	9	74,41 ± 12,20
FT4 pg/ml		7	22,91 ± 4,74	8	13,98 ± 3,72*	9	27,80 ± 3,76	9	23,37 ± 4,43
TSH ng/ml		7	28,36 ± 19,40	8	19,52 ± 12,66	9	27,61 ± 14,76	9	34,65 ± 23,81

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung.

* P < 0,05, ANOVA und Dunnett-t-Test.

Bei den männlichen Nachkommen führte die Exposition gegenüber PTU an PND 1 zu einer statistisch signifikanten Abnahme der T4-Konzentration im Blut, während es in der PBDE 700-Behandlungsgruppe zu einer signifikanten Abnahme der T3- Konzentration kam. Bei den weiblichen Nachkommen wurden an PND 1 keine signifikanten Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen beobachtet (Tab. 6).

Tab. 6: Konzentrationen der Schilddrüsenhormone männlicher und weiblicher Nachkommen an PND 1 nach prä- und postnataler Exposition gegenüber PBDE 47 oder PTU.

Hormone		n	Kontrolle	n	PTU	n	PBDE 140	n	PBDE 700
Männlich ♂	T3 ng/ml	7	2,39 ± 0,14	8	2,03 ± 0,70	6	1,82 ± 0,57	9	1,28 ± 0,43*
	FT3 pg/ml	7	0,45 ± 0,21	8	0,52 ± 0,14	9	0,61 ± 0,20	8	0,65 ± 0,40
	T4 ng/ml	8	40,03 ± 4,72	8	30,71 ± 4,51*	9	39,12 ± 5,55	9	37,57 ± 4,98
	FT4 pg/ml	8	4,04 ± 2,48	7	2,61 ± 1,76	8	2,16 ± 1,18	8	2,67 ± 1,40
	TSH ng/ml	5	8,36 ± 6,44	4	8,40 ± 1,05	4	9,10 ± 4,75	4	5,40 ± 2,63
	Weiblich ♀	T3 ng/ml	8	1,65 ± 0,79	5	2,06 ± 0,49	8	1,64 ± 0,54	8
FT3 pg/ml		7	0,61 ± 0,09	5	0,46 ± 0,22	6	0,54 ± 0,28	7	0,51 ± 0,12
T4 ng/ml		8	39,92 ± 4,81	5	36,92 ± 5,92	8	39,34 ± 3,11	8	36,12 ± 3,79
FT4 pg/ml		7	2,50 ± 2,12	3	2,09 ± 0,28	8	2,29 ± 1,58	9	1,68 ± 0,69
TSH ng/ml		3	11,37 ± 5,20	2	3,99 ± 0,56	4	8,92 ± 1,40	4	9,55 ± 3,10

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung.

* P < 0,05, ANOVA und Dunnett-t-Test.

An PND 22 waren die Konzentrationen von T4 und FT4 unter PTU-Einfluss sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Nachkommen signifikant verringert. Bei den männlichen Nachkommen war in der PBDE 140-Behandlungsgruppe die Konzentration von TSH signifikant reduziert. Bei den weiblichen Nachkommen waren an PND 22 die Konzentrationen von FT3 in der PBDE 140-Gruppe signifikant erhöht.

Nach der Exposition gegenüber PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe wurden an PND 22 weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Nachkommen Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen beobachtet (Tab. 7).

Tab. 7: Konzentrationen der Schilddrüsenhormone männlicher und weiblicher Nachkommen an PND 22 nach prä- und postnataler Exposition gegenüber PBDE 47 oder PTU.

Hormone		n	Kontrolle	n	PTU	n	PBDE 140	n	PBDE 700
Männlich ♂	T3 ng/ml	7	4,55 ± 0,40	8	4,32 ± 0,66	9	4,46 ± 0,43	9	4,44 ± 0,96
	FT3 pg/ml	7	2,16 ± 0,57	8	2,04 ± 0,38	9	2,46 ± 0,42	9	2,54 ± 0,33
	T4 ng/ml	7	89,23 ± 8,31	8	41,78 ± 4,43*	9	96,18 ± 13,88	9	100,73 ± 8,23
	FT4 pg/ml	7	15,11 ± 3,62	8	7,84 ± 2,37*	9	17,07 ± 3,06	9	18,54 ± 3,80
	TSH ng/ml	7	31,43 ± 11,44	8	23,50 ± 6,74	9	20,16 ± 4,18*	9	23,66 ± 7,76
	Weiblich ♀	T3 ng/ml	7	3,64 ± 0,77	8	3,64 ± 0,56	9	3,36 ± 0,77	9
FT3 pg/ml		7	2,85 ± 0,39	8	2,47 ± 0,30	9	3,49 ± 0,61*	9	2,97 ± 0,49
T4 ng/ml		7	86,16 ± 8,55	8	45,79 ± 4,27*	9	97,52 ± 12,74	9	94,13 ± 8,31
FT4 pg/ml		7	14,86 ± 4,23	8	6,54 ± 1,84*	9	16,46 ± 4,31	9	15,35 ± 2,80
TSH ng/ml		7	23,97 ± 9,87	8	23,23 ± 3,25	9	18,15 ± 4,00	9	22,92 ± 9,15

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung.

* P < 0,05, ANOVA und Dunnett-t-Test.

3.3 POSTNATALE ENTWICKLUNG DER NACHKOMMEN

3.3.1 ENTWICKLUNGSENDPUNKTE

Die Entwicklungsparameter Augenöffnung, Fellentwicklung, Zahnentwicklung und Hodenabstieg der Nachkommen nach Exposition gegenüber PBDE 47 und PTU sind in den Abbildungen 5 - 8 dargestellt.

Die Behandlung in den Gruppen PBDE 140, PBDE 700 und PTU führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikant späteren Auftreten der Entwicklungsparameter Augenöffnung und Zahnentwicklung (Abb. 5 und 7), während die Fellentwicklung bei allen PBDE-Behandlungsgruppen signifikant früher auftrat (Abb. 6).

In der PBDE 700-Gruppe kam es zu einem signifikant früheren Auftreten des Hodenabstiegs der männlichen Nachkommen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb. 8).

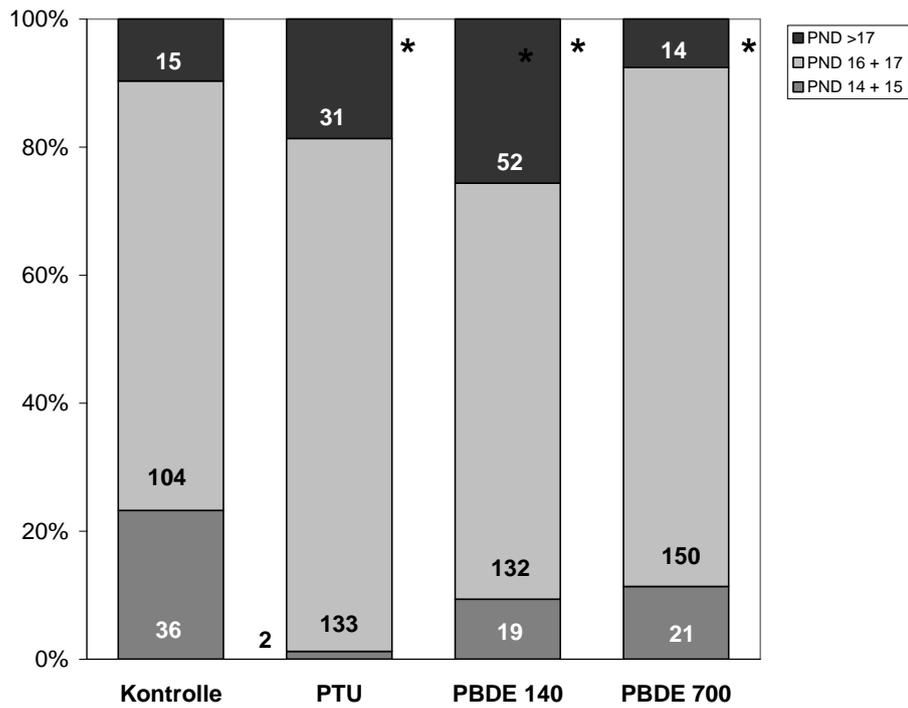


Abb. 5: Kumulative Augenöffnung (%) der weiblichen und männlichen Nachkommen nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU, N = Angabe in den Balken, * P < 0,05, χ^2 -Test.

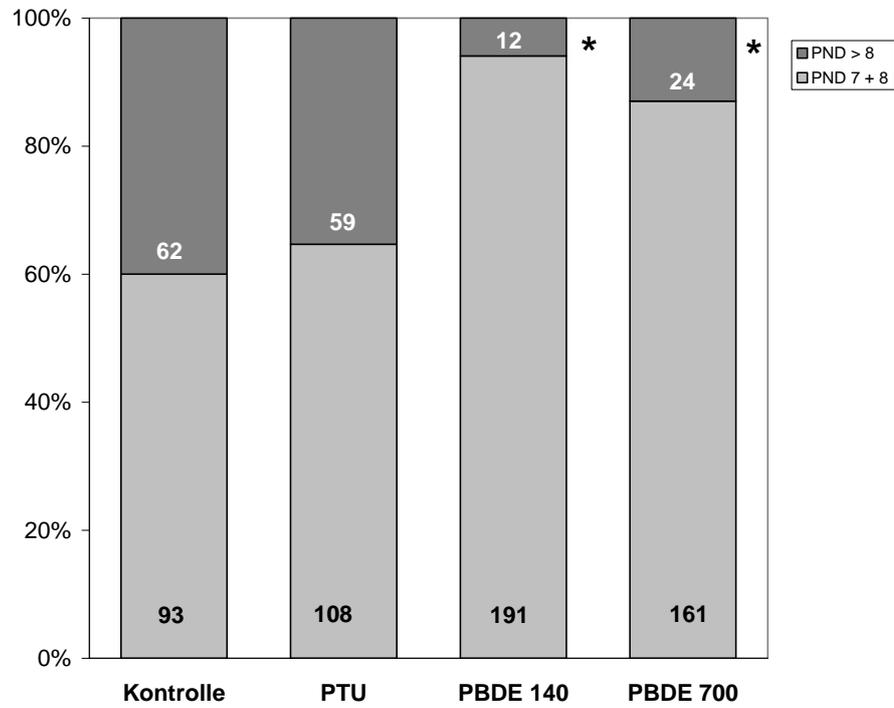


Abb. 6: Kumulative Fellentwicklung (%) der weiblichen und männlichen Nachkommen nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU, N = Angabe in den Balken, * P < 0,05, χ^2 -Test

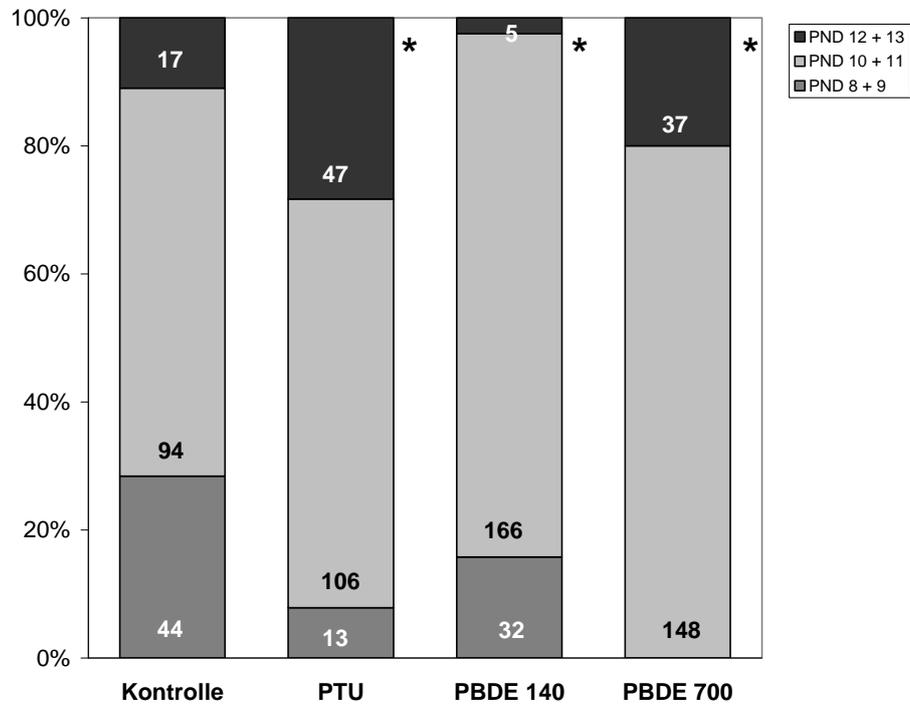


Abb. 7: Kumulative Zahnentwicklung (%) der weiblichen und männlichen Nachkommen nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU, N = Angabe in den Balken, * P < 0,05, χ^2 -Test

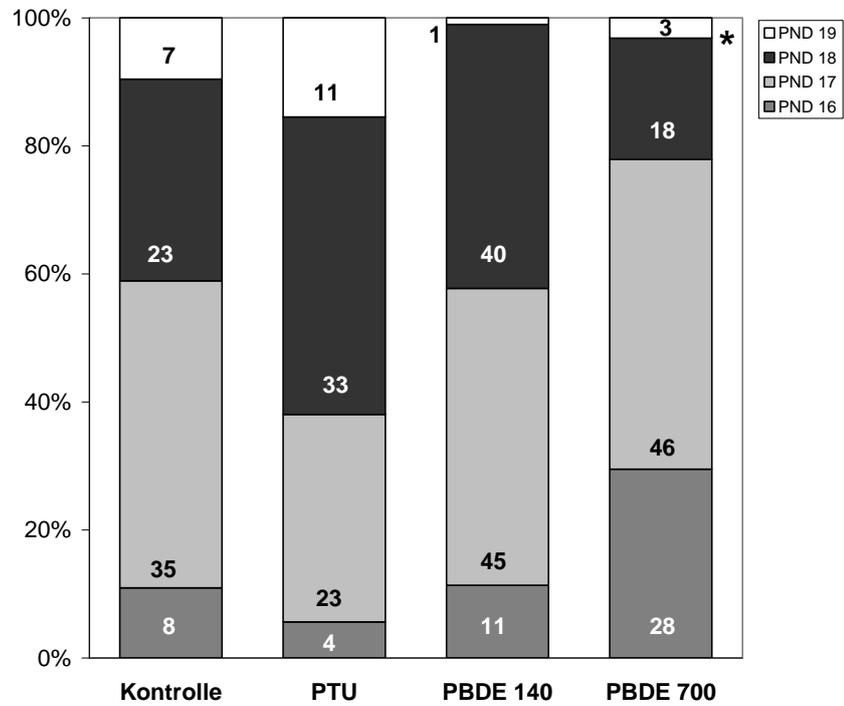


Abb. 8: Kumulativer Hodenabstieg (%) der männlichen Nachkommen nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU, N = Angabe in den Balken, * $P < 0,05$, χ^2 -Test

3.3.2 BASALLOKOMOTORISCHE AKTIVITÄT (MOBILITRON)

Die basallokomotorische Aktivität der weiblichen und männlichen Nachkommen wurden an PND 35 und PND 70 nach prä- und postnataler Exposition gegenüber PBDE 47 und PTU über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen und dargestellt (Abb. 9 und 10).

Die Behandlung in der Gruppe PBDE 700 führte im Vergleich zu den Kontrolltieren an PND 35 sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Nachkommen zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl der LBI pro Tag und pro Phase. In der Gruppe PBDE 140 und PTU war die Anzahl der LBI der weiblichen und männlichen Nachkommen unverändert. Die Dauer der Aktivität pro Tag und Phase war bei den weiblichen Nachkommen an PND 35 nach prä- und postnataler Exposition gegenüber PTU und PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe signifikant erhöht. Bei den männlichen Nachkommen kam es nach Behandlung an PND 35 zu keinen Veränderungen der Aktivitätsdauer im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9).

An PND 70 kam es bei den weiblichen Nachkommen nach prä- und postnataler Exposition gegenüber PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an LBI pro Tag und Phase statt (Abb. 10). Der Unterschied der weiblichen Nachkommen zu der unveränderten LBI-Anzahl der männlichen Nachkommen war ebenfalls statistisch signifikant. Unter PTU-Behandlung hingegen zeigten die weiblichen Nachkommen eine signifikante Erhöhung der LBI-Anzahl pro Phase, während bei den männlichen Nachkommen eine signifikant höhere LBI-Anzahl pro Tag beobachtet wurde. Nach Behandlung in der PBDE 140-Gruppe war bei beiden Geschlechtern die LBI-Anzahl pro Tag und Phase gegenüber der Kontrolle unverändert. Die weiblichen Nachkommen zeigten jedoch eine statistisch signifikant höhere LBI-Anzahl pro Tag als die männlichen Tiere.

Die Dauer der Aktivität pro Tag und Phase war bei den weiblichen Nachkommen an PND 70 nach Exposition gegenüber PBDE 47 in der PBDE 140-Gruppe und PTU signifikant erhöht, bei den männlichen Nachkommen wurde eine signifikante Erhöhung der Dauer der Aktivität pro Tag nach Behandlung mit PTU beobachtet. Nach prä- und postnataler Behandlung mit PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe kam es nur bei den weiblichen Nachkommen zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität pro Phase, während die Behandlung mit PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe bei den männlichen

Nachkommen keine Veränderungen der Aktivitätsdauer verursachte. Die Unterschiede der Auswirkungen von PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe auf die Dauer der Aktivität pro Tag und Phase zwischen weiblichen und männlichen Nachkommen waren statistisch signifikant (Abb. 10).

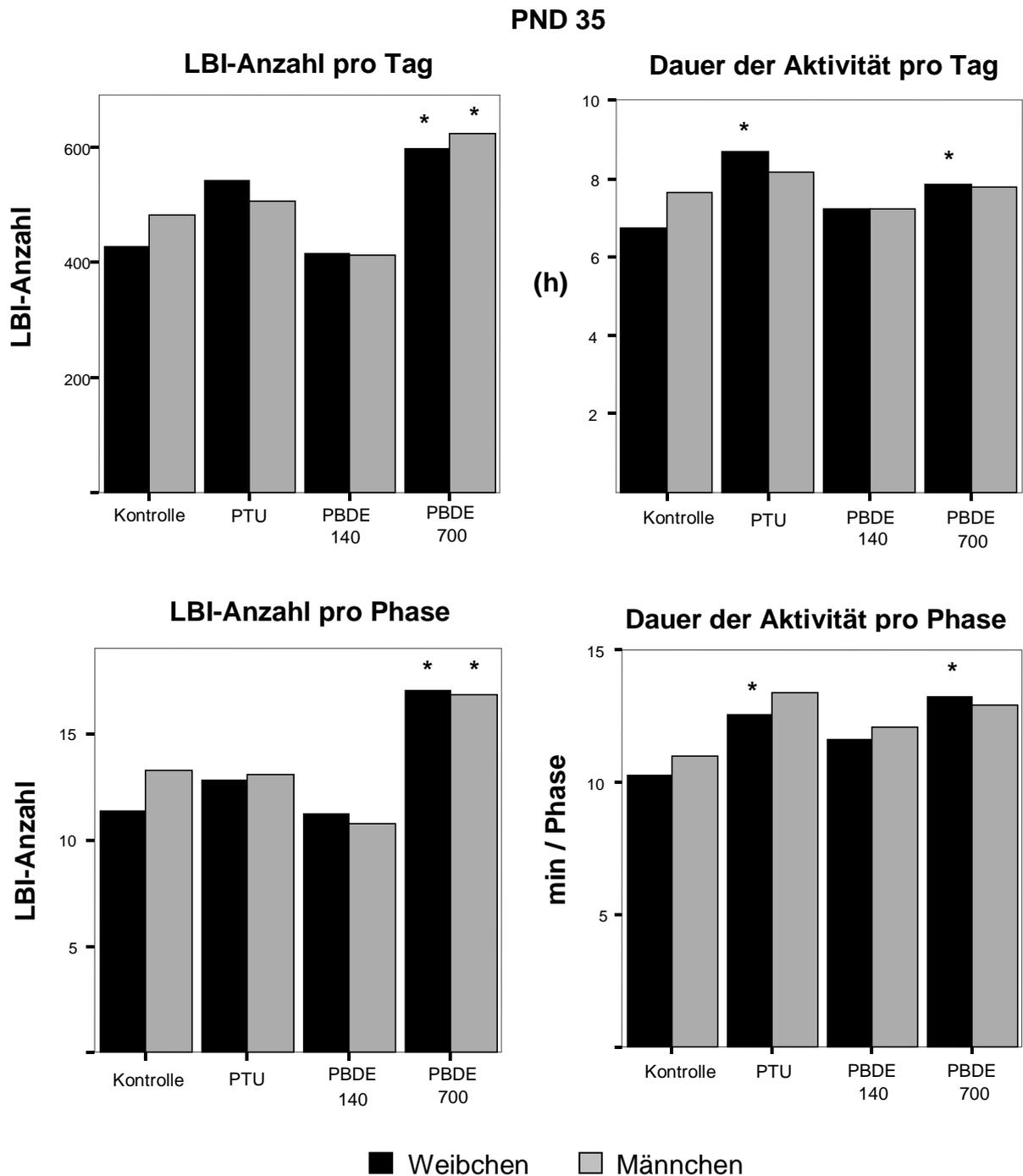


Abb. 9: Basallokomotorische Aktivität von Rattennachkommen (Median, Kontrolle N = 17, PTU = 17, PBDE 140 = 22, PBDE 700 = 18) an PND 35 nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU als Anzahl totaler LBI-Unterbrechungen pro Tag und Phase sowie Dauer der Aktivität pro Tag (h) und Phase (min), * P < 0,05, Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test.

PND 70

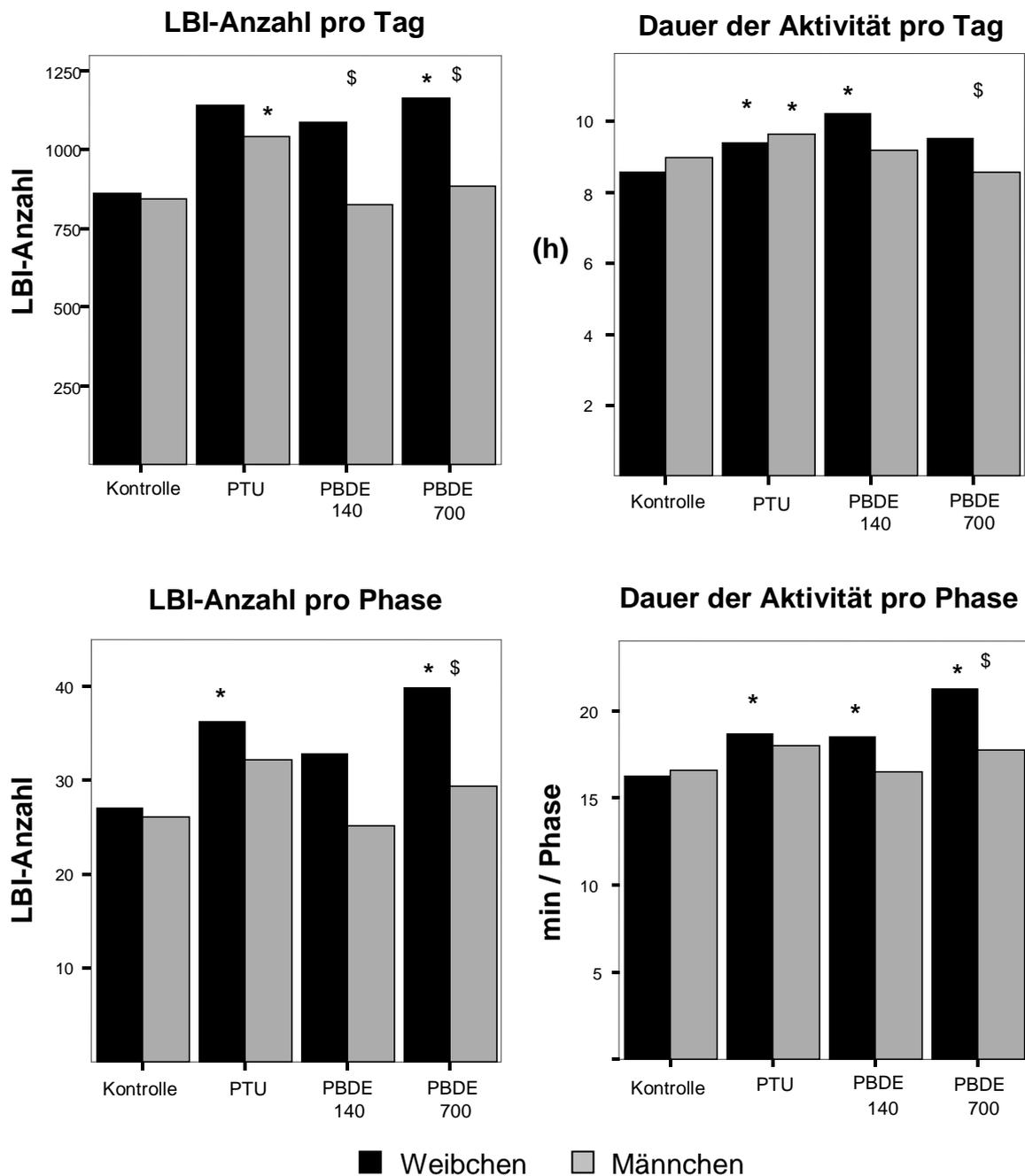


Abb. 10: Basallokomotorische Aktivität von Rattennachkommen (Median, 15 Tiere pro Geschlecht und Gruppe) an PND 70 nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU als Anzahl totaler LBI-Unterbrechungen pro Tag und Phase sowie Dauer der Aktivität pro Tag (h) und Phase (min). * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test; \$ $P < 0,05$ bei Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen der gleichen Gruppe, Mann-Whitney-U-Test.

3.3.3 ERKUNDUNGSVERHALTEN (OPEN FIELD)

Das Erkundungsverhalten, als Anzahl der Sektorenüberschreitungen (Lokomotion) im „Open Field Test“, sowie die Parameter des emotionalen Verhaltens Aufrichten, Dauer der Fellpflege, Aufenthaltsdauer im Zentrum und Anzahl der abgesetzten Kotkugeln sind in Abb. 11 und Tab. 8 dargestellt.

Nach prä- und postnataler Behandlung mit PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe wurde an PND 80 sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Nachkommen eine signifikante Erhöhung der Anzahl an Sektorenüberschreitungen beobachtet. In der PTU-Gruppe zeigten die männlichen Nachkommen eine signifikante Erhöhung dieses Verhaltensparameters. Die Lokomotion war zwischen weiblichen und männlichen Nachkommen in der Kontrollgruppe und nach PTU-Behandlung signifikant unterschiedlich. Die Exposition gegenüber PBDE 47 in der Gruppe PBDE 140 hatte bei beiden Geschlechtern keinen Einfluss auf die Anzahl der Sektorenüberschreitungen im Open Field Test (Abb. 11).

Nach prä- und postnataler Behandlung war bei den weiblichen Nachkommen in allen Behandlungsgruppen die Dauer der Fellpflege im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert, bei den männlichen Nachkommen jedoch unverändert. Die Behandlung mit PBDE 47 oder PTU führte weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Nachkommen zu einer Veränderung der Häufigkeit des Aufrichtens, der Aufenthaltsdauer im Zentrum oder des Kotabsatzes (Tab. 8).

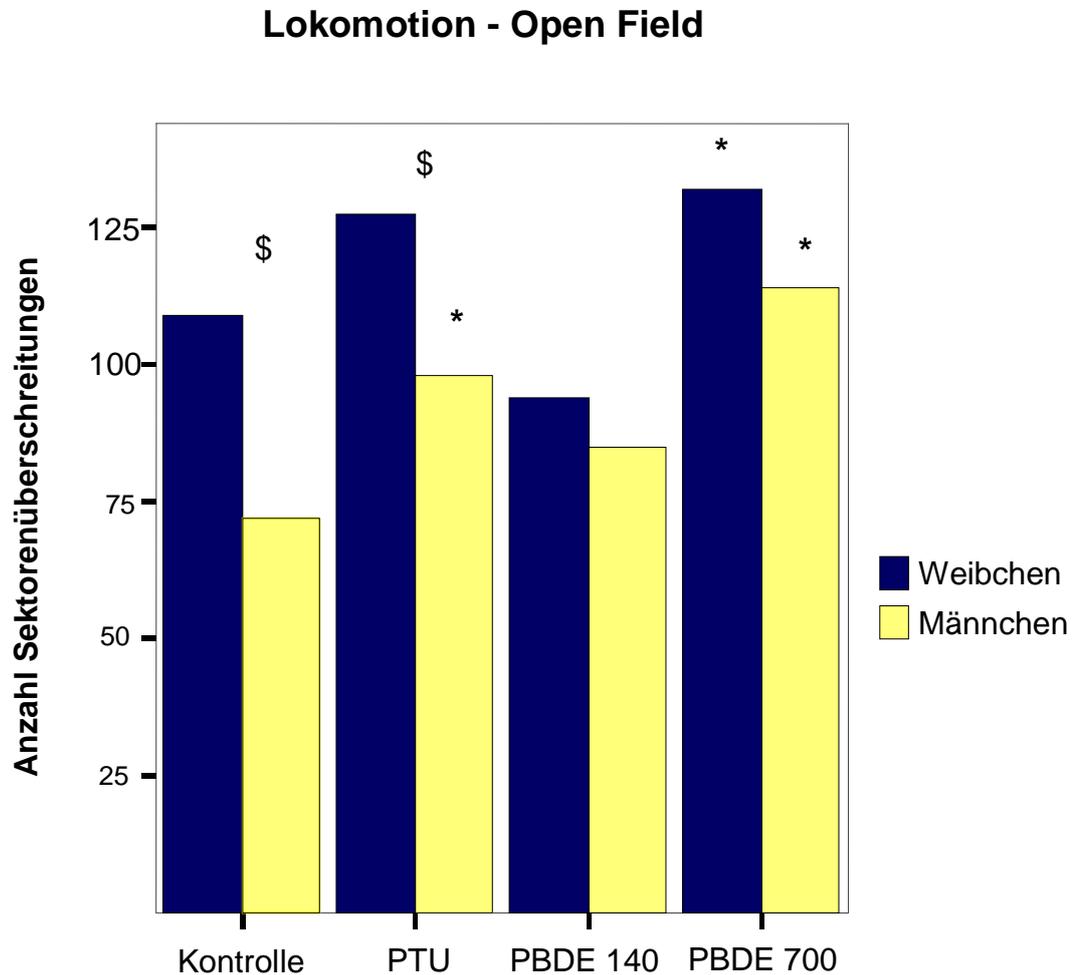


Abb. 11: Sektorenüberschreitung (Lokomotion) im „Open-Field“-Test von weiblichen und männlichen Nachkommen (Median, 15 Tiere pro Geschlecht und Gruppe) an PND 80 nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU.

* $P < 0,05$, Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test; \$ $P < 0,05$ bei Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen der gleichen Gruppe, Mann-Whitney-U-Test.

Tab. 8: Erkundungs- und emotionales Verhalten (Open Field Test) von Ratten-Nachkommen (15 Tiere pro Geschlecht und Gruppe) an PND 80 nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU.

		Kontrolle		PTU		PBDE 140		PBDE 700	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Aufrichten (n/5 min)	Q1	19	16	23	15	21	13	25	23
	Median	27	21	30	23	28	21	29	26
	Q3	32	30	43	29	34	29	39	28
Dauer der Fellpflege (s)	Q1	6	4	0	0	0	0	0	0
	Median	10	9	0^{\$}	6	3^{\$}	0	0^{\$}	8
	Q3	16	11	15	13	9	12	8	10
Zeit im Zentrum (s)	Q1	12	10	14	17	18	19	22	22
	Median	19	21	20	24	27	23	33	31
	Q3	31	43	36	31	34	33	42	50
Anzahl der Kot- Kügelchen (n/5 min)	Q1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Median	0	4	0	2	2	3	0	1
	Q3	2	7	2	5	3	7	2	5

Werte als Median, Q1 und Q3

\$ P < 0,05 Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test für die weiblichen Tiere.

Kein sign. Unterschied beim Kruskal-Wallis-Test für die männlichen Tiere.

3.3.4 ANGSTVERHALTEN (ELEVATED PLUS MAZE)

Das Angstverhalten von weiblichen und männlichen Nachkommen an PND 150 nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU im „Elevated-Plus-Maze“-Test ist in Abb. 12 dargestellt.

Die weiblichen Nachkommen der PTU- und PBDE 140-Gruppe zeigten eine signifikant verringerte Anzahl der Eintritte in die offenen Arme des Elevated Plus Maze im Vergleich zu den Kontrolltieren. In der PBDE 700-Gruppe wurde bei den männlichen Nachkommen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Anzahl der Eintritte in die offenen Arme der Testvorrichtung beobachtet. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der PBDE 140-Behandlungsgruppe traten die weiblichen Nachkommen signifikant häufiger in die offenen Arme des Elevated Plus Maze ein als die männlichen Nachkommen.

Die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme des Elevated Plus Maze waren im Vergleich zur Kontrollgruppe weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Nachkommen signifikant verändert. Allerdings zeigte sich bei den weiblichen Nachkommen der Kontrollgruppe und der PTU-Gruppe im Vergleich zu den männlichen Nachkommen eine signifikante Erhöhung der Eintrittshäufigkeit in die geschlossenen Arme.

Die Dauer des Aufenthalts in den offenen Armen des Elevated Plus Maze war bei den männlichen Nachkommen in der PBDE 700-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die weiblichen Nachkommen waren sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der PBDE 140-Gruppe signifikant länger in den offenen Armen der Testvorrichtung als die männlichen Nachkommen.

Die männlichen Nachkommen der PBDE 700-Gruppe hielten sich signifikant kürzer in den geschlossenen Armen des Elevated Plus Maze auf als die Kontrolltiere. Die männlichen Nachkommen der Kontrollgruppe und der PBDE 140-Gruppe waren signifikant länger in den geschlossenen Armen als die weiblichen Nachkommen.

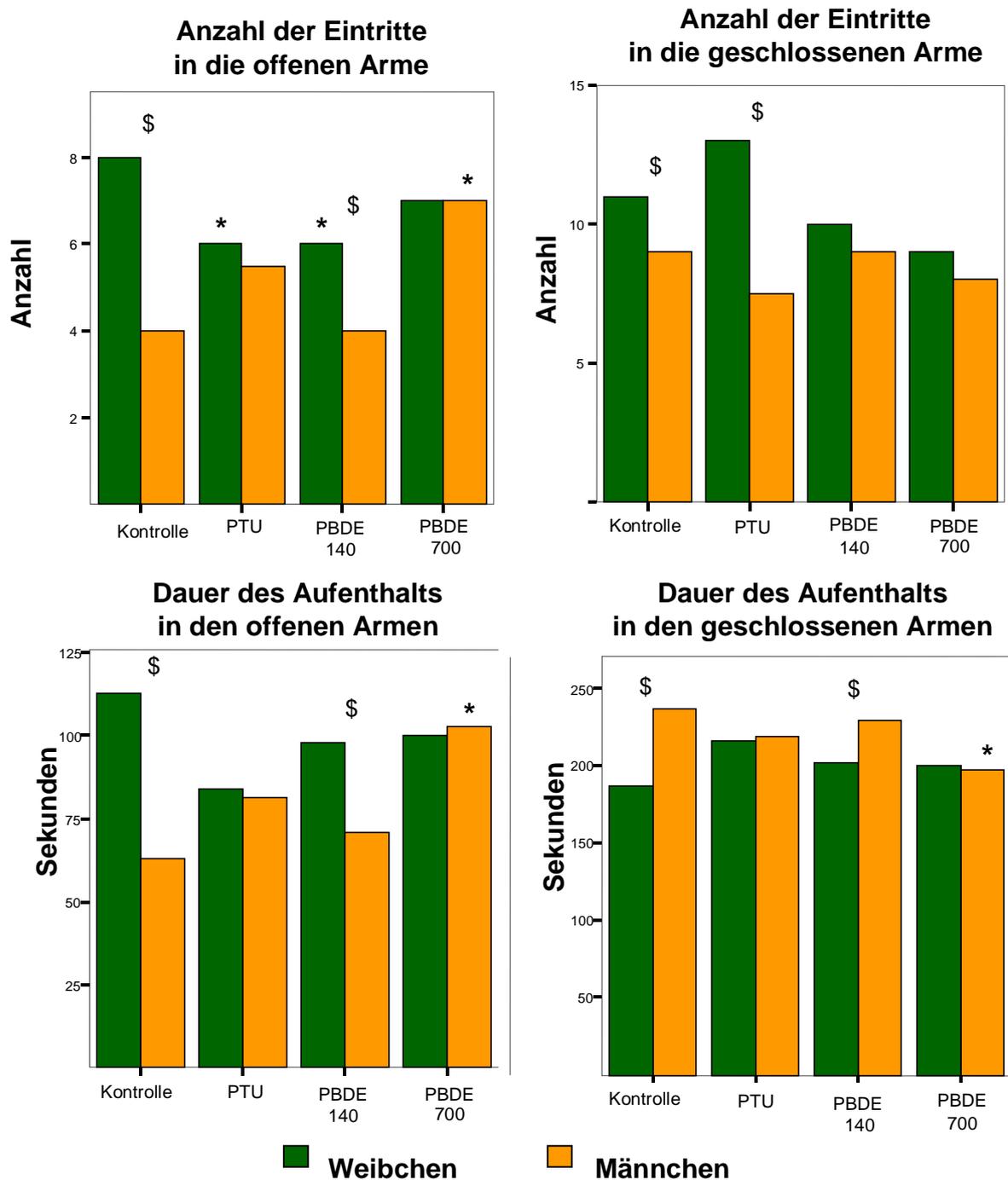


Abb. 12: Angstverhalten im „Elevated-Plus-Maze“-Test von weiblichen und männlichen Nachkommen (Median, 15 Tiere pro Geschlecht und Gruppe) an PND 150 nach prä- und postnataler Exposition mit PBDE 47 oder PTU angegeben als totale Anzahl der Eintritte und Dauer des Aufenthaltes in offenen und geschlossenen Armen in Sekunden pro fünf Minuten. * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test; \$ $P < 0,05$ bei Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen der gleichen Gruppe, Mann-Whitney-U-Test.

4 DISKUSSION

Betrachtet man das Risiko für den Menschen, welches durch Exposition gegenüber Umwelttoxinen entsteht, muss festgestellt werden, dass ungeborene und neugeborene Kinder die am meisten gefährdete Subpopulation darstellen. Ein wichtiger Grund für dieses besondere Risiko ist die Tatsache, dass die Entwicklung einer fein austarierten hormonellen Regulation unterliegt. Es ist bekannt, dass eine physiologische Gehirnentwicklung des menschlichen Fetus vom Schilddrüsenhormonhaushalt der Mutter abhängt. Calvo et al. (1992) stellten fest, dass das Ungeborene während der embryonalen Phase der Schwangerschaft nicht in der Lage ist, selbstständig Schilddrüsenhormone zu produzieren, und seine Entwicklung daher von physiologischen Konzentrationen an maternalem FT4 abhängig ist. Eine weitere epidemiologische Studie zeigte, dass eine zu niedrige maternale FT4-Konzentration bei sonst gesunden Müttern zu einer signifikanten Erhöhung des Risikos für eine gestörte neurologische Entwicklung des Kindes führt (Pop et al. 1999).

Persistierende Umweltchemikalien, wie z. B. PBDEs, können bereits bei geringer Exposition die Konzentration der Schilddrüsenhormone T3 und T4 beeinflussen, da sie ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit den Schilddrüsenhormonen aufweisen und eine sehr hohe Affinität zum Transportprotein Transthyretin (TTR) besitzen (Meerts et al. 1998, 2000). Weiterhin haben sie die Fähigkeit, an Schilddrüsenhormonrezeptoren zu binden (Marsh et al. 1998). Da es sich bei PBDEs um lipophile Chemikalien handelt, reichern sie sich bei Mensch und Tier im Fettgewebe an. Für die Bestimmung der Körperbelastung beim Menschen (Body Burden) mit persistierenden lipophilen Umweltchemikalien wird die Konzentration dieser Chemikalie in der Muttermilch herangezogen, da diese die Konzentration im Fettgewebe reflektiert. Auf der Basis der gemessenen Muttermilch-Konzentrationen und des geschätzten Anteils des Körperfettes am Gesamtkörpergewicht kann die Körperbelastung mit der entsprechenden Umweltchemikalie errechnet werden. Die Bedeutung des PBDE-Kongeners 47 kann einer Übersichtsarbeit von Costa und Giordano (2007) entnommen werden, in welcher festgestellt wurde, dass PBDE 47 weltweit eines der dominierenden Kongenere in der Muttermilch darstellt. So hat sich in Deutschland die Konzentration an PBDE 47 in der Muttermilch innerhalb von zehn Jahren verdoppelt (Fürst 2006).

In Anbetracht der Tatsache, dass im gleichen Zeitraum die Belastung der Muttermilch mit anderen persistierenden lipophilen Umweltchemikalien, wie z. B. PCBs und Dioxine, gesunken ist, kommt der Risikoabschätzung für PBDEs besondere Bedeutung zu.

Die Körperbelastung mit PBDEs bei Mensch und Tier kann unter anderem zu Störungen der Schilddrüsenhormon-Homöostase sowohl bei der Mutter als auch beim Fetus führen. Dadurch kommt es über eine indirekte, vermittelt durch verringerte maternale FT4-Konzentrationen, und/oder eine direkte Wirkung auf die Schilddrüsenhormone des Fetus zu einer Störung der neurophysiologischen Entwicklung der Nachkommen. Die direkte Wirkung auf den Schilddrüsenhormonhaushalt des Fetus ist vom Ausmaß des plazentaren Übergangs von PBDEs abhängig. Mazdai et al. (2003) untersuchten maternales und fetales Serum auf PBDE-Belastung und stellten fest, dass die Serumkonzentration an PBDE 47 in Mutter und Fetus annähernd gleich war. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Plazenta kein Hindernis für den Übergang von PBDEs von der Mutter zum Fetus darstellt.

Bei der Planung dieses Versuchsvorhabens wurde dieser Tatsache Rechnung getragen, indem die Behandlung zu Beginn der embryonalen Entwicklung durch eine einmalige orale Exposition des trächtigen Muttertieres durchgeführt wurde. Da PBDE 47 eine mehrere Wochen lange Halbwertszeit besitzt, waren die Nachkommen sowohl prä- als auch postnatal durch die Muttermilch exponiert. Für die Risikoabschätzung für den Menschen ist die Untersuchung der Wirkungen von Umweltchemikalien im Niedrigdosisbereich besonders relevant. Daher stellte für die Dosisauswahl in der vorliegenden Studie die Belastung der Muttermilch mit PBDE 47 die Grundlage dar (Costa und Giordano 2007). Um zu überprüfen, ob die hier eingesetzte Tierart und der Tierstamm gegenüber niedrigen Dosierungen an Substanzen, die die Schilddrüsenhormonhomöostase beeinflussen, empfindlich sind, wurde die Referenzsubstanz PTU ebenfalls niedrig dosiert. Wie erwartet, führte die Behandlung der Muttertiere an Tag 6 der Trächtigkeit mit PTU bei diesen am Wurfstag (PND 1) zu einer signifikanten Reduktion der Konzentrationen an T4 und FT4 im Blut. In der PBDE 700-Gruppe kam es zu diesem Zeitpunkt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion von T4, aber auch von TSH. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus anderen Studien überein. So verursachte die Behandlung mit 18 mg PBDE 47/kg KG über 14 Tage ebenfalls eine signifikante Abnahme der Konzentration an T4 (Hallgren et al. 2001; Hallgren und Darnerud 2002). Eine signifikante Reduktion von T4 und/oder FT4 unter

dem Einfluss einzelner PBDE-Kongenere oder technischer Mischungen, z. B. mit PCB oder chloriertem Paraffin, wurde auch in anderen Kurz- oder Langzeitstudien an Ratten beschrieben (Zhou et al. 2001; Hallgren et al. 2001; Hallgren und Darnerud 2002; Zhou et al. 2002; Kuriyama et al. 2007; Suvorov et al. 2008). Eine Verringerung an TSH bei gleichzeitiger Verringerung der T4-Konzentration wurde auch bei juvenilen Wistar-Ratten nach Behandlung mit dem kommerziellen PBDE-Gemisch PBDE 71 beobachtet (Stoker et al. 2004). Die Abnahme der Konzentration an TSH ist möglicherweise ein Zeichen für den Einfluss von PBDE 47 auf den Prozess des Schilddrüsenfeedbacks, vermittelt durch die strukturelle Ähnlichkeit der bromierten FSM mit dem Schilddrüsenhormon T4 (Capen 1998). In In-vitro-Experimenten mit menschlichem TTR wurde nachgewiesen, dass die bromierten FSM wie PBP und TBBPA eine hohe Affinität zum TTR aufweisen und PBDEs nach ihrer metabolischen Umwandlung durch Phenobarbitalmikrosome (hauptsächlich CYP 2B) mit T4 um TTR konkurrieren (Marsh et al. 1998; Meerts et al. 2000). Dadurch kann die Bindung des T4 an TTR verhindert, seine Ausscheidung erhöht und damit seine Konzentration im Serum verringert werden (Darnerud et al. 1996). Das Transportprotein TTR ist für den Transport der Schilddrüsenhormone vom Muttertier durch die Plazenta in das Gehirn des Nachkommens verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass die Metabolite des PBDE 47 nach der Biotransformation durch CYP 2B stärker an TTR binden als die durch p-Naphthoflavonmikrosomen (hauptsächlich CYP 1A1) oder Clofibratmikrosomen (hauptsächlich CYP 4A3) gebildeten Metabolite (Meerts et al. 2000). Bei In-vitro-Versuchen kam es zu 160- bis 1600-fach höheren Bindungsraten durch einzelne PBDE 47 Metabolite an TTR als durch PBDE 47 selbst. Hierbei waren die potentesten die an Meta- oder Paraposition hydroxylierten Metabolite und diese lagen auch am häufigsten vor (Hamers et al. 2008). Im Serum von weiblichen Mäusen, die über vier Tage mit PBDE 47 behandelt wurden, konnte eine 43 %ige Abnahme der Konzentration von T4 und eine Erhöhung der CYP 2B10 mRNA Expression nach Aktivierung von nukleären Rezeptoren wie dem Constitutive androstane Rezeptor (CAR) nachgewiesen werden (Richardson et al. 2007). Darüber hinaus zeigen die hydroxylierten Metabolite verschiedener bromierter FSM, u. a. einiger PBDE-Kongenere, eine hohe Bindungsaffinität an den Schilddrüsenhormonrezeptoren TR- α und TR- β (Marsh et al. 1998).

Auch auf den Schilddrüsenhormonhaushalt der pränatal exponierten Rattennachkommen konnte im vorliegenden Experiment eine Wirkung von PBDE 47 beobachtet werden.

So wurde bei den männlichen Nachkommen nach Behandlung mit PTU an PND 1 eine signifikante Reduktion von T4 und nach Behandlung in der PBDE 700-Gruppe eine signifikante Reduktion an T3 beobachtet. Die Schilddrüsenhormone der weiblichen Nachkommen waren bei der Geburt nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse spiegeln den Einfluss der Behandlung auf den Schilddrüsenhormonhaushalt der Muttertiere und der Nachkommen während der Trächtigkeit wider.

Am Ende der Laktation (PND 22) waren in der PTU-Behandlungsgruppe T4 und FT4 der Muttertiere weiterhin signifikant reduziert, während in beiden PBDE-Dosisgruppen keine signifikanten Veränderungen der Schilddrüsenhormone mehr feststellbar waren.

Die weiblichen und die männlichen Nachkommen zeigten in der PTU-Behandlungsgruppe an PND 22 signifikant verringerte T4- und FT4-Konzentrationen. Die Behandlung in der PBDE 140- und PBDE 700-Gruppe führte bei den männlichen Nachkommen zu einer nicht signifikanten Erhöhung der T4- und FT4-Konzentration, während die TSH-Konzentration in der PBDE 140-Gruppe signifikant verringert war. Im Gegensatz dazu zeigten die weiblichen Nachkommen nur nach Behandlung in der PBDE 140-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Konzentration an FT3. Die Behandlung in der PBDE 700-Gruppe führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen am Ende der Laktationsperiode.

Die bei dieser Untersuchung festgestellte Wirkung von PBDE 47 auf die Schilddrüsenhormonkonzentrationen der Muttertiere und der Nachkommen stimmt mit publizierten Ergebnissen von Versuchen mit anderen PBDE-Kongeneren überein. Die Mehrzahl dieser Untersuchungen wurden jedoch mit Dosierungen durchgeführt, die weit über der tatsächlichen Belastung der Bevölkerung liegen (Zhou et al. 2002; Ellis-Hutchings et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig experimentelle Ergebnisse dargestellt, die nach Behandlung mit PBDE 47 in einem der Humanbelastung entsprechenden Dosisbereich auftraten. Darüber hinaus wurden hier Unterschiede in der Empfindlichkeit von männlichen und weiblichen Nachkommen gegenüber der prä- und postnatalen Exposition gegenüber PBDE 47 beobachtet, die

bei höheren Dosierungen nicht feststellbar sind, da quantitative Empfindlichkeitsunterschiede bei hohen Dosierungen maskiert werden. Die funktionelle Entwicklung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse setzt bei Ratten erst nach der Geburt ein und ist nach den ersten vier Lebenswochen abgeschlossen. Beim Menschen setzt die Entwicklung dieser Achse ungefähr in der vierten Schwangerschaftswoche (SSW) ein und ist ebenfalls vier Wochen nach der Geburt beendet (Fisher und Klein 1981). Sowohl die pränatale Reduktion der maternalen T4-Konzentration als auch die direkte Exposition der Nachkommen gegenüber PBDE während der Laktation könnten in der vorliegenden Studie zu den beobachteten Veränderungen des Schilddrüsenhormonhaushaltes geführt haben. Dabei spielt möglicherweise der Transport von T4 durch TTR sowohl vom Muttertier in den Fetus als auch durch die Blut-Hirn-Schranke des Fetus eine entscheidende Rolle. Auf diesem Wege könnten die hydroxylierten PBDEs durch ihre hohe Affinität zu TTR in das Gehirn des wachsenden Organismus transportiert worden sein, dort akkumuliert und ihre schädliche Wirkung ausgeübt haben (Brouwer et al. 1998).

Wie bereits erwähnt, besteht ein enger Zusammenhang zwischen der neurologischen Entwicklung und dem Schilddrüsenhormon-Gleichgewicht während dieser empfindlichen Entwicklungsphase. Daher konzentrieren sich die epidemiologischen sowie die experimentellen Studien auf mögliche neurotoxische Eigenschaften von Umweltchemikalien wie Dioxine, PCBs und PBDEs (Branchi et al. 2003; Birnbaum und Staskal 2003, 2004). Experimentelle Studien mit verschiedenen PBDEs zeigten, dass prä- und postnatale Exposition gegenüber PBDEs zu lang anhaltenden Verhaltensänderungen, gekennzeichnet vor allem durch Effekte auf die motorische Aktivität, bei den Nachkommen führte (Eriksson et al. 2001; Lichtensteiger et al. 2004; Rice et al. 2007).

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Erfassung von Entwicklungs- und Verhaltensparametern (Augenöffnung, Fellentwicklung, Zahnentwicklung, Hodenabstieg, basallokomotorische Aktivität, Erkundungsverhalten, Angstverhalten), deren Beeinflussung durch die Behandlung mit PBDE 47 anzunehmen ist. Entwicklungsendpunkte, wie Augenöffnung, Fell- und Zahnentwicklung sowie Hodenabstieg, stellen valide Endpunkte zur Bewertung der Neurotoxizität in postnatalen Studien dar. Dabei werden das erste Auftreten und eventuelle Verzögerungen der jeweiligen Entwicklungsparameter bewertet (Lochry et al. 1986). Die postnatale

Körpergewichtsentwicklung der Jungtiere kann dabei einen Einfluss sowohl auf somatische Entwicklungsparameter als auch auf Verhaltensparameter haben (Nagy et al. 1977; Jen et al. 1978; Agnish und Keller 1997; Chahoud und Paumgarten 2009). Die pränatale Exposition gegenüber PTU und PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe führte zu einer signifikanten Körpergewichtsreduktion der männlichen und weiblichen Nachkommen an PND 1, während in der PBDE 140-Gruppe bei beiden Geschlechtern signifikant höhere Körpergewichte im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurden. Diese Effekte auf das Körpergewicht waren auch am Ende der Laktation an PND 22 in den PTU- und PBDE 700-Behandlungsgruppen noch vorhanden. Darüber hinaus war das Auftreten der Entwicklungsparameter Augenöffnung und Zahnentwicklung in allen Behandlungsgruppen verzögert. Diese Verzögerung ist möglicherweise eine direkte Folge der Körpergewichtsreduktion, die durch Störung der Schilddrüsenhormonhomöostase hervorgerufen wurde.

Prä- oder postnatal gesetzte Läsionen, die sich manifestieren und morphologisch u. U. nicht darstellbar sind, können durch Beobachtungen und Messungen von Verhaltensparametern erfasst werden. In Tierexperimenten stellt die Messung der basallokomotorischen Aktivität eine der wichtigsten Methoden zur Bestimmung neurotoxischer Effekte dar. Das Mobiltron[®] ist ein zuverlässiger Apparat für die Untersuchung der Quantität und Qualität der basallokomotorischen Aktivität von Ratten und Mäusen (Thiel et al. 1989). Nach einer Gewöhnungsphase von 24 Stunden wird im Mobiltron[®] eine 24-stündige Messung der spontanen basallokomotorischen Aktivität individueller Ratten durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass zwischen den unbehandelten männlichen und weiblichen Ratten in der basalen lokomotorischen Aktivität unter normalen Bedingungen kaum Unterschiede bestehen (Mead et al. 1996). Die Exposition von Rattennachkommen gegenüber einer niedrigen Dosis von PBDE 47 während der Trächtigkeit (über die Plazenta) und der Laktation (über die Muttermilch) führte jedoch zu Verhaltensänderungen an PND 35 und PND 70. In der Gruppe PBDE 700 nahm die basallokomotorische Aktivität sowohl der Männchen als auch der Weibchen an PND 35 deutlich zu. Diese Hyperaktivität dauerte bei den weiblichen Ratten bis zum PND 70, die Aktivität der männlichen Tiere war zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied war statistisch

signifikant. Unter dem Einfluss von PTU waren an PND 70 sowohl männliche als auch weibliche Nachkommen signifikant aktiver als die Kontrollgruppe.

Der offene Feldversuch (Open Field) stellt den meistverwendeten Test in der Verhaltensforschung zur Untersuchung des Erkundungsverhaltens dar. Das Erkundungsverhalten ist bei Nagetieren ein natürliches Verhalten, das dem Verschaffen von Informationen dient. Es beruht auf ihrem Bewegungsbedürfnis, der Angst vor neuer Umgebung und dem Drang, diese Umgebung zu erforschen. Es bildet eine Form des Lernens (Renner und Rosenzweig 1987) und die Basis für die Anpassung an neue Situationen und/oder Umweltbedingungen und stellt in der Natur für das Tier ein gewisses Risiko dar. Werden Ratten in einer für sie fremden Umgebung ausgesetzt, sind weibliche Tiere aktiver als männliche (Mead et al. 1996; Tropp und Markus 2001). Dementsprechend bewegten sich in der vorliegenden Studie die Weibchen der Kontrollgruppe auch deutlich mehr als die Männchen. Nach Behandlung mit PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe war an PND 80 die Erkundungsaktivität, ausgedrückt als Gesamtzahl der durchquerten Sektoren, bei beiden Geschlechtern signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Unsere Daten werden unterstützt von früheren Studien, in denen die einmalige Behandlung junger Mäuse mit PBDE 47 oder 99 an PND 10 zu einer signifikanten Veränderung ihres spontanen Verhaltens führte, welche auch zu einem späteren Zeitpunkt noch nachweisbar war (Eriksson et al. 2001). Die Verminderung des physiologischen Unterschieds im Erkundungsverhalten zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen unter dem Einfluss von PBDE 47 könnte ein wichtiger Hinweis auf die geschlechtsspezifische Wirkung von PBDEs sein. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass die pränatale Behandlung mit PCB und PBDE 99 bei erwachsenen männlichen Rattennachkommen zu Zeichen der Feminisierung des Verhaltens und verringerten Konzentrationen an Sexualhormonen führte (Lilienthal et al. 2003). Es ist bekannt, dass die sexuellen Steroide die strukturelle und funktionelle Entwicklung des Gehirns in der Wachstumsphase beeinflussen und dauerhaft verändern können. Im offenen Feldversuch haben Studien gezeigt, dass der sexuelle Dimorphismus im Verhalten bei Ratten verschwand, wenn sie während der perinatalen Periode mit Testosteron oder Östradiol behandelt wurden (Blizard et al. 1975; Slob et al. 1981). Die östrogene Potenz der hydroxylierten PBDE-Metaboliten ist deutlich höher als die der Ausgangsverbindungen (Meerts et al. 2001). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Exposition gegenüber PBDE 47 während kritischer Perioden der Entwicklung

hormonale Störungen verursacht und damit das geschlechtsabhängige Verhalten der Nachkommen beeinflusst.

Mit dem „Open Field“ kann auch ein weiterer Verhaltensparameter zuverlässig gemessen werden. Die Angst eines Tieres, das in eine neue Umgebung ausgesetzt wird, wird durch die hohe Darmentleerungsrate und die Kürze der im Zentrum der Arena verbrachten Zeit charakterisiert (de Cabo de la Vega et al. 1995; Ramos und Mormede 1998). Die Fellpflege wird als eine Übersprungshandlung oder ein Verhalten zur Verarbeitung der durch eine Stresssituation verursachten Spannung interpretiert. In unseren Beobachtungen fiel auf, dass nur bei den weiblichen Nachkommen, die entweder mit PTU oder PBDE 47 behandelt wurden, die Dauer der Fellpflege deutlich verkürzt war. Diese Änderung unter dem Einfluss von PBDE 47 stellt ein Zeichen für verminderte Angst und Emotionalität der weiblichen Tiere dar und weist daher auf eine Wirkung der Substanz auf einen weiteren Verhaltensparameter hin.

Das Elevated Plus Maze ist ein Modell zur Messung des Angstverhaltens bei Nagetieren (Pellow und Chopin 1985; Lister 1987). Ängstliche Tiere vermeiden den Aufenthalt in den offenen Armen und halten sich häufiger in den geschlossenen Armen auf. Deshalb dienen ein erhöhter Anteil an Eintritten in die offenen Bereiche (Pellow und Chopin 1985; Rodgers und Cole 1994) und eine verlängerte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen als Maß für die anxiolytische Wirkung einer Substanz (Handley und Mithani 1984; Pellow und Chopin 1985) oder als Indikator für ein verändertes Angstverhalten der Tiere. In der vorliegenden Untersuchung fiel auf, dass in der Kontrollgruppe die weiblichen Nachkommen öfter in die offenen Arme eintraten und dort auch länger verweilten als die männlichen Nachkommen. Im Gegensatz dazu führte im Vergleich zur Kontrollgruppe die pränatale Exposition der männlichen Nachkommen gegenüber PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe zu einem häufigeren Eintritt in die offenen Arme verbunden mit einer längeren Verweildauer. Diese geschlechtsabhängigen Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber der Einwirkung von hormonähnlich wirksamen Substanzen während der Trächtigkeit sind nicht ungewöhnlich und wurden in der Vergangenheit bereits vielfach berichtet (Faqi et al. 1998; Faqi und Chahoud 1998; Ema et al. 2000; Moore et al. 2001; Ogata et al. 2001; Omura et al. 2001; Andrade et al. 2006a, 2006b; Grande et al. 2007; Schlumpf et al. 2008).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Daten bekräftigen die bereits von anderen Forschern berichteten Beobachtungen von zunehmender Aktivität der behandelten Nagetiere, sich verändernder geschlechtsabhängiger Verhaltensunterschiede der Nachkommen sowie verminderter Emotionalität der weiblichen Tiere als Störungen der neurologischen Entwicklung unter dem Einfluss von PBDE. So zeigten sich bereits in früheren Tierversuchen an neugeborenen Mäusen bei Exposition gegenüber PBDE 47, 99, 153 und 209 neurotoxische Wirkungen, hyperaktives Verhalten und Störungen im Lernverhalten, die sich im Laufe der postnatalen Entwicklung noch verstärkten (Eriksson et al. 2001; Branchi et al. 2002; Viberg et al. 2003b). Kuriyama et al. (2005) beobachteten bei Nachkommen von Ratten, die während der Trächtigkeit mit geringen Dosierungen von PBDE 99 behandelt wurden, zum Zeitpunkt der Pubertät eine deutliche Hyperaktivität, die auch später noch nachzuweisen war. Eine einmalige orale Gabe von PBDE 47 an PND 10 führte bei den behandelten Mäusen im Alter von vier Monaten ebenfalls zu einer ausgeprägten Hyperaktivität (Gee und Moser 2007).

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der hier vorliegenden Untersuchungen gefolgert werden, dass die prä- und postnatale Behandlung von Rattennachkommen mit PBDE 47 zu einer Verzögerung der postnatalen Entwicklung und zu geschlechtsspezifischen Verhaltensänderungen führte. Hierbei zeigten die weiblichen Nachkommen eine stärker ausgeprägte Hyperaktivität. Eine am Ende der Laktation beobachtete Erhöhung der Schilddrüsenhormone lässt annehmen, dass das hyperaktive Verhalten auf einen Einfluss von PBDE 47 auf die Schilddrüse zurückzuführen ist. Die Exposition während eines sehr frühen Entwicklungsstadiums, in dem das Gehirn stark wächst, ist scheinbar ausschlaggebend für die Entstehung und Ausprägung der beobachteten Effekte. Bei Nagern liegt dieser Zeitraum innerhalb der ersten drei bis vier Wochen nach der Geburt (Eriksson et al. 2001; 2002). In diesem Entwicklungszeitraum unterliegt das Gehirn verschiedenen fundamentalen Veränderungen, wie z. B. axonaler und dendritischer Aussprossung, der Herstellung neuronaler Verbindungen sowie der Ausbildung von motorischen und sensorischen Fähigkeiten (Bolles und Woods 1964; Campbell et al. 1969). Die Phase dieses rapiden Gehirnwachstums ist gekennzeichnet durch zahlreiche biochemische Veränderungen, die das neonatale Gehirn in ein reifes adultes Organ verwandeln (Coyle und Yamamura 1976; Fiedler et al. 1987). Da ein physiologisches Thyroidhormongleichgewicht in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielt (Porterfield 1994; Brent 2000;

Howdeshell 2002), können Störungen dieses Gleichgewichts durch endokrin wirksame Chemikalien die Gehirnentwicklung nachhaltig beeinträchtigen und zu den beschriebenen Verhaltensänderungen führen.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Seit dem Beginn des chemischen Zeitalters in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts wird ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von neurologischen Entwicklungsstörungen beim Menschen und der Exposition gegenüber unterschiedlichen persistenten Chemikalien in der Umwelt beobachtet (Colborn 2004). Unterstützt wird diese Hypothese durch verschiedene epidemiologische Studien, in denen eine signifikante Korrelation zwischen verschiedenen Störungen und Krankheiten beim Menschen festgestellt wurde, wie z. B. verminderte Zeugungsfähigkeit beim Mann und Anstieg neurologischer Entwicklungsstörungen bei Kindern. So wird bei Kindern nicht nur ein höheres Auftreten von Autismus, sondern auch eine allgemeine neurologische Beeinträchtigung in Verbindung mit Lernschwierigkeiten, psychosozialen Problemen und ADHD zunehmend beobachtet (Kelleher et al. 2000; Robison et al. 2002). Die vorliegende Arbeit unterstützt mit ihren Ergebnissen diese Beobachtungen. Die Ergebnisse belegen tierexperimentell, dass die Exposition gegenüber polybromierten Flammschutzmitteln in Dosierungen nahe an der Humanbelastung zu Störungen der neurologischen Entwicklung bei Nachkommen führte. Die Ausprägung dieser Störungen zeigte, abhängig von den untersuchten Endpunkten, Geschlechtsspezifität. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

Experimentelle Arbeiten mit Umweltchemikalien sollten in einem Dosisbereich nahe der Humanexposition geplant und durchgeführt werden. Die üblicherweise in experimentellen Untersuchungen eingesetzten hohen Dosierungen sind weit entfernt von der tatsächlichen Belastung des Menschen und daher für die Risikoabschätzung wenig hilfreich.

Quantitative geschlechtsspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Chemikalien können nur nach Exposition gegenüber niedrigen Dosierungen entdeckt werden.

Eine akzeptable tägliche Einnahme wird üblicherweise bei der Risikobewertung einer Substanz festgelegt. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass das Risiko durch die tatsächliche Humanbelastung mit PBDE durch diese Regulierung nicht gesenkt werden

kann. Daher müssen Maßnahmen ergriffen werden, die zu einer deutlichen Senkung der Körperbelastung führen, wie es bereits für PCBs und Dioxine verwirklicht wurde.

Zusätzlich zu den allgemeinen gesellschaftlichen Maßnahmen, die langfristig zu einer Verringerung der Humanbelastung führen sollten, können individuelle Maßnahmen zur kurzfristigen Senkung der Belastung ergriffen werden. Umweltmediziner sollten aufklärend und beratend zur Reduktion der individuellen Belastung, insbesondere von schwangeren und stillenden Müttern, beitragen.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurde das Flammschutzmittel Polybromierte Diphenylether (PBDE) als eine der persistierenden Chemikalien in zunehmender Konzentration in biologischen Proben der Umwelt gefunden. Experimentelle Studien an Nagetieren weisen auf die breite Spanne an toxischen Eigenschaften dieser Substanzklasse hin, wie die Effekte auf den Schilddrüsenhormonhaushalt und das Verhalten bei Labortieren zeigen. Die Exposition während kritischer Phasen der Organogenese und die Empfindlichkeit des sich entwickelnden Organismus gegenüber geringen Abweichungen im Hormonhaushalt können zu lang andauernden und oft permanenten Effekten führen. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenylether (PBDE 47) auf die neuro-physiologische Entwicklung von Rattennachkommen, unter Berücksichtigung von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber hormonellen Störungen, untersucht. Die in diesem Experiment verwendeten Dosierungen bewegten sich im Bereich der Konzentrationen, denen der Mensch in der Umwelt ausgesetzt ist. Trächtige Wistar-Ratten wurden an Tag 6 der Trächtigkeit einmalig per Schlundsonde mit 140 µg und 700 µg PBDE 47/kg KG behandelt. Um mögliche Schilddrüsenhormon-vermittelte Effekte bestimmen zu können, wurde als Positivkontrolle eine zusätzliche Gruppe von Tag 7 bis Tag 21 der Trächtigkeit mit der Substanz 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) über das Trinkwasser in einer Konzentration von 5 mg/Liter behandelt. Die Effekte auf den Schilddrüsenhormonstatus bei Muttertieren und Nachkommen während der Laktationsperiode sowie die Auswirkungen der Behandlung auf die neuro-physiologische Entwicklung der Jungtiere anhand verschiedener Entwicklungs- und Verhaltensparameter wurden zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

Die einmalige Behandlung mit 700 µg PBDE 47/kg KG führte bei den Muttertieren am Wurfstag (postnatal Tag 1 (PND 1)) zu einer signifikanten Reduktion von T4 und TSH.

Bei den männlichen Nachkommen wurde an PND 1 nach pränataler Exposition gegenüber PBDE 47 eine signifikante Reduktion von T3 beobachtet. Die

Schilddrüsenhormone der weiblichen Nachkommen waren bei der Geburt nicht signifikant verändert.

An PND 22 wurde bei den männlichen Nachkommen in beiden PBDE-Dosisgruppen eine nicht signifikante Erhöhung der T4- und FT4-Konzentration beobachtet, während die TSH-Konzentration nur in der PBDE 140-Gruppe verringert war. Im Gegensatz dazu zeigten die weiblichen Nachkommen nur nach Behandlung in der PBDE 140-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen an FT3. Das Auftreten der Entwicklungsparameter Augenöffnung und Zahnentwicklung war bei den Nachkommen beider Geschlechter in allen Behandlungsgruppen verzögert. Nach Behandlung mit PBDE 47 in der PBDE 700-Gruppe nahm die basallokomotorische Aktivität sowohl der Männchen als auch der Weibchen an PND 35 deutlich zu. Bei den weiblichen Nachkommen hielt diese Hyperaktivität bis zum PND 70 an. An PND 80 wurde bei beiden Geschlechtern eine signifikant höhere Erkundungsaktivität als bei den Kontrolltieren beobachtet. Die weiblichen Nachkommen der hohen Dosisgruppe zeigten verminderte Emotionalität, während die männlichen Nachkommen ein geringeres Angstverhalten aufwiesen.

Aus den Ergebnissen der hier vorliegenden Untersuchungen kann gefolgert werden, dass die prä- und postnatale Behandlung von Rattennachkommen mit PBDE 47 zu einer Verzögerung der postnatalen Entwicklung und zu geschlechtsspezifischen Verhaltensänderungen führte. Hierbei zeigten die weiblichen Nachkommen eine stärker ausgeprägte Hyperaktivität. Eine am Ende der Laktation beobachtete Erhöhung der Schilddrüsenhormone weist auf einen Schilddrüsenhormonvermittelten Wirkungsmechanismus hin. Die Exposition während eines sehr frühen Entwicklungsstadiums, in dem das Gehirn stark wächst, scheint ausschlaggebend zu sein für die Entstehung und Ausprägung der beobachteten Effekte. Da ein physiologisches Schilddrüsenhormongleichgewicht in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielt, können Störungen dieses empfindlichen Gleichgewichts durch endokrin wirksame Chemikalien die Gehirnentwicklung nachhaltig beeinträchtigen und zu den beschriebenen Verhaltensänderungen führen. Trotz rückläufiger Umweltkonzentrationen einiger dieser Schadstoffe lassen sich bereits im Bereich der Normalbelastung Beeinträchtigungen der mentalen und motorischen Entwicklung von Kleinkindern feststellen. Daher ist es notwendig, Maßnahmen zu ergreifen, die zu einer deutlichen Senkung der Körperbelastung führen.

SUMMARY

Polybrominated flame retardants (PBDE) are applied in large amounts in various industrial products and are therefore ubiquitous in the environment. Within the last decades increasing concentrations of PBDE were detected in biological monitoring samples as one of the most persistent group of chemicals. In rodent experimental studies PBDEs exhibited a broad spectrum of toxic properties, in particular effects on thyroid hormone homeostasis or on neurodevelopment and behaviour. Exposure to chemicals during critical phases of organogenesis as well as the sensitivity of the developing organism towards even slight changes in hormone homeostasis can lead to persisting and often irreversible alterations in offspring. In the present study the effects of 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenylether (PBDE-47) on the neurological development in rat offspring was investigated. Furthermore, special attention was given to gender-specific differences regarding the sensitivity towards hormonal disturbances during development. Dose selection was based on the actual body burden of humans exposed to PBDEs via the environment. Pregnant Wistar rats received a single dose of either 140 µg or 700 µg PBDE 47/kg body weight per gavage on gestation day (GD) 6. A further group was treated with the goitrogen 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU), which served as positive control, via the drinking water from GD 7 through 21. Effects on thyroid hormone concentrations in dams and offspring as well as neurodevelopmental and –behavioral parameters of offspring at different postnatal time points were investigated. The results of this investigation can be summarized as follows:

The single treatment of dams with 700 µg PBDE 47 resulted in a significant decrease in T4 and TSH blood concentrations of dams on postnatal day (PND) 1. Male offspring exhibited a significant decrease in T3 concentrations on PND 1, while in female offspring thyroid hormone levels were unaffected at this time point. At the end of lactation, on PND 22, a non-significant increase in T4 and fT4 concentrations was observed in male offspring at both dose levels. In contrast, female offspring showed a significant increase in fT3 levels after treatment with 140 µg PBDE 47 only. In addition, male TSH levels were decreased after exposure to 140 µg PBDE 47. The occurrence of the developmental landmarks eye opening and incisor eruption was delayed in female and male offspring at both dose levels. On PND 35 basal locomotor activity was significantly increased in female and male offspring after exposure to 700 µg PBDE 47.

In female offspring this hyperactivity persisted until PND 70. At adulthood, on PND 80, both sexes exhibited a significantly increased exploratory behaviour compared to the control animals. Furthermore, decreased levels of anxiety and emotionality were observed in female offspring.

From the results of the present study it can be concluded, that pre- and postnatal exposure to PBDE 47 resulted in a delayed postnatal development and sex-specific behavioral alterations in rat offspring. Rat offspring of both sexes exhibited hyperactivity, which was more pronounced in the female animals. The observed increase in thyroid hormone concentrations at the end of lactation serves as an indication for a thyroid hormone-mediated mechanism of action for PBDE 47. Exposure during an early stage of brain development seems to be crucial for the onset and characteristic of the observed effects. Since a physiological homeostasis of thyroid hormones plays an important role in this process, disruption of this sensitive hormonal balance by endocrine active substances may substantially affect brain development leading to the reported alterations in behaviour. Despite declining environmental concentrations of some of these endocrine active substances, impairment of mental and motor skills in children are increasingly reported. It is therefore necessary to take measures that lead to a reduction of the human exposure and consequently the body burden of these substances.

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance; Varianzanalyse
BRD	Bundesrepublik Deutschland
°C	Grad Celsius
CAR	constitutive androstane receptor
CYP	Cytochrom P450
d	day
DecaBDE	Decabromdiphenylether
d. h.	das heißt
EAC	Endokrin Aktive Chemikalien
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
et al.	et alii; und andere
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FSM	Flammschutzmittel
FT3	freies Trijodthyronin
FT4	freies Thyroxin
g	Gramm
GD	Gestation day
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HBCD	Hexabromcyclododecan
HsdCpb:WU	Stamm Wistar-Unilever
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LBI	light beam interruption
MeO	Methoxy
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl
OctaBDE	Octabromdiphenylether
OD	optische Dichte
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OH	Hydroxy
p	Signifikanz
PBB	Polybromierte Biphenyle
PBDE	Polybromierte Diphenylether
PBDE 47	2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether
PBDE 99	2,2',4,4',5-Pentabromdiphenylether
PBDE 100	2,2',4,4',6-Pentabromdiphenylether
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PentaBDE	Pentabromdiphenylether
PND	Postnatal day

POP	Persistent Organic Pollutants; langlebige organische Schadstoffe
PTU	6-n-Propyl-2-Thiouracil
RENCO	Risk of Endocrine Contaminants
Rpm	Rotation pro Minute
s	Sekunde
SD	Standard Deviation
sog.	sogenannt
SSW	Schwangerschaftswoche
SPF	spezifisch pathogenfrei
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TBBPA	Tetrabrombisphenol A
TR- α	Thyroid Hormone Receptor α ; Schilddrüsenhormonrezeptor α
TR- β	Thyroid Hormone Receptor β ; Schilddrüsenhormonrezeptor β
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
TTR	Transthyretin
u. a.	unter Anderem
u. U.	unter Umständen
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
♂	männlich
♀	weiblich

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Strukturformel von PBDE	6
Abb. 2: Schematische Darstellung des Untersuchungsgerätes	20
Abb. 3: Arena zur Untersuchung des Erkundungsverhaltens	21
Abb. 4: Apparat zur Untersuchung des Angstverhaltens	21
Abb. 5: Kumulative Augenöffnung	31
Abb. 6: Kumulative Fellentwicklung	32
Abb. 7: Kumulative Zahnentwicklung	33
Abb. 8: Kumulativer Hodenabstieg	34
Abb. 9: Basallokomotorische Aktivität an PND 35	37
Abb. 10: Basallokomotorische Aktivität an PND 70	38
Abb. 11: Sektorenüberschreitung (Lokomotion) im „Open-Field“-Test	40
Abb. 12: Angstverhalten im „Elevated-Plus-Maze“-Test	43

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Behandlungsschema und Gruppenverteilung	17
Tab. 2: Körpergewichte sowie absolute und relative Organgewichte	24
Tab. 3: Körpergewichte	25
Tab. 4: Körper- und Organgewichte	26
Tab. 5: Konzentrationen der Schilddrüsenhormone	27
Tab. 6: Konzentrationen der Schilddrüsenhormone an PND 1	28
Tab. 7: Konzentrationen der Schilddrüsenhormone an PND 22	29
Tab. 8: Erkundungs- und emotionales Verhalten (Open Field Test)	41

LITERATURVERZEICHNIS

- Agnish ND, Keller KA. The rationale for culling of rodent litters. *Fundamental and Applied Toxicology* 1997; 38: 2 - 6.
- Akutsu K, Obana H, Okihashi M, et al. GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan. *Chemosphere* 2001; 44: 1325 - 1333.
- Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology*. 2006a; 227(3): 185 - 192.
- Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, et al. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology*. 2006b; 228(1): 85 - 97.
- Betts K. Why do PBDE levels vary widely? *Environmental Science and Technology* 2003; 37: 164A - 165A.
- Birnbaum LS, Staskal DF, Diliberto JJ. Health effects of polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs). *Environment International* 2003; 29(6): 855 - 860.
- Birnbaum LS, Staskal DF. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environmental Health Perspectives* 2004; 112(1): 9 - 17.
- Bjorklund J, Tollback P, Ostman C. Mass spectrometric characteristics of decabromodiphenyl ether and the application of isotopic dilution in the electron capture negative ionization mode for the analysis of polybrominated diphenyl ethers. *Journal of mass spectrometry* 2003; 38: 394 - 400.
- Blizard DA, Lippman HR, Chen JJ. Sex differences in open-field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiology & Behavior* 1975; 14: 601 - 608.
- Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J, Teixido A, Casas C. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 3191 - 3195.
- Bolles RG, Woods PJ. The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Animal Behaviour* 1964; 12: 427 - 441.
- Branchi I, Alleva E, Costa LG. Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. *Neurotoxicology* 2002; 23: 375 - 384.

- Branchi I, Capone F, Alleva E, Costa LG. Polybrominated diphenyl ethers: neurobehavioral effects following developmental exposure. *Neurotoxicology* 2003 Jun; 24(3): 449 - 462.
- Brent GA. Tissue-specific actions of thyroid hormone: insights from animal models. *Rev Endocr Metab Disord*, 2000; 1: 27 - 33.
- Brouwer A, Longnecker MP, Birnbaum LS, et al. Characterization of potential endocrine-related health effects at low- dose levels of exposure to PCBs. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107 Suppl 4: 639 - 649.
- Brouwer A, Morse DC, Lans MC, et al. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicology and Industrial Health* 1998; 14: 59 - 84.
- Calvo R, Obregón MJ, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. The rat placenta and the transfer of thyroid hormones from the mother to the fetus. Effects of maternal thyroid status. *Endocrinology* 1992; 131(1): 357 - 365.
- Campbell BA, Lytle LD, Fibiger HC. Ontogeny of adrenergic arousal and cholinergic inhibitory mechanisms in the rat. *Science* 1969; 166(905): 635 - 637.
- Capen CC. Correlation of mechanistic data and histopathology in the evaluation of selected toxic endpoints of the endocrine system. *Toxicology Letters* 1998; 102 - 103: 405 - 409.
- Chahoud I, Kwasigroch TE. Controlled breeding of laboratory animals. In: Neubert D, Merker H-J, Kwasigroch TE (Eds.). *Methods in Prenatal Toxicology*. Stuttgart, 1977: 196 - 200.
- Chahoud I, Paumgarten FJ. Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? *Environmental Research*. 2009; 109(8): 1021 - 1027.
- Chen G, Konstantinov AD, Chittim BG, Joyce EM, Bols NC, Bunce NJ. Synthesis of polybrominated diphenyl ethers and their capacity to induce CYP1A by the Ah receptor mediated pathway. *Environmental Science & Technology* 2001; 35(18): 3749 - 3756.
- Chen YC, Yu ML, Rogan WJ, Gladen BC, Hsu CC. A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu- cheng children. *American Journal of Public Health* 1994; 84: 415 - 421.
- Choi JW, Fujimaki TS, Kitamura K, Hashimoto S, Ito H, Suzuki N, Sakai S, Morita M. Polybrominated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and diphenyl ethers in Japanese human adipose tissue. *Environmental Science and Technology* 2003; 37: 817 - 821.
- Clive SR, Andrew GS, Stephen M, Tessa LS, John AB. Absorption of [14C]-tetrabromodiphenyl ether (TeBDE) through human and rat skin in vitro. *Drug and Chemical Toxicology* 2006; 29(3): 289 - 301.

- Colborn T. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environmental Health Perspectives* 2004; 112(9): 944 - 949.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 1993; 101: 378 - 384.
- Cooke PS, Porcelli J, Hess RA. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biology of Reproduction* 1992; 46: 146 - 154.
- Costa LG, Giordano G. Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology* 2007; 28(6): 1047 - 67.
- Coyle JT, Yamamura HI. Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Research* 1976; 118(3): 429 - 440.
- Darnerud PO, Eriksen GS, Johannesson T, Larsen PB, Viluksela M. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109 Suppl 1: 49 - 68.
- Darnerud PO, Morse D, Klasson-Wehler E, Brouwer A. Binding of a 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB-77) metabolite to fetal transthyretin and effects on fetal thyroid hormone levels in mice. *Toxicology* 1996; 106: 105 - 114.
- Darnerud PO, Thuvander A. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDE) and polychlorinated biphenyl (PCB) on some immunological parameters after oral exposure in rats and mice. *Toxicological and Environmental Chemistry* 1999; 70: 229 - 242.
- de Boer J, Denneman M. Polychlorinated diphenylethers: origin, analysis, distribution, and toxicity in the marine environment. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 1998; 157: 131 - 144.
- de Boer J, Wester PG, van der HA, Leonards PE. Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands. *Environmental Pollution* 2003; 122: 63 - 74.
- de Cabo de la Vega C, Pujol A, Viveros MP. Neonatally administered naltrexone affects several behavioral responses in adult rats of both genders. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1995; 50: 277 - 286.
- de Wit CA. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 2002; 46: 583 - 624.
- Ellis-Hutchings RG, Cherr GN, Hanna LA, Keen CL. Polybrominated diphenyl ether (PBDE)-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone concentrations in the rat during lactation and early postnatal development. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 215(2): 135 - 145.

- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicology Letters* 2000; 111(3): 271 - 278.
- Eriksson P, Jakobsson E, Fredriksson A. Brominated flame retardants: a novel class of developmental neurotoxicants in our environment? *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 903 - 908.
- Eriksson P, Viberg H, Jakobsson E, Orn U, Fredriksson A. A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether: uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. *Toxicological Sciences* 2002; 67: 98 - 103.
- Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, Chahoud I. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998; 150(2): 383 - 392.
- Faqi AS, Chahoud I. Antiestrogenic effects of low doses of 2,3,7,8-TCDD in offspring of female rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1998; 61(4): 462 - 469.
- Fiedler EP, Marks MJ, Collins AC. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. *Journal of Neurochemistry* 1987; 49(3): 983 - 990.
- Fischer D, Hooper K, Athanasiadou M, Athanassiadis I, Bergman A. Children show highest levels of polybrominated diphenyl ethers in a California family of four: a case study. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114: 1581 - 1584.
- Fisher DA, Klein AH. Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. *The New England Journal of Medicine* 1981; 304(12): 702 - 712.
- Fowles JR, Fairbrother A, Baecher-Steppan L, Kerkvliet NI. Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology* 1994; 86: 49 - 61.
- Fürst P. Dioxins, polychlorinated biphenyls and other organohalogen compounds in human milk. Levels, correlations, trends and exposure through breastfeeding. *Molecular Nutrition & Food Research* 2006; 50(10): 922 - 933.
- Gee JR, Moser VC. Acute postnatal exposure to brominated diphenylether 47 delays neuromotor ontogeny and alters motor activity in mice. *Neurotoxicology and Teratology* 2007; 30(2): 79 - 87.
- Geyer HJ, Schramm KW, Darnerud PO, et al. Terminal elimination half-lives of the brominated flame retardants TBBPA, HBCD, and lower brominated PBDEs in humans. *Organohalogen Compounds* 2004; 66: 3867 - 3872.
- Gill WB, Schumacher GFB, Bibbo M. Genital and semen abnormalities in adults males two and one-half decades after in utero exposure to diethylstilbestrol. In: *Intrauterine Exposure to Diethylstilbestrol in the Human* (Herbst AL, ed.). Chicago: American College of Obstetricians and Gynecologists 1978.

- Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult female offspring rats. *Toxicology*. 2007; 229(1 - 2): 114 - 122.
- Guillette LJ Jr, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives* 1995; 103 Suppl 7: 157 - 164.
- Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 549 - 555.
- Haglund PS, Zook DG, Buser HR, Hu J. Identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers and methoxy-polybrominated diphenyl ethers in baltic biota. *Environmental Science and Technology* 1997; 31: 3281 - 3287.
- Hale RC, La Guardia MJ, Harvey EP, Mainor TM, Duff WH, Gaylor MO. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in Virginia freshwater fishes (USA). *Environmental Science and Technology* 2001; 35: 4585 - 4591.
- Hallgren S, Darnerud PO. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats-testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology* 2002; 177: 227 - 243.
- Hallgren S, Sinjari T, Hakansson H, Darnerud PO. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Archives of Toxicology* 2001; 75: 200 - 208.
- Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, et al. Biotransformation of brominated flame retardants into potentially endocrine-disrupting metabolites, with special attention to 2,2,9,4,4,9-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). *Molecular Nutrition & Food Research* 2008; 52: 284 - 298.
- Handley S, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1984; 327(1): 1 - 5.
- Harrad S, Porter L. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers in blood serum from New Zealand. *Chemosphere* 2007; 66: 2019 - 2023.
- Hites RA. Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: a meta-analysis of concentrations. *Environmental Science and Technology* 2004; 38: 945 - 956.
- Hooper K, McDonald TA. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108: 387 - 392.

- Howdeshell KL. A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environmental Health Perspectives* 2002; 110 Suppl 3: 337 - 348.
- Huisman M, Koopman-Esseboom C, Fidler V, et al. Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins and its effect on neonatal neurological development. *Early Human Development* 1995a; 41: 111 - 127.
- Huisman M, Koopman-Esseboom C, Lanting CI, et al. Neurological condition in 18-month-old children perinatally exposed to polychlorinated biphenyls and dioxins. *Early Human Development* 1995b; 43: 165 - 176.
- Huwe JK, Larsen GL. Polychlorinated dioxins, furans, and biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in a U.S. meat market basket and estimates of dietary intake. *Environmental Science and Technology* 2005; 39: 5606 - 5611.
- Jen KC, Wehmer F, Morofski J. Effects of undernutrition and litter size on material variables and pup development. *Developmental Psychobiology* 1978; 11(3): 279 - 287.
- Kalantzi OI, Martin FL, Thomas GO, et al. Different levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and chlorinated compounds in breast milk from two U.K. Regions. *Environmental Health Perspectives* 2004; 112: 1085 - 1091.
- Kelleher KJ, McInerney TK, Gardner WP, Childs GE, Wasserman RC. Increasing identification of psychosocial problems: 1979 - 1996. *Pediatrics* 2000; 105: 1313 - 1321.
- Kiviranta H, Ovaskainen ML, Vartiainen T. Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and PBDEs in Finland. *Environment International* 2004; 30: 923 - 932.
- Krupp PP, Lee KP. The effects of dietary iodine on thyroid ultrastructure. *Tissue and Cell* 1988; 20: 79 - 88.
- Kuriyama SN, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. Developmental exposure to low-dose PBDE-99: Effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113: 149 - 154.
- Kuriyama SN, Wanner A, Fidalgo-Neto AA, Talsness CE, Koerner W, Chahoud I. Developmental exposure to low-dose PBDE-99: tissue distribution and thyroid hormone levels. 2007; 242(1 - 3): 80 - 90.
- Labandeira A, Eljarrat E, Barcelo D. Congener distribution of polybrominated diphenyl ethers in feral carp (*Cyprinus carpio*) from the Llobregat River, Spain. *Environmental Pollution* 2007; 146: 188e195.
- Law RJ, Alaee M, Allchin CR, et al. Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. *Environment International* 2003; 29: 757 - 770.

- Letcher RJ, Behnisch PA. The state-of-the-science and trends of brominated flame retardants in the environment: present knowledge and future directions. *Environment International* 2003; 29: 663 - 664.
- Lichtensteiger W, Faass O, Ceccatelli R, Schlumpf M. Developmental exposure to PBDE 99 and PCB affects estrogen sensitivity of target genes in rat brain regions and female sexual behavior. *Organohalogen Compounds* 2004; 66: 3965 - 3970.
- Lilienthal H, Altmann L, Hack A, Roth-Harer A, Kaya H, Hany J. Effects of developmental exposure to PCBs and PBDE on sex-dependent behavior in rats (abstract). *Reproductive Toxicology* 2003; 17: 481 - 482.
- Lilienthal H, Hack A, Roth-Harer A, Grande SW, Talsness CE. Effects of Developmental Exposure to 2,2,4,4,5-Pentabromodiphenyl Ether (PBDE-99) on Sex Steroids, Sexual Development, and Sexually Dimorphic Behavior in Rats. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114(2): 194 - 201.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92(2): 180 - 185.
- Lochry E, Hoberman AM, Christian MS. Standardization and application of behavioral teratology screens. In: *Safety evaluation and regulation of chemical 3* Basel, Karger, 1986; 49 - 61.
- Marsh G, Bergman A, Bladh LG, Gillner M, Jakobsson E. Synthesis of p-hydroxybromodiphenyl ethers and binding to the thyroid hormone receptor. *Organohalogen Compounds* 1998; 37: 305 - 307.
- Mazdai A, Dodder NG, Abernathy MP, Hites RA, Bigsby RM. Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111(9): 1249 - 1252.
- Mead LA, Hargreaves EL, Galea LAM. Sex differences in rodent spontaneous activity levels. In: *Motor Activity and Movement Disorders* (Sanberg PR, Ossenkopp KP, Kavaliers M, eds.). Totowa, NJ: Humana Press 1996; 111 - 139.
- Meerts IATM, Luijks EAC, Marsh G, Jakobsson E, Bergman A, Brouwer A. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) as Ah-receptor agonist and antagonists. *Organohalogen Compounds* 1998; 37: 147 - 150.
- Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, et al. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 399 - 407.
- Meerts IA, van Zanden JJ, Luijks EA, et al. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological Sciences* 2000; 56: 95 - 104.
- Meironyte GD, Bergman A, Noren K. Polybrominated diphenyl ethers in Swedish human liver and adipose tissue. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2001; 40: 564 - 570.

- Meironyte D, Noren K, Bergman A. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972 - 1997. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 1999; 58: 329 - 341.
- Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109(3): 229 - 237.
- Morf LS, Tremp J, Gloor R, Huber Y, Stengele M, Zennegg M. Brominated flame retardants in waste electrical and electronic equipment: substance flows in a recycling plant. *Environmental Science and Technology* 2005; 39: 8691 - 8699.
- Morreale de EG, Obregon MJ, Escobar del RF. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85: 3975 - 3987.
- Nagy ZM, Porada KJ, Anderson JA. Undernutrition by rearing in large litters delays the development of reflexive, locomotor, and memory processes in mice. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 1977; 91: 682 - 696.
- Ogata R, Omura M, Shimasaki Y, et al. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 2001; 63(2): 127 - 144.
- Omura M, Ogata R, Kubo K, et al. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. *Toxicological Science*. 2001; 64(2): 224 - 232.
- Pellow S, Chopin P. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1985; 14(3): 149 - 167.
- Peng X, Tang C, Yu Y, Tan J, Huang Q, Wu J. Concentrations, transport, fate, and releases of polybrominated diphenyl ethers in sewage treatment plants in the Pearl River Delta, South China. *Environment International* 2008. (doi: 10.1016/j.envint.2008.07.021.)
- Pop VJ, Kuijpers JL, van Baar AL, et al. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clinical Endocrinology*. Oxford, 1999; 50: 149 - 155.
- Porterfield SP. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals-potential impact on brain development. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108 Suppl 3: 433 - 438.
- Porterfield SP. Vulnerability of the developing brain to thyroid abnormalities: environmental insults to the thyroid system. *Environmental Health Perspectives* 1994; 102 Suppl 2: 125 - 130.
- Ramos A, Mormede P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 1998; 22: 33 - 57.

- Renner MJ, Rosenzweig MR. The golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) as a model for the effects of environmental enrichment in solitary animals. *Developmental psychobiology* 1987; 20(1): 19 - 24.
- Richardson VM, Staskal DF, Ross DG, Diliberto JJ, DeVito MJ, Birnbaum LS. Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007; 226: 244 - 250.
- Rice DC, Reeve EA, Herlihy A, Zoeller RT, Thompson WD, Markowski VP. Developmental delays and locomotor activity in the C57BL6/J mouse following neonatal exposure to the fully-brominated PBDE, decabromodiphenyl ether. *Neurotoxicology and Teratology* 2007; 29(4): 511 - 520.
- Robison LM, Skaer TL, Sclar DA, Galin RS. Is attention deficit hyperactivity disorder increasing among girls in the US? Trends in diagnosis and the prescribing of stimulants. *CNS Drugs* 2002; 16: 129 - 137.
- Rodgers RJ, Cole JC. Anxiolytic-like effect of (S)-WAY 100135, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze test. *European Journal of Pharmacology* 1994; 261(3): 321 - 325.
- Schechter A, Papke O, Tung KC, Staskal D, Birnbaum L. Polybrominated diphenyl ethers contamination of United States food. *Environmental Science and Technology* 2004; 38: 5306 - 5311.
- Schechter A, Pavuk M, Papke O, Ryan JJ, Birnbaum L, Rosen R. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in U.S. Mothers' Milk. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111: 1723 - 1729.
- Schlumpf M, Durrer S, Faass O, et al. Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. *International Journal of Andrology*. 2008; 31(2): 144 - 151.
- She J, Holden A. Unusual pattern of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in US breast milk. *Organohalogen Compounds* 2004; 66: 3945 - 3950.
- She J, Petreas M, Winkler J, Visita P, McKinney M, Kopec D. PBDEs in the San Francisco Bay Area: measurements in harbor seal blubber and human breast adipose tissue. *Chemosphere* 2002; 46: 697 - 707.
- Sjodin A, Jones RS, Focant JF, et al. Retrospective time-trend study of polybrominated diphenyl ether and polybrominated and polychlorinated biphenyl levels in human serum from the United States. *Environmental Health Perspectives* 2004; 112: 654 - 658.
- Sjodin A, Patterson DG Jr, Bergman A. Brominated flame retardants in serum from U.S. blood donors. *Environmental Science and Technology* 2001; 35: 3830 - 3833.

- Sjodin A, Patterson DGJr., Bergman A. A review on human exposure to brominated flame retardants--particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment International* 2003; 29: 829 - 839.
- Slob AK, Bogers H, van Stolk MA. Effects of gonadectomy and exogenous gonadal steroids on sex differences in open field behaviour of adult rats. *Behavioural Brain Research* 1981; 2: 347 - 362.
- Soderstrom G, Sellstrom U, de Wit CA, Tysklind M. Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209). *Environmental Science and Technology* 2004; 38: 127 - 132.
- Spliethoff HM, Bloom MS, Vena J, Sorce J, Aldous KM, Eadon G. Exploratory assessment of sportfish consumption and polybrominated diphenyl ether exposure in New York State anglers. *Environmental Research* 2008. (doi: 10.1016/j.envres.2008.07.009)
- Stapleton HM, Baker JE. Comparing polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl bioaccumulation in a food web in Grand Traverse Bay, Lake Michigan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2003; 45: 227 - 234.
- Staskal DF, Diliberto JJ, Birnbaum LS. Disposition of BDE 47 in developing mice. *Toxicological Sciences* 2006a; 90: 309 - 316.
- Staskal DF, Diliberto JJ, DeVito MJ, Birnbaum LS. Toxicokinetics of BDE 47 in Female Mice: Effect of Dose, Route of Exposure, and Time. *Toxicological Sciences* 2004.
- Stoker TE, Laws SC, Crofton KM, Hedge JM, Ferrell JM, Cooper RL. Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicological Sciences* 2004; 78: 144 - 155.
- Suvorov A, Girard S, Lachapelle S, Abdelouahab N, Sebire G, Takser L. Perinatal exposure to low-dose BDE-47, an emergent environmental contaminant, causes hyperactivity in rat offspring. *Neonatology* 2009; 95(3): 203 - 209.
- Thiel R, Chahoud I, Schwabe R, Neubert D. Device for monitoring locomotor activity of 120 animals: motility of offspring of dams exposed to haloperidol. *Neurotoxicology* 1989; 10: 621 - 628.
- Tropp J, Markus EJ. Sex differences in the dynamics of cue utilization and exploratory behavior. *Behavioural Brain Research* 2001; 119: 143 - 154.
- Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to the brominated flame retardant 2,2',4,4',5- pentabromodiphenyl ether causes altered susceptibility in the cholinergic transmitter system in the adult mouse. *Toxicological Sciences* 2002; 67: 104 - 107.
- Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to polybrominated diphenyl ether (PBDE 153) disrupts spontaneous behaviour, impairs learning and

memory, and decreases hippocampal cholinergic receptors in adult mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003a; 192: 95 - 106.

Viberg H, Fredriksson A, Jakobsson E, Orn U, Eriksson P. Neurobehavioural Derangements in Adult Mice Receiving Decabrominated Diphenyl Ether (PBDE 209) During a Defined Period of Neonatal Brain Development. *Toxicological Sciences* 2003b; 76: 112 - 120.

Wilford BH, Harner T, Zhu J, Shoeib M, Jones KC. Passive sampling survey of polybrominated diphenyl ether flame retardants in indoor and outdoor air in Ottawa, Canada: implications for sources and exposure. *Environmental Science and Technology* 2004; 38: 5312 - 5318.

World Health Organization. Environmental Health Criteria 162 - Brominated Diphenyl Ethers. WHO 1994.

Zennegg M, Kohler M, Gerecke AC, Schmid P. Polybrominated diphenyl ethers in whitefish from Swiss lakes and farmed rainbow trout. *Chemosphere* 2003; 51: 545 - 553.

Zhou T, Ross DG, DeVito MJ, Crofton KM. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicological Sciences* 2001; 61: 76 - 82.

Zhou T, Taylor MM, DeVito MJ, Crofton KM. Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicological Sciences* 2002; 66: 105 - 116.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei:

Prof. Dr. Ibrahim Chahoud für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Anleitung zur Verwirklichung dieser Arbeit.

Dr. Sergio N. Kuriyama für die Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils und die fachlichen Diskussionen.

Dr. Konstanze Grote danke ich ebenfalls für ihre fachliche Unterstützung.

Dr. Chris Talsness, Brigitte Woelffel, Heike Marburger, Christine Gericke, Harald Weinrich, Werner Wittfoht, Norbert Hinz, Klaus Duwe, Hans Figuhr, Omar Ghannam und Ursula Schwikowski für ihre Unterstützung bei jeglichen Fragen.

Carolin Hobler, Christina A. M. de Souza, Antonio A. Fidalgo-Neto, Christian Rangel, Dr. Anderson Andrade, Dr. Simone W. Grande und Kenia Presibella für die Zeit im Institut als ein herzliches und motivierendes Team von Doktoranden und Gastwissenschaftlern.

Meinen Freunden und

meiner Familie.

CURRICULUM VITAE

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

ERKLÄRUNG

„Ich, Zeynep Akkoc, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Auswirkung niedriger Dosierungen des Flammschutzmittels 2,2',4,4'-Tetrabromdiphenylether (PBDE 47) auf die Entwicklung von Ratten nach prä- und postnataler Exposition“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift