

Bartłomiej Milanowski



***Ocena wpływu glikoproteiny-P
na rozmieszczenie wybranych chiralnych kongenerów
polichlorowanych bifenyli u myszy***

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Janina Lulek

Poznań, 2012

Słowa kluczowe: polichlorowane bifenyle, atropoizomery, frakcja enancjomeryczna, metabolizm, transport aktywny, glikoproteina-P, myszy transgeniczne, chemometria, analiza wielowymiarowa, analiza głównych składowych

***Praca została wykonana
w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
we współpracy z
Department of Occupational and Environmental Health,
University of Iowa, Iowa City, USA
i przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
celem uzyskania stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych
przez
magistra farmacji Bartłomieja Milanowskiego***

**Pragnę gorąco podziękować Wszystkim,
którzy pomogli mi w realizacji niniejszej pracy doktorskiej,
a w szczególności:**

Pani Prof. dr hab. Janinie Lulek,
za pomoc w wyborze interesującego tematu,
przekazaną wiedzę i doświadczenie,
życzliwe zainteresowanie postępami pracy,
okazaną cierpliwość i wyrozumiałość, cenne wskazówki
i wszechstronną pomoc w czasie realizacji i redagowania pracy.

**Pragnę bardzo serdecznie podziękować
Panu Dr Hansowi-Joachimowi Lehmlerowi oraz Pani Dr Izabeli Korwel**
za wskazanie interesującego tematu i możliwość wykonania badań,
za przekazaną wiedzę oraz cenne wskazówki,
za życzliwą opiekę oraz ciepłą i przyjazną atmosferę pracy w trakcie stażu
doktorskiego w USA.

**Niniejszą pracę dedykuję Żonie i Rodzicom, dziękując za to, że zawsze
mnie wspierali, za okazaną cierpliwość i poświęcony czas.**

Badania wykonane w ramach niniejszej pracy były współfinansowane z następujących źródeł:

- grants ES05605, ES013661 and ES012475 from the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), National Institutes of Health (NIH), U.S. Department of Health and Human Services (DHHS), USA;
- pilot grant *“Are individual PCB congeners Substrates for the Multidrug Resistance Transporter mdr1a/b in Mice?”* from the Environmental Health Sciences Research Center (EHSRC), College of Public Health, University of Iowa, USA;
- projekt badań własnych 501-01-03314429-50445/2008 – *“Czy chiralne kongenery polichlorowanych bifenyli (PCB) są substratem dla transformerów białkowych kodowanych genem mdr 1a/b u myszy?”* Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu;
- stypendium na rok akademicki 2010/11 w ramach projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Poddziałania 8.2.2. Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.

Spis treści

I. WYKAZ SKRÓTÓW I TERMINÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY	8
II. WSTĘP.....	11
III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	16
1. CHARAKTERYSTYKA POLICHLOROWANYCH BIFENYLI	16
1.1. Budowa i otrzymywanie.....	16
1.2. Chiralne PCB i ich metabolity.....	18
1.2.1. Aktywność optyczna związków chemicznych.....	18
1.2.2. Atropoizomeria PCB i ich metabolitów.....	20
1.2.3. Parametry definiujące skład chiralny pary atropoizomerów PCB	24
1.3. Właściwości fizykochemiczne i zastosowanie PCB.....	25
1.3.1. Właściwości fizykochemiczne metylosulfonowych i hydroksylowych pochodnych PCB	27
1.4. Losy PCB w środowisku	27
1.5. Toksykokinetyka PCB	30
1.5.1. Wchłanianie.....	31
1.5.2. Dystrybucja.....	33
1.5.2.1. Transportery błonowe - nadrodzina białek ABC.....	37
1.5.2.1.1. Glikoproteina-P - struktura, lokalizacja oraz mechanizm działania	38
1.5.3. Biotransformacja i metabolity.....	40
1.5.4. Wydalanie	43
1.6. Mechanizmy toksycznego działania PCB i ich metabolitów	43
1.6.1. Aktywność biochemiczna i toksyczność chiralnych PCB	47
1.7. Skutki zdrowotne środowiskowego narażenia na PCB	49
1.8. Ocena i oszacowanie ryzyka narażenia na PCB	51
2. ANALITYKA PCB I ICH METABOLITÓW W MATERIALE BIOLOGICZNYM.....	55
2.1. Pobieranie i przechowywanie próbek	56
2.2. Metody wyodrębniania analitów z matrycy.....	56
2.3. Frakcjonowanie ekstraktów	59
2.4. Metody oczyszczania ekstraktów	60
2.5. Identyfikacja i oznaczanie PCB w oczyszczonych ekstraktach	60
3. TECHNIKI CHEMOMETRYCZNE W BADANIACH ANALITYCZNYCH	65
3.1. Analiza wariancji	68
3.2. Analiza czynnikowa.....	68
3.3. Analiza skupień.....	70
3.3. Analiza funkcji dyskryminacyjnej	71
IV. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL PRACY	72
V. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	73
1. ODCZYNNIKI, WZORCE I APARATURA	73
1.1. Anality.....	73
1.2. Roztwory wzorcowe chiralnych PCB.....	73
1.3. Wzorce odzysku metody oznaczania PCB w matrycach biologicznych.....	75
1.4. Wzorce wewnętrzne (chromatograficzne)	75
1.5. Adsorbenty	75
1.5.1. Aktywowanie adsorbentów.....	75
1.5.1. Impregnowanie żelu krzemionkowego.....	75
1.6. Chromatograf gazowy	75
1.6.1. Warunki analizy GC- μ ECD.....	76
1.6.1.1. Rozdzielanie chromatograficzne (GC).....	76
1.6.1.2. Detekcja μ ECD	77
2. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ	78
2.1. Zakres i miejsce prowadzenia badań	78
2.2. Opracowanie i walidacja metod oznaczania PCB w matrycach biologicznych	78
2.2.1. Analiza chromatograficzna.....	78
2.2.1.1. Ocena precyzji parametrów retencyjnych	78
2.2.1.2. Ocena precyzji parametrów ilościowych	80

2.2.1.3. Kalibracja detektora μ ECD.....	81
2.2.1.4. Wyznaczenie granicy wykrywalności układu GC- μ ECD.....	82
2.2.2. Metodyka przygotowania próbek do oznaczania PCB techniką GC- μ ECD.....	83
2.2.2.1. Modyfikacja standardowych procedur operacyjnych (SOP)	85
2.2.2.1.1. Wybór adsorbentów stosowanych do oczyszczania ekstraktów zawierających PCB	85
2.2.2.1.2. Ocena precyzji grawimetrycznego oznaczania tłuszczu	86
2.2.2.2. Ocena jakości Standardowych Procedur Operacyjnych.....	87
2.2.2.2.1. Przygotowanie wzbogaconych PCB próbek materiału biologicznego	87
2.2.2.2.2. Wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności metod	87
2.2.2.2.3. Ocena precyzji metod	88
2.2.2.2.4. Ocena dokładności metod	90
2.2.2.2.5. Ocena liniowości metod.....	90
2.3. Badania <i>in vivo</i>	92
2.3.1. Ustalenie składu mieszaniny chiralnych PCB w roztworze olejowym do podania <i>per os</i>	92
2.3.2. Przygotowanie roztworu olejowego chiralnych PCB do podania <i>per os</i>	92
2.3.3. Badania na zwierzętach	94
2.3.3.1. Zwierzęta laboratoryjne	94
2.3.3.2. Procedura badań na modelu zwierzęcym	94
2.3.3.3. Próbkę matryc biologicznych	95
2.4. Schemat postępowania analitycznego.....	97
2.4.1. Przygotowanie próbek materiału biologicznego do analizy GC- μ ECD.....	97
2.4.2. Izolacja analitów: metody ekstrakcji rozpuszczalnikami wspomagane wytrząsaniem	97
2.4.3. Oddzielanie PCB od metabolitów.....	98
2.4.4. Oczyszczanie ekstraktów.....	99
2.4.5. Analiza jakościowa i ilościowa ekstraktów.....	100
2.4.6. Zapewnienie i kontrola jakości oznaczeń.....	105
2.4.7. Ocena chemometryczna i statystyczna wyników.....	107
2.4.7.1. Analiza chemometryczna (wielowymiarowa).....	108
2.4.7.2. Analiza statystyczna.....	113
VI. WYNIKI	114
VII. OMÓWIENIE WYNIKÓW	142
1. POZIOMY CHIRALNYCH PCB W BADANYCH ORGANACH, TKANKACH I WYDALINACH MYSZY	143
1.1. Różnice międzygrupowe (WT vs KO) w obrębie danej matrycy	144
1.2. Różnice międzytkankowe w obrębie danej grupy (WT lub KO).....	146
2. DYSTRYBUCJA ATROPOIZOMERÓW PCB W TKANKACH, ORGANACH I WYDALINACH MYSZY WT I KO.....	147
2.1. Różnice międzygrupowe (WT vs KO) w obrębie danej matrycy	149
2.2. Różnice międzytkankowe w obrębie danej grupy (WT lub KO).....	150
2.3. Rozmieszczenie atropoizomerów PCB w organizmach myszy (wyniki badań własnych) i innych ssaków (dane z piśmiennictwa).....	151
VIII. WNIOSKI.....	153
IX. PIŚMIENNICTWO.....	154
X. ANEKS	171
SOP_BM1_v2.0	171
SOP_BM2_v2.0	180
XI. WYKAZ TABEL	188
XII. WYKAZ RYCIN	190
XIII. WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH DOKTORANTA	191
XIV. STRESZCZENIE.....	192
XV. SUMMARY	194

I. WYKAZ SKRÓTÓW I TERMINÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY

- %TD** – ułamek dawki całkowitej wyrażony w [%] (*ang. % of the total dose*)
- 2,3,7,8-TCDD** – 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioksyna (*ang. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*)
- 3MC** – 3-metylocholanren (*ang. 3-methylcholanthrene*)
- ABC** – transportery ABC (*ang. ATP-Binding cassette transporters*)
- ABCB1** – białko 1 wielolekowej oporności (*ang. ATP-Binding Cassette, subfamily B, member 1*)
- ACN** – acetonitryl (*ang. Acetonitrile*)
- ADI** – akceptowane dzienne pobranie (*ang. Acceptable daily intake*)
- AHH** – hydroksylaza węglowodorów aromatycznych (*ang. Aryl hydrocarbon hydroxylase*)
- AhR** – receptor aryłowęglowodorowy (*ang. Aryl hydrocarbon receptor*)
- ANN** – sztuczne sieci neuronowe (*ang. Artificial Neuron Networks*)
- ANOVA** – analiza wariancji (*ang. Analysis of Variance*)
- ASE** – przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (*ang. Accelerated solvent extraction*)
- BPDM** – demetylaza benzfetaminy (*ang. Benzphetamine N-demethylase*)
- ATP** – adenozyno-5'-trifosforan (*ang. Adenosine-5'-triphosphate*)
- CA** – analiza skupień (*ang. Cluster Analysis*)
- CAR** – konstytutywny receptor androstanu (*ang. Constitutive Androstane Receptor*)
- CYP** – cytochrom P-450 (*ang. Cytochrome P-450*)
- DA** – analiza dyskryminacyjna (*ang. Discriminative Analysis*)
- DCM** – dichlorometan (*ang. Dichloromethane*)
- DMSO** – dimetylosulfotlenek (*ang. Dimethyl sulfoxide*)
- DNA** – kwas dezoksyrybonukleinowy (*ang. Deoxyribonucleic acid*)
- ECD** – detektor wychwytu elektronów (*ang. Electron capture detector*)
- EDI** – szacunkowe dzienne pobranie (*ang. Estimated Daily Intake*)
- ee** – nadmiar enancjomeryczny (*ang. Enantiomeric excess*)
- EF** – frakcja enancjomeryczna (*ang. Enantiomeric fraction*)
- EI** – jonizacja elektronowa (*ang. Electron ionization*)
- EMA** – analiza członów końcowych (*ang. End Members Analysis*)
- EPA** – Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (*ang. Environmental Protection Agency*)
- ER** – stosunek enancjomeryczny (*ang. Enantiomeric ratio*)
- EROD** – o-deetylaza etoksyresorufiny (*ang. Ethoxyresorufin-O-deethylase*)
- FA** – analiza czynnikowa (*ang. Factor Analysis*)
- FDA** – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (*ang. Food and Drug Administration*)
- FID** – detektor płomieniowo-jonizacyjny (*ang. Flame ionisation detector*)
- GC** – chromatografia gazowa (*ang. Gas chromatography*)
- GC x GC** – dwuwymiarowa chromatografia gazowa (*ang. Two dimensional gas chromatography*)
- GPC** – chromatografia żelowa (*ang. Gel permeation chromatography*)
- GSH** – glutation (*ang. glutathione*)

GST – transferaza S-glutationu (*ang. **Glutathione S-transferase***)

HDL – frakcja lipoprotein o dużej gęstości (*ang. **High density lipoprotein***)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang. **High performance liquid chromatography***)

HRGC – wysokorozdzielcza chromatografia gazowa (*ang. **High resolution gas chromatography***)

IDL – granica wykrywalności stosowanego przyrządu (*ang. **Instrumental detection method***)

IS – wzorzec wewnętrzny (*ang. **Internal standard***)

IUPAC – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (*ang. **International Union of Pure and Applied Chemistry***)

K_{ow} – współczynnik podziału oktanol/woda

LDL – frakcja lipoprotein o małej gęstości (*ang. **Low density lipoprotein***)

LE – ekstrakcja za pomocą cieczy (*ang. **Liquid extraction***)

LLE – ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (*ang. **Liquid-liquid extraction***)

LOD – granica wykrywalności (*ang. **Limit of detection***)

LOQ – granica oznaczalności (*ang. **Limit of quantification***)

MAE – ekstrakcja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (*ang. **Microwave assisted extraction***)

MAP – szlak przemian kwasu merkapturowego (*ang. **Mercapturic acid pathway***)

MDGC – wielowymiarowa chromatografia gazowa (*ang. **Multidimensional gas chromatography***)

MDL – granica wykrywalności metody analitycznej (*ang. **Method detection limit***)

MDR – oporność wielolekowa (*ang. **Multidrug resistance***)

MDR1 – gen kodujący białko 1 wielolekowej oporności (*ang. **Multidrug resistance protein 1 gene***)

MeO-PCB – etery metylowe polichlorowanych bifenyli (*ang. **Methyl ether polychlorinated biphenyls***)

MeSO₂-PCB – metylosulfonowe pochodne polichlorowanych bifenyli (*ang. **Methyl sulfonyl polychlorinated biphenyls***)

MLQ – granica oznaczalności metody analitycznej (*ang. **Method quantification limit***)

MROD – o-demetylaza metoksyrezorufiny (*ang. **Methoxyresorufin O-demethylase***)

MS – spektrometria mas (*ang. **Mass spectrometry***)

MTBE – eter tert-butyloowo-metylowy (*ang. **Methyl t-butyl ether***)

n – liczba próbek

n.o. – nie oznaczono

NBD – domena wiążąca ATP (*ang. **nucleotide binding domain***)

OH-PCB – hydroksylowe pochodne polichlorowanych bifenyli (*ang. **Hydroxylated polychlorinated biphenyls***)

p – poziom istotności

PB – fenobarbital (*ang. **Phenobarbital***)

PCA – analiza głównych składowych (*ang. **Principal Component Analysis***)

PCB – polichlorowane bifenylo (*ang. **Polychlorinated biphenyls***)

PCDD – polichlorowane dibenzodioxyny (*ang. Polychlorinated dibenzodioxins*)
PCDF – polichlorowane dibenzofurany (*ang. Polychlorinated dibenzofurans*)
P-gp – glikoproteina-P (*ang. P-glycoprotein*)
PKC – kinaza białkowa C (*ang. Protein kinase C*)
PROD – o-depentylaza pentoksyrezorufiny (*ang. Penthoxyresorufin O-depenthylase*)
PXR – receptor pregnanu X (*ang. Pregnane X receptor*)
QA – zapewnienie jakości wyników (*ang. Quality assurance*)
QC – kontrola jakości wyników (*ang. Quality control*)
RRT – względny czas retencji (*ang. Relative retention time*)
RS – wzorzec odzysku (*ang. Recovery standard*)
RSD – względne odchylenie standardowe (*ang. Relative standard deviation*)
RT – czas retencji (*ang. Retention time*)
RyR – receptor rianodynowy (*ang. Ryanodine receptor*)
SAR – zależność struktura-aktywność (*ang. Structure-activity relationship*)
SD – odchylenie standardowe (*ang. Standard deviation*)
SFE – ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym (*ang. Supercritical fluid extraction*)
SiOH – żel krzemionkowy (*ang. Silica gel*)
SOP – standardowa procedura operacyjna (*ang. Standard operating procedure*)
SPE – ekstrakcja do fazy stałej (*ang. Solid phase extraction*)
SPMD – dializa przez półprzepuszczalne błony polietylenowe (*ang. Semipermeable membrane devices*)
SPME – mikroekstrakcja do fazy stałej (*ang. Solid phase microextraction*)
SULT – sulfotransferaza (*ang. Sulfotransferase*)
t_{0,5} - biologiczny okres półtrwania (*ang. Half-life*)
T4 – tyroksyna (*ang. Thyroxine*)
TDI – tolerowane dzienne pobranie (*ang. Tolerable daily intake*)
TEF – współczynnik równoważny toksyczności 2,3,7,8 -TCDD (*ang. toxic equivalent factor*)
TEQ – równoważnik toksyczności (*ang. Toxic equivalent quantity*)
TMD – domena transbłonowa (*ang. transmembrane domain*)
TSH – hormon tyreotropowy (*ang. Thyroid-stimulating hormone*)
TTR – transtyretyna (*ang. Transthyretin*)
TZO (POP) – trwałe zanieczyszczenia organiczne (*ang. Persistent organic pollutants*)
UGT – transferaza urydyno-5'-difosfoglukuronowa (*ang. Uridine 5'-diphospho glucuronosyltransferase*)
UNEP – Program Środowiskowy Organizacji Narodów Zjednoczonych (*ang. United Nations Environment Programme*)
VLDL – frakcja lipoprotein o bardzo małej gęstości (*ang. Very low density lipoprotein*)
WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organization*)
WWA (PAH) – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (*ang. Polycyclic aromatic hydrocarbons*)
Wz (CV)– współczynnik zmienności (*ang. Coefficient of variation*)

II. WSTĘP

Ciągłe dążenie współczesnego człowieka do zmieniania, ulepszania, czy też kształtowania otaczającego go świata według swoich rosnących potrzeb, wymagań i oczekiwań, stało się przyczyną globalnego zanieczyszczenia środowiska naturalnego olbrzymią, praktycznie niemożliwą do oszacowania, liczbą związków chemicznych - tzw. ksenobiotyków. Ich obecność w środowisku jest m.in. efektem: rozwoju przemysłu i towarzyszących mu odpadów, ścieków i pyłów; motoryzacji; ciągłego wzrostu zapotrzebowania na energię; wreszcie masowego stosowania w rolnictwie środków ochrony roślin i nawozów sztucznych.

Dzięki postępowi w nauce wiadomo dziś, że wiele związków chemicznych i technologii, uznawanych niegdyś za "bezpieczne" i "nieszkodliwe", może ujemnie wpływać na zdrowie ludzi oraz stan środowiska.

Szczególną grupą zanieczyszczeń środowiska, której w ostatnich latach poświęca się coraz więcej uwagi są tzw. trwałe zanieczyszczenia organiczne (TZO), ujęte na liście Konwencji Sztokholmskiej z 2001 roku. Do grupy tej należy wiele różnych związków chemicznych charakteryzujących się następującymi cechami [1]:

- zdolnością do wywoływania efektów toksycznych,
- trwałością we wszystkich elementach środowiska,
- zdolnością do biokumulacji,
- zdolnością do transportu atmosferycznego na duże odległości,
- zdolnością do wywoływania niekorzystnych skutków w środowisku i dla człowieka zarówno w pobliżu, jak i w dużej odległości od źródła zanieczyszczenia.

Biorąc pod uwagę: okres półtrwania niektórych TZO, sięgający nawet kilkudziesięciu lat; ich zdolność do transkontynentalnej migracji do najodleglejszych zakątków kuli ziemskiej; a także mając świadomość, że człowiek stanowi ostatnie ogniwo łańcucha pokarmowego, narażenie na te związki będzie trwało przez kolejne dziesięciolecia stawiając przed toksykologią środowiskową wciąż nowe wyzwania.

Jedną z grup TZO stanowią polichlorowane bifenylole (PCB). Właściwości fizykochemiczne oraz długotrwałe i powszechne stosowanie PCB w przemyśle, zaowocowały

ich wszechobecnością w środowisku [1-3]. Obecnie, praktycznie cała populacja ludzka jest narażona na chroniczną ekspozycję na małe dawki PCB. Jest ona konsekwencją istnienia poziomu tła tych ksenobiotyków w skali globalnej, zróżnicowanego w zależności od stosowanej diety, położenia geograficznego oraz zanieczyszczenia przemysłowego [3]. Narażenie na PCB może mieć miejsce m.in. na skutek katastrof środowiskowych, pobrania z żywnością, *in utero* przez płody oraz poprzez spożywanie mleka kobiecego [4-9].

Długotrwała ekspozycja na PCB może być przyczyną szeregu problemów zdrowotnych, takich jak np. zaburzenia rozwojowe, dysfunkcje układu hormonalnego, nieprawidłowości układu rozrodczego, zaburzenia układu sercowo-naczyniowego i rozwój nowotworów [4, 10-13]. Udowodniono, że polichlorowane bifenyle wykazują także działanie neurotoksyczne, immunotoksyczne oraz promują rozwój nowotworów u zwierząt i dlatego zaliczane są do związków o potencjalnym działaniu rakotwórczym u ludzi [3, 6, 14].

W zależności od liczby i położenia atomów chloru w szkielecie bifenylu można teoretycznie wyróżnić 209 kongenerów PCB (łac.: *cum + genus = krewny*). Wynikające z budowy przestrzennej właściwości fizykochemiczne i uwarunkowane nimi efekty biologiczne nie są identyczne w obrębie całej grupy związków. Stwierdzono, że największy wpływ na konformację przestrzenną cząsteczki PCB ma podstawienie atomu chloru w pozycji *orto*-. W zależności od trójwymiarowej struktury, kongenery PCB wiążą się z różnymi miejscami docelowymi w komórkach, co w konsekwencji odpowiada za różne mechanizmy ich działania toksycznego [3, 4, 6].

Mimo nieustannego postępu wiedzy o wpływie tych ksenobiotyków na organizmy żywe, wiele pytań i wątpliwości dotyczących toksyczności poszczególnych związków wciąż pozostaje bez odpowiedzi [15, 16]. Głównie jest to spowodowane współobecnością w matrycach biologicznych ponad kilkudziesięciu kongenerów PCB, ich metabolitów oraz innych TZO [3, 4, 17, 18].

PCB niepodstawione w pozycji *orto*- (tzw. PCB planarne – przestrzennie płaskie) oraz niektóre mono- i diortopodstawione są analogami przestrzennymi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (2,3,7,8-TCDD). Mechanizm ich działania i toksyczność są porównywalne z dioksynami, ponieważ tak jak one, związki te mają zdolność wiązania się z cytozolowym receptorem aryłowęglowodorowym (AhR), wywołując m. in.: zmiany w

funkcjonowaniu enzymów, dermatozy, zanik grasicy, zmniejszenie masy ciała oraz teratogenność [3, 4, 19].

Spośród możliwych kongenerów, 19 zawierających 3 lub 4 atomy chloru w pozycji *orto*- występuje w postaci trwałych (nieracemizujących) atropoizomerów, które są lustrzanymi odbiciami jeden drugiego [20-22]. Atropoizomeria stanowi ważną cechę stereochemicznych wpływów PCB na organizmy żywe. Dopiero w ostatnich latach zjawisko atropoizomerii kongenerów PCB przyciągnęło szczególną uwagę ze względu na ich potencjalnie różny los w środowisku oraz różną aktywność biologiczną (+)- i (-)- enancjomerów [23-36]. Stwierdzono, że niektóre tri- i tetraortopodstawione kongenery PCB wykazują zdolność wiązania się z konstytutywnym receptorem androstanu (CAR), pregnanu (PXR) [37], czy receptorami rianodynowymi (RyR) [25, 28, 34, 35]. Inne ortopodstawione PCB są induktorami zarówno receptora aryłowęgłowodorowego (AhR) jak i konstytutywnego receptora androstanu (CAR) [4]. Zainteresowanie losem wieloortopodstawionych kongenerów PCB w organizmach żywych wzmogło się szczególnie po odkryciu ich działania neurotoksycznego [24, 25, 28].

Dla pełnego zrozumienia działania toksycznego chiralnych kongenerów PCB niezbędne jest poznanie mechanizmów ich absorpcji i dystrybucji. Powszechnie uważa się, że wchłanianie i transport cząsteczek PCB jak i innych ksenobiotyków w organizmach żywych zachodzi zgodnie z mechanizmem dyfuzji biernej. W celu wyjaśnienia tego procesu opracowano doświadczenia oparte na analizie modeli mechanistycznych, takich jak np. fluktuacyjny model wypłukiwania tłuszczu (*fat-flush diffusion model*) [38, 39]. Jeżeli założenia tych eksperymentów są poprawne, to nie powinny zachodzić procesy selektywnej absorpcji, dystrybucji i wydalania poszczególnych kongenerów PCB. Jednak wyniki niektórych badań na zwierzętach sugerują, że wchłanianie i depozycja PCB w kompartmentach organizmu zachodzi inaczej pomiędzy różnymi kongenerami [40, 41]. Niestety do tej pory nie przeprowadzono pełnych badań nad aktywnym transportem tej grupy związków w warunkach *in vivo*. Z nielicznych publikacji wynika, że np. PCB 169 (kongener planarny) nie kumuluje się w mózgu szczurów laboratoryjnych [20], z kolei w śledzienie tych zwierząt deponują się wyżej ortopodstawione kongenery PCB [40]. Stwierdzono również, że poszczególne atropoizomery PCB 95, 132 i 149 różnią się od siebie parametrami toksykokinetycznymi ($t_{0,5}$, klirens) [42], a na wyższych szczeblach drabiny troficznej zachodzi enacjoselektywna akumulacja izomerów PCB [36]. Wyniki w/w badań sugerują, że

poszczególne PCB mogą ulegać procesom aktywnego (stereoselektywnego) transportu *in vivo*.

Metabolizm polichlorowanych bifenyli, podobnie jak wielu innych ksenobiotyków w organizmie człowieka, przebiega w wątrobie w dwóch etapach. Podczas I fazy enzymy z rodziny cytochromu P450 utleniają cząsteczkę PCB, tworząc bardzo reaktywny epoksytlenek, a następnie pochodne jedno- lub dwu-hydroksylowe. W II fazie metabolizmu pochodna hydroksylowa ulega sprzęganiu z kwasem glukuronowym lub sulfonowaniu [43, 44]. Analiza osocza krwi ludzkiej wykazała, że powstałe metabolity występują na poziomach porównywalnych z ich związkami macierzystymi [45-48]. Obecnie nadal niewiele wiadomo o dystrybucji, wydalaniu oraz toksyczności metabolitów PCB. Potwierdzono jedynie, że niektóre hydrokso- i metylosulfonowe pochodne PCB (OH-PCB i MeSO₂-PCB) są wybiórczo zatrzymywane zarówno w organizmie ludzkim [49-51] jak i w zwierzęcym [52-56]. Jednym z możliwych mechanizmów selektywnej depozycji tkankowej oraz wydalania metabolitów PCB jest transport aktywny. Do tej pory istnieje niewiele doniesień naukowych na ten temat [36].

Glikoproteina-P (P-gp, ABCB1) należy do rodziny białek transportujących ABC, kodowanych w organizmie człowieka przez gen MDR1 (związany bezpośrednio z opornością wielolekową). Ekspresja P-gp została potwierdzona między innymi na powierzchni hepatocytów (kanaliki), na apikalnej części komórek nabłonka kanalików bliższych w nerce, na apikalnej części komórek nabłonka naczyń krwionośnych tworzących barierę krew/mózg [57]. Białka ABC zyskują energię potrzebną do aktywnego transportu cząsteczek wbrew gradientowi stężeń dzięki hydrolizie ATP. P-gp ma wpływ na: absorpcję ksenobiotyków ze światła jelita, eliminację ksenobiotyków z żółcią [58] oraz przez nerki [57], pokonywanie bariery krew/mózg i bariery łożyskowej [59]. Substratami są zwykle egzogenne, hydrofobowe cząsteczki organiczne o masie cząsteczkowej 330 – 4000 Da, zawierające pierścienie aromatyczne [60, 61]. Białko to usuwa cząsteczki wielu leków i toksyn z wnętrza komórek, zapobiegając ich kumulacji i utrudniając osiągnięcie miejsc docelowych [62].

Badania SAR (ang. Structure-Activity-Relationship) udowodniły, że wiązanie przez P-gp potencjalnych substratów, w dużym stopniu zależy od ich lipofilności, masy cząsteczkowej i budowy przestrzennej [59, 63, 64]. Od wielu lat jest wiadomo, że niektóre z TZO, np. chloroorganiczne pestycydy – takie jak chlordekan, endosulfan, heptachlor i epoksyd heptachloru – są substratem dla P-gp [59]. Polichlorowane bifenyly mają właściwości

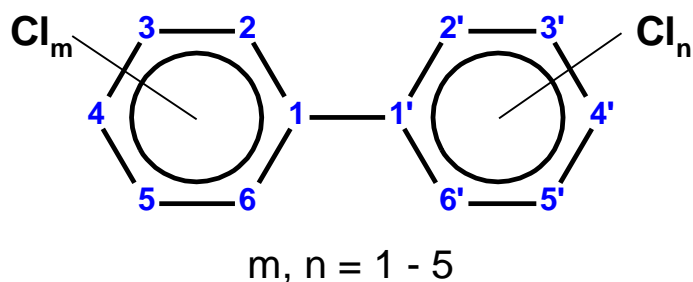
zbliżone do chloroorganicznych pestycydów (np. masę cząsteczkową i lipofilność) i dlatego P-gp wydaje się być możliwym, aktywnym transporterem określonych kongenerów PCB oraz ich metabolitów. Ponadto istnieje zależność wiążąca P-gp z zespołem enzymów mikrosomalnych wątroby, tzn. substraty dla transporterów białkowych kodowanych genem MDR są zwykle substratami dla enzymów z rodziny cytochromu P-450 3A i odwrotnie [59, 65]. Hrycaj i Bandiera [66] udowodnili, że niektóre tetrachloropodstawione bifenyle, o wartości kąta między płaszczyznami pierścieni powyżej 70°, są metabolizowane przez zespół enzymów cytochromu P-450 3A a zatem mogą być substratem dla P-gp. Z przeglądu dostępnego piśmiennictwa wynika, że przeprowadzono dotychczas jeden eksperyment *in vivo*, który wykluczył aktywny transport kongeneru dioksynopodobnego (planarnego), tj. PCB 77, przez transportery kodowane genem *mdr1a* [67] (nie licząc artykułu współautorstwa doktoranta, który powstał w oparciu o wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy [68]).

III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka polichlorowanych bifenyli

1.1. Budowa i otrzymywanie

Polichlorowane bifenylo (PCB), to grupa związków organicznych o wzorze sumarycznym $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, których cząsteczka może zawierać od jednego do dziesięciu atomów chloru, podstawionych w różnych pozycjach pierścieni fenylowych (ryc. 1). W zależności od liczby i położenia atomów chloru w szkielecie bifenyłu istnieje 209 kongenerów PCB, które tworzą 10 grup homologicznych zawierających od 1 do 46 izomerów, a 19 kongenerów to trwałe związki chiralne (tabela 1, niebieska czcionka) [1, 20].



Rycina 1. Wzór cząsteczki bifenyłu.

Pierścienie fenylowe w cząsteczce PCB połączone są pojedynczym wiązaniem typu sigma, co stwarza im możliwość swobodnej rotacji. Stwierdzono, że największy wpływ na konformację przestrzenną cząsteczki ma podstawienie lub niepodstawienie atomem chloru w pozycji *orto*- (pozycje 2,6 i 2',6' w szkielecie bifenyłu - ryc. 1) [2, 69]. Właściwości fizykochemiczne, aktywność biologiczna oraz toksyczność PCB zależy od miejsca podstawienia atomów chloru w pierścieniu bifenylowym. Układ posiadający pierścienie benzenowe w jednej płaszczyźnie i niepodstawione pozycje *orto*- jest najtrwalszy i charakteryzuje się największą toksycznością. PCB o takiej strukturze są płaskie i nazywane są kongenerami planarnymi lub koplanarnymi. Wprowadzenie atomów chloru w pozycję *orto*- powoduje obrót jednego pierścienia bifenyłu, względem drugiego. Im więcej atomów chloru w pozycji *orto*-, tym bardziej kąt pomiędzy płaszczyznami pierścieni fenylowych zbliża się do 90°. Przykładem PCB o strukturze najbardziej zbliżonej do płaskiej jest kongener 77, a jego przeciwieństwem - 54. Kongenery planarne (PCB 77, 81, 126, 169) są analogami przestrzennymi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (2,3,7,8-TCDD) [4, 6].

Tabela 1. System numeracji kongenerów PCB * wg IUPAC [2].

Numer	Podstawienie	Numer	Podstawienie	Numer	Podstawienie	Numer	Podstawienie
Monochlorobifenyle		51	2,2',4,6'	106	2,3,3',4,5	161	2,3,3',4,5',6
1	2	52	2,2',5,5'	107	2,3,3',4',5	162	2,3,3',4',5,5'
2	3	53	2,2',5,6'	108	2,3,3',4,5'	163	2,3,3',4',5,6
3	4	54	2,2',6,6'	109	2,3,3',4,6	164	2,3,3',4',5',6
Dichlorobifenyle		55	2,3,3',4	110	2,3,3',4',6	165	2,3,3',5,5',6
		56	2,3,3',4'	111	2,3,3',5,5'	166	2,3,4,4',5,6
4	2,2'	57	2,3,3',5	112	2,3,3',5,6	167	2,3',4,4',5,5'
5	2,3	58	2,3,3',5'	113	2,3,3',5',6	168	2,3',4,4',5',6
6	2,3'	59	2,3,3',6	114	2,3,4,4',5	169	3,3',4,4',5,5'
7	2,4	60	2,3,4,4'	115	2,3,4,4',6	Heptachlorobifenyle	
8	2,4'	61	2,3,4,5	116	2,3,4,5,6		
9	2,5	62	2,3,4,6	117	2,3,4',5,6	170	2,2',3,3',4,4',5
10	2,6	63	2,3,4',5	118	2,3',4,4',5	171	2,2',3,3',4,4',6
11	3,3'	64	2,3,4',6	119	2,3',4,4',6	172	2,2',3,3',4,5,5'
12	3,4	65	2,3,5,6	120	2,3',4,5,5'	173	2,2',3,3',4,5,6
13	3,4'	66	2,3',4,4'	121	2,3',4,5',6	174	2,2',3,3',4,5,6'
14	3,5	67	2,3',4,5	122	2',3,3',4,5	175	2,2',3,3',4,5',6
15	4,4'	68	2,3',4,5'	123	2',3,4,4',5	176	2,2',3,3',4,6,6'
Trichlorobifenyle		69	2,3',4,6	124	2',3,4,5,5'	177	2,2',3,3',4',5,6
		70	2,3',4',5	125	2',3,4,5,6'	178	2,2',3,3',5,5',6
16	2,2',3	71	2,3',4',6	126	3,3',4,4',5	179	2,2',3,3',5,6,6'
17	2,2',4	72	2,4',5,5'	127	3,3',4,5,5'	180	2,2',3,4,4',5,5'
18	2,2',5	73	2,3',5',6	Heksachlorobifenyle		181	2,2',3,4,4',5,6
19	2,2',6	74	2,4,4',5			182	2,2',3,4,4',5,6'
20	2,3,3'	75	2,4,4',6	128	2,2',3,3',4,4'	183	2,2',3,4,4',5',6
21	2,3,4	76	2',3,4,5	129	2,2',3,3',4,5	184	2,2',3,4,4',6,6'
22	2,3,4'	77	3,3',4,4'	130	2,2',3,3',4,5'	185	2,2',3',4,5,5',6
23	2,3,5	78	3,3',4,5	131	2,2',3,3',4,6	186	2,2',3,4,5,6,6'
24	2,3,6	79	3,3',4,5'	132	2,2',3,3',4,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
25	2,3',4	80	3,3',5,5'	133	2,2',3,3',5,5'	188	2,2',3,4',5,6,6'
26	2,3',5	81	3,4,4',5	134	2,2',3,3',5,6	189	2,3,3',4,4',5,5'
27	2,3',6	Pentachlorobifenyle		135	2,2',3,3',5,6'	190	2,3,3',4,4',5,6
28	2,4,4'			136	2,2',3,3',6,6'	191	2,3,3',4,4',5',6
29	2,4,5	82	2,2',3,3',4	137	2,2',3,4,4',5	192	2,3,3',4,5,5',6
30	2,4,6	83	2,2',3,3',5	138	2,2',3,4,4',5'	193	2,3,3',4',5,5',6
31	2,4',5	84	2,2',3,3',6	139	2,2',3,4,4',6	Oktachlorobifenyle	
32	2,4',6	85	2,2',3,4,4'	140	2,2',3,4,4',6'		
33	2',3,4	86	2,2',3,4,5	141	2,2',3,4,5,5'	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
34	2',3,5	87	2,2',3,4,5'	142	2,2',3,4,5,6	195	2,2',3,3',4,4',5,6
35	3,3',4	88	2,2',3,4,6	143	2,2',3,4,5,6'	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
36	3,3',5	89	2,2',3,4,6'	144	2,2',3,4,5',6	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
37	3,4,4'	90	2,2',3,4',5	145	2,2',3,4,6,6'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
38	3,4,5	91	2,2',3,4',6	146	2,2',3,4',5,5'	199	2,2',3,3',4,5,5',6'
39	3,4',5	92	2,2',3,5,5'	147	2,2',3,4',5,6	200	2,2',3,3',4,5,6,6'
Tetrachlorobifenyle		93	2,2',3,5,6	148	2,2',3,4',5,6'	201	2,2',3,3',4,5,5',6
		94	2,2',3,5,6'	149	2,2',3,4',5',6	202	2,2',3,3',4,5',6,6'
40	2,2',3,3'	95	2,2',3,5',6	150	2,2',3,4',6,6'	203	2,2',3,4,4',5,5',6
41	2,2',3,4	96	2,2',3,6,6'	151	2,2',3,5,5',6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
42	2,2',3,4'	97	2,2',3',4,5	152	2,2',3,5,6,6'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
43	2,2',3,5	98	2,2',3',4,6	153	2,2',4,4',5,5'	Nonachlorobifenyle	
44	2,2',3,5'	99	2,2',4,4',5	154	2,2',4,4',5,6'		
45	2,2',3,6	100	2,2',4,4',6	155	2,2',4,4',6,6'	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
46	2,2',3,6'	101	2,2',4,5,5'	156	2,3,3',4,4',5	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
47	2,2',4,4'	102	2,2',4,5,6'	157	2,3,3',4,4',5'	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
48	2,2',4,5	103	2,2',4,5',6	158	2,3,3',4,4',6	Dekachlorobifenyle	
49	2,2',4,5'	104	2,2',4,6,6'	159	2,3,3',4,5,5'		
50	2,2',4,6	105	2,3,3',4,4'	160	2,3,3',4,5,6'	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'

* kolorem niebieskim zaznaczone są trwałe, chiralne kongenery PCB.

Synteza PCB w skali laboratoryjnej została przeprowadzona po raz pierwszy w Niemczech w 1881 roku, natomiast mieszaniny handlowe tych związków produkowane były na drodze reakcji chlorowania cząsteczki bifenyłu w obecności katalizatorów (AlCl_3 , FeCl_3). Skład mieszanin zależał od stosunku substratów i warunków panujących w reaktorze [2]. Przemysłowa produkcja PCB rozpoczęta została w 1929 r. przez firmę Swann Chemical Co [2, 70]. Trwała ona nieprzerwanie do końca lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia, kiedy to przekonano się o toksycznym działaniu PCB. Szacuje się, że w skali globalnej wyprodukowano około 1,2-1,5 miliona ton PCB, z czego prawdopodobnie 1/3 przeniknęła do środowiska [69]. W Polsce produkcja była niewielka i szacowana jest na około 1700 ton [9, 70]. Mieszaniny handlowe PCB przez wiele lat były dostępne pod różnymi nazwami np.: Aroclor – USA , Clophen - Niemcy, Delor – była Czechosłowacja czy Chlorofen - Polska. Różniły się one zawartością i składem poszczególnych kongenerów [2, 70], jednak w preparatach technicznych zidentyfikowano nie więcej niż 185 związków, co wynika z uprzywilejowania niektórych pozycji w procesie chlorowania.

1.2. Chiralne PCB i ich metabolity

1.2.1. Aktywność optyczna związków chemicznych

Warunkiem koniecznym występowania aktywności optycznej cząsteczek jest ich chiralność, czyli istnienie w formie dwóch izomerów optycznych - enancjomerów. Jednak nie wszystkie cząsteczki chiralne wykazują aktywność optyczną. Aby była ona zauważalna w dostatecznym stopniu, chiralne cząsteczki muszą posiadać silnie spolaryzowane wiązania chemiczne blisko centrum chiralności lub posiadać przy tym centrum znacząco różne podstawniki. Skręcalność optyczną wykazuje wiele związków organicznych jak i nieorganicznych. Większość związków wykazujących tę cechę ma zazwyczaj jeden lub więcej atomów, do których są przyłączone co najmniej trzy różne podstawniki nie leżące na jednej płaszczyźnie. Atomy takie nazywa się centrami chiralności. Istnieją jednak także związki chemiczne, w których tego rodzaju atomy nie występują, ale są one chiralne jako całość np. na skutek budowy spiralnej, lub gdy posiadają sztywne ugrupowania cykliczne. Z drugiej strony występowanie niesymetrycznych atomów w cząsteczce nie gwarantuje ich chiralności (np. diastereoizomery) [22].

W przypadku związków organicznych, centrami chiralności są zwykle atomy węgla, które posiadają cztery różne podstawniki. Dokładne wzajemne ustawienie tych podstawników względem siebie w przestrzeni jest nazywane konfiguracją absolutną. Konfigurację tą oznacza się literami R i S stawianymi przed systematyczną nazwą związku. Zasady ustalania tej konfiguracji są jednoznaczne, dzięki czemu można z samej nazwy związku odtworzyć dokładnie jego konfigurację przestrzenną. Tzw. konfiguracja absolutna cząsteczki może być określona bezpośrednio tylko w wyniku badań metodą rentgenografii strukturalnej lub pośrednio – poprzez przeprowadzenie jej syntezy asymetrycznej z substratów o wcześniej ustalonej konfiguracji absolutnej. Nie da się jej natomiast wywieść wprost z samych badań skręcalności światła spolaryzowanego. W wielu grupach organicznych związków chemicznych zbierany przez lata materiał porównawczy pozwala jednak z dużą precyzją przewidzieć konfigurację absolutną na podstawie kierunku skręcania światła [71].

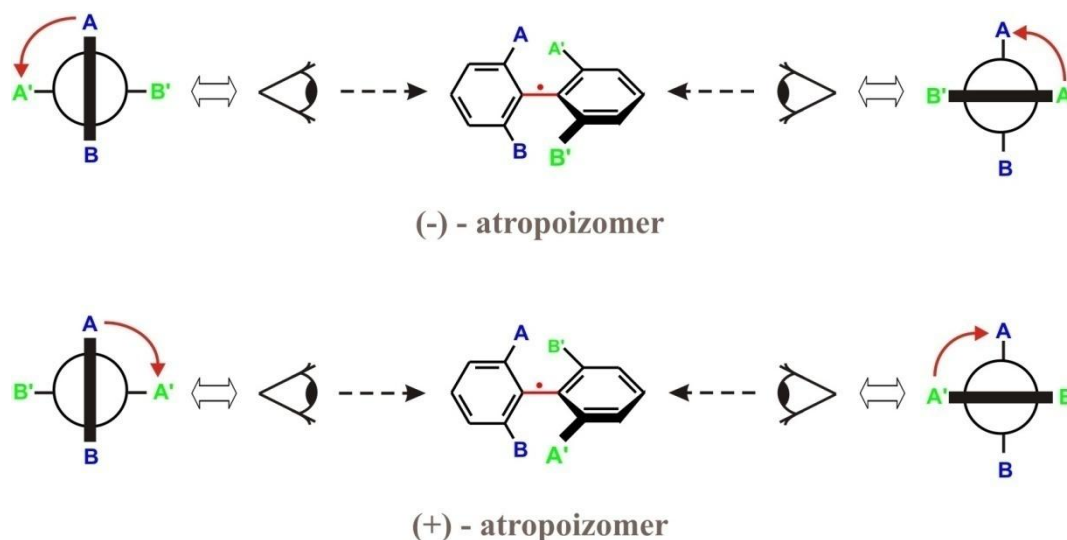
Oznaczanie typów enancjomerów (+) i (-) wynika bezpośrednio z kierunku skręcalności monochromatycznego światła spolaryzowanego o długości odpowiadającej tzw. pierwszej linii sodowej, natomiast nic nie mówi o ich konfiguracji absolutnej. Enancjomery (+) skręcają to światło w prawo, zaś (-) w lewo, natomiast pozostałe właściwości fizykochemiczne mają takie same. Enancjomery (+) i (-) skręcają płaszczyznę polaryzacji światła zawsze dokładnie o taki sam kąt, ale w przeciwną stronę, dlatego ich równomolowa mieszanina wykazuje skręcalność zerową i nazywa się mieszaniną racemiczną (racematem). Pomiar aktywności optycznej jest często stosowany do określenia czystości enancjomerycznej (czyli molowej przewagi jednego z enancjomerów). Jest to jednak możliwe dopiero wtedy, gdy znana jest wartość skręcalności optycznej czystych enancjomerów [22].

Wszystkie chiralne związki organiczne wytwarzane przez organizmy żywe istnieją tylko w postaci jednego z dwóch możliwych enancjomerów. Ponadto większość stereoisomerów różni się aktywnością biologiczną, a pomiar ich aktywności optycznej jest najprostsza metodą umożliwiającą rozróżnienie ich od sztucznie syntetyzowanych mieszanin racemicznych. Postęp w syntezie asymetrycznej umożliwia wspólnie otrzymywanie wielu czystych enancjomerów, zupełnie nieodróżnialnych od ich naturalnych pierwowzorów [71].

Do oceny ilościowej aktywności optycznej wykorzystuje się takie parametry jak skręcalność właściwa, dyspersja skręcalności właściwej oraz dichroizm kołowy [72, 73].

1.2.2. Atropoizomeria PCB i ich metabolitów

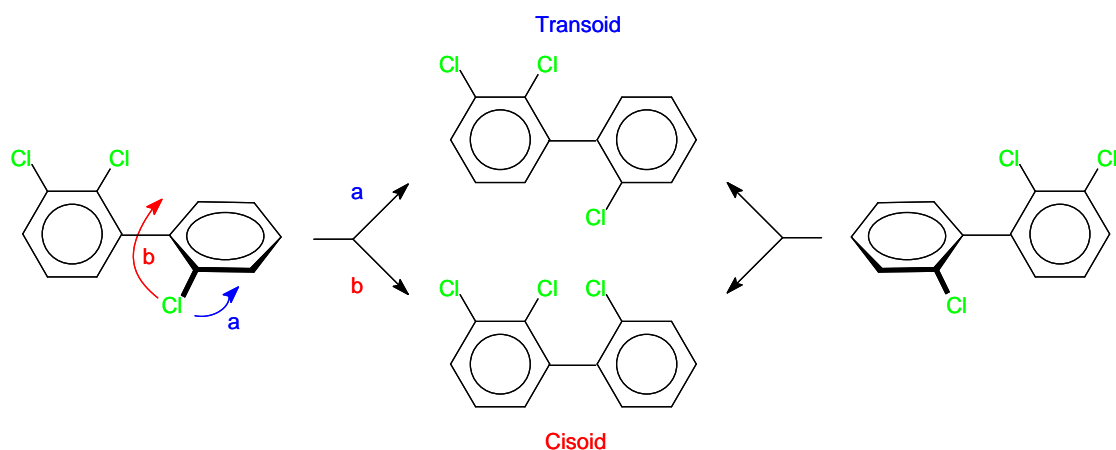
Cząsteczka może wykazywać czynność optyczną pomimo braku chiralnego atomu, np. kiedy nie posiada żadnych symetrycznych elementów w swojej budowie. W odróżnieniu od wielu substancji leczniczych, pochodne bifenyłu należą do tej grupy związków chiralnych, które nie posiadają chiralnego atomu węgla. Ograniczona rotacja wokół wiązania węgiel-węgiel (C-C) w związkach diarylowych prowadzi do szczególnej formy chiralności zwanej atropoizomerią. Atropoizomeria jest rodzajem stereoizomerii, która może powstać w układach, gdzie swobodna rotacja wokół pojedynczego wiązania kowalencyjnego (osi chiralności) jest zahamowana w stopniu, który umożliwia rozdzielanie poszczególnych stereoizomerów [71] (ryc. 2).



Rycina 2. Konformacje podstawników wokół centralnego wiązania typu σ cząsteczki biarylu [71].

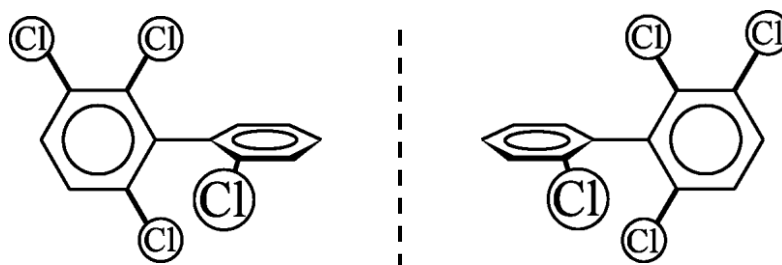
Obok planarności, atropoizomeria jest ważną cechą PCB decydującą o ich stereochemicznym wpływie na organizmy żywe. Zjawisko atropoizomerii kongenerów PCB dopiero w ostatnich latach przyciągnęło szczególną uwagę ze względu na potencjalnie różny los w środowisku oraz różną aktywność biologiczną (+)- i (-)- enancjomerów, [26, 28, 31, 74].

Warunkiem występowania chiralności w cząsteczce PCB jest obecność dwóch asymetrycznych pierścieni fenylowych (brak płaszczyzny symetrii przebiegającej prostopadle do płaszczyzny pierścienia przez wiązanie C-C w szkielecie bifenyłu), z których każdy jest podstawiony przynajmniej jednym atomem chloru w pozycji *ortho*-. W przypadku kongenerów chiralnych racemizacja zachodzi z wytworzeniem nietrwałego stanu metastabilnego (ryc. 3) [20, 75].



Rycina 3. Racemizacja cząsteczki PCB z dwoma atomami chloru podstawionymi w pozycji *ortho*- wokół centralnego wiązania C-C [75] poprzez stan metastabilny transoid (a) i cisoid (b).

PCB niepodstawione w pozycji *ortho*- oraz mono- i diortopodstawione szybko racemizują w temperaturze pokojowej z powodu energetycznie uprzywilejowanego stanu przejściowego transoid (ryc. 3a). Wraz ze wzrostem liczby atomów chloru w pozycji *ortho*- (2,6 i 2',6'; ryc. 1), wartość kąta między płaszczyznami pierścieni zbliża się do 90°, swobodna rotacja wokół centralnego wiązania węgiel-węgiel zostaje zahamowana na skutek zawady przestrzennej jaką stanowią atomy chloru (tri- i tetraortopodstawione pochodne) [20, 76]. Wystarczająco duża bariera energetyczna rotacji pierścieni fenylowych kongenerów z 3 lub 4 atomami chloru w pozycji *ortho*- powoduje, że poprzez możliwy stan przejściowy cisoid (ryc. 3b), występują one w postaci trwałych (nieracemizujących) atropoizomerów, stanowiących lustrzane odbicia (ryc. 4) [76-78]. Bariera energetyczna rotacji pierścieni fenylowych (ΔG^\ddagger) wynosi od 176,6 do 184,8 kJ/mol dla triortopodstawionych PCB oraz $\Delta G^\ddagger \approx 246$ kJ/mol dla tetraortopodstawionych. Dodatkowy atom chloru w pozycji *meta*- triortopodstawionych PCB w wyniku tzw. efektu podpory (z ang. *buttressing effect*) to dodatkowo $\sim 6,4$ kJ/mol do ΔG^\ddagger [79, 80].



Rycina 4. Izomery optyczne 2,2',3,6 – tetrachlorobifenylu (PCB 45) [81].

Spośród 209 kongenerów PCB teoretycznie 78 może występować w formie atropoizomerów. Badania zależności struktura-aktywność (SAR) dowiodły, że 19 z 78

możliwych kongenerów chiralnych występuje w postaci trwałych (nieracemizujących) atropoizomerów PCB (tabela 1, niebieska czcionka) [78]. Atropoizomery te są na tyle stabilne, że mogą być rozdzielone z zastosowaniem warunków wysokotemperaturowej, enancjoselektywnej chromatografii gazowej [81]. Dotychczas jeszcze nie ustalono absolutnych konfiguracji dla poszczególnych atropoizomerów PCB. Natomiast dla większości enancjomerów tej grupy związków określono skręcalność optyczną światła spolaryzowanego i kolejność elucji na kolumnach z wypełnieniem chiralnym [79, 82, 83].

W produkowanych do początku lat 80-tych XX wieku mieszaninach technicznych 12 kongenerów chiralnych (tj. PCB 45, 84, 91, 95, 132, 135, 136, 144, 149, 171, 174 i 183) oznaczono na poziomach większych niż 1% (w/w) (tabela 2, pogrubiona czcionka) [76, 84]. Spośród nich 5 tj. PCB 91, 95, 132, 149 i 174 to najczęściej oznaczane chiralne kongenery w matrycach środowiskowych i biologicznych. Dodatkową ich cechą jest obecność niepodstawionych atomów wodoru w pozycji *meta-para* pierścienia fenyloвого (tj. w pozycjach 3,4 i/lub 4,5 oraz 3',4' i/lub 4',5' – ryc. 1), co powoduje, że są one szybko metabolizowane *in vivo* do pochodnych hydroksylowych (OH-PCB) i metylosulfonowych (MeSO₂-PCB) (tabela 2, kursywa).

Tabela 2. Profil podstawienia atomami chloru 19 trwałych atropoizomerów PCB *.

Pozycje podstawienia	2'-	2',3'-	2',4'-	2',5'-	2',3',4'-	2',3',5'-	2',3',6'-	2',4',5'-	2',3',4',6'-
2,3,4-							132		
2,3,5-							135		
2,3,6-	45	84	91	95			136	149	
2,3,4,5-							174		196
2,3,4,6-	88	131	139	144	171	175	176	183	197

* pogrubioną czcionką zaznaczono atropoizomery występujące w mieszaninach technicznych na poziomie >1% (% wagowe) [76, 84]; kursywą zaznaczono prekursorzy dziesięciu trwałych, chiralnych *meta-* i *para*-MeSO₂-PCB, najczęściej wykrywanych w matrycach środowiskowych i biologicznych [49, 53, 85].

Wyniki obliczeń chemii kwantowej dowiodły, że spośród 837 możliwych MeSO₂-PCB, 456 jest chiralnych, w tym 180 podstawionych trzema lub czterema atomami chloru w pozycji *orto-* może istnieć w środowisku. Wynika to z faktu, że wprowadzenie grupy MeSO₂- w pozycję *meta-* lub *para-* szkieletu bifenyłu stanowi dodatkowy element asymetrii cząsteczki PCB, dlatego chiralne MeSO₂-PCB mogą powstawać z niechiralnych prekursorów PCB. W praktyce tylko około 60 kongenerów MeSO₂-PCB znaleziono w matrycach środowiskowych, w tym 10 trwałych par atropoizomerów MeSO₂-PCB (tabela 3). Wynika to z faktu, że powstają one z macierzystych kongenerów PCB (na ogół podstawionych atomem

chloru w pozycjach 2,5 lub 2,3,6 pierścieni fenylowych) na drodze szlaku przemian kwasu merkapturowego (MAP) [36, 43, 86]. Dla pięciu par atropoizomerów MeSO₂-PCB ustalono absolutną konfigurację i wyznaczono wartości kątów między płaszczyznami pierścieni metodami elektronowego i wibracyjnego dichroizmu kołowego w połączeniu z chemicznymi obliczeniami kwantowymi (tabela 3)[72, 73].

Tabela 3. Trwałe, chiralne atropoizomery MeSO₂-PCB, najczęściej wykrywane w matrycach środowiskowych i biologicznych [49, 53, 85].

Nazwa chemiczna (Skróty)	Wzór strukturalny	
3-metylosulfonylo-2,2',4',5,6-pentachloro-bifenyl (3-MeSO ₂ -PCB 91) ^a 2,3,6,2',4'-Pentachloro-5-methanesulfonyl-biphenyl ^b (5-MeSO ₂ -CB 91) ^c		
4-metylosulfonylo-2, 2',3,4',6-pentachlorobifenyl (4-MeSO ₂ -PCB 91) ^a 2,3,6,2',4'-Pentachloro-4-methanesulfonyl-biphenyl ^b (4-MeSO ₂ -CB 91) ^c		
3-metylosulfonylo-2, 2',3',5,6'-pentachlorobifenyl (3-MeSO ₂ -PCB 95) ^a 2,5,2',3',6'-Pentachloro-3-methanesulfonyl-biphenyl ^b (3'-MeSO ₂ -CB 95) ^c		
4-metylosulfonylo-2, 2',3',5,6'-pentachlorobifenyl (4-MeSO ₂ -PCB 95) ^a 2,3,6,2',5'-Pentachloro-4'-methanesulfonyl-biphenyl ^b (4'-MeSO ₂ -CB 95) ^c		
3-metylosulfonylo-2, 2',3',4',5,6-heksachlorobifenyl (3-MeSO ₂ -PCB 132) ^a 2,3,6,2',3',4'-Hexachloro-5-methanesulfonyl-biphenyl ^b (5'-MeSO ₂ -CB 132) ^c		*
4-metylosulfonylo-2, 2',3,3',4',6-heksachlorobifenyl (4-MeSO ₂ -PCB 132) ^a 2,3,6,2',3',4'-Hexachloro-4-methanesulfonyl-biphenyl ^b (4'-MeSO ₂ -CB 132) ^c		*
3-metylosulfonylo-2, 2',4',5,5',6-heksachlorobifenyl (3-MeSO ₂ -PCB 149) ^a 2,5,6,2',4',5'-Hexachloro-3-methanesulfonyl-biphenyl ^b (5-MeSO ₂ -CB 149) ^c		*
4-metylosulfonylo-2, 2',3,4',5',6-heksachlorobifenyl (4-MeSO ₂ -PCB 149) ^a 2,3,6,2',4',5'-Hexachloro-4-methanesulfonyl-biphenyl ^b (4-MeSO ₂ -CB 149) ^c		*
3-metylosulfonylo-2, 2',3',4',5,5',6-heptachlorobifenyl (3-MeSO ₂ -PCB 174) ^a 2,3,4,5,2',3',6'-Heptachloro-5'-methanesulfonyl-biphenyl ^b (5'-MeSO ₂ -CB 174) ^c		*
4-metylosulfonylo-2, 2',3,3',4',5',6-heptachlorobifenyl (4-MeSO ₂ -PCB 174) ^a 2,3,4,5,2',3',6'-Heptachloro-4'-methanesulfonyl-biphenyl ^b (4'-MeSO ₂ -CB 174) ^c		*

^a nazwa i skrót podane w oparciu o nomenklaturę zaproponowaną przez Letcher i wsp. [43];

^b nazwa chemiczna wyznaczona przez program ISIS Draw 2.4 wyposażony w funkcję AutoNom wg [55];

^c skrót podany przez Kanię-Korwel i wsp. [55] w oparciu o nomenklaturę zaproponowaną przez Maervoet i wsp. [87];

* atropoizomery MeSO₂-PCB, dla których wyznaczono konfiguracje absolutne [72, 73].

Istnieje niewiele doniesień naukowych na temat chiralnych OH-PCB. Dopiero w ostatnich latach pojawiły się prace na temat enancjoselektywnego rozdzielania chromatograficznego i losów w ustroju żywym tej grupy związków [88-91].

1.2.3. Parametry definiujące skład chiralny pary atropoizomerów PCB

Do opisu czystości optycznej dwóch enancjomerów, wyznaczanej w procesie enancjoselektywnego rozdzielania chromatograficznego na kolumnach z chiralnym wypełnieniem, wprowadzono parametry definiujące skład chiralny pary enancjomerów TZO [92, 93].

Współczynnik enancjomeryczny (ER, z ang. *Enantiomeric Ratio*) – to parametr określający stosunek powierzchni pików pierwszego enancjomeru E(1) do powierzchni pików drugiego enancjomeru E(2) w przypadku nieznanej kolejności elucji atropoizomerów:

$$ER = \frac{E(1)}{E(2)},$$

natomiast w przypadku, gdy kolejność ta jest ustalona, parametr ER przyjmuje postać:

$$ER = \frac{E(+)}{E(-)},$$

gdzie E(+) to enancjomer prawoskrętny i E(-) to enancjomer lewoskrętny.

ER dla mieszaniny racemicznej przyjmuje wartość równą jedności. Dla pozostałych ER przyjmuje wielkości od 0 do ∞ , co ogranicza przydatność tego parametru np. podczas graficznego przedstawienia danych. Stąd też Harner i wsp. [92] oraz de Geus i wsp. [94] wprowadzili pojęcie frakcji enancjomerycznej (EF, z ang. *Enantiomeric Fraction*), gdzie:

$$EF = \frac{E(1)}{E(1) + E(2)} \text{ lub } EF = \frac{E(+)}{E(+) + E(-)}.$$

Parametr EF wyraża się stosunkiem powierzchni pików pierwszego enancjomeru lub odpowiednio (+)-enancjomeru do sumy powierzchni pików obu enancjomerów na chromatogramie. EF może przyjmować wartości od 0 do 1, przy czym EF = 0,5 świadczy o równomolowej zawartości pary enancjomerów w mieszaninie (racemat).

Z kolei zależność pomiędzy parametrami EF i ER wyraża się wzorem:

$$EF = \frac{ER}{(1 + ER)}$$

Do określenia stopnia zanieczyszczenia jednego z enancjomerów drugim wprowadzono pojęcie nadmiaru enancjomerycznego (*ee*, z ang. *enantiomeric excess*) [95], który, dla przypadku gdy ilość enancjomeru $E(1) > E(2)$, wyraża się wzorem:

$$ee [\%] = \left[\frac{(E(1) - E(2))}{(E(1) + E(2))} \right] \times 100,$$

gdzie *ee* to wyrażony w procentach stosunek różnicy zawartości poszczególnych enancjomerów do sumy ich zawartości w określonej mieszaninie.

Powszechnie przyjęto, że wartość *ee* jest zawsze dodatnia i tak np. w reakcjach chemicznych, w których mogą powstawać enancjomery, *ee* może przyjąć wartość od 0% - 100% (*ee* = 0, gdy w wyniku reakcji otrzymujemy racemat; *ee* = 100% gdy powstaje jeden, czysty enancjomer).

Na selektywne rozmieszczenie związków chiralnych w organizmie żywym wpływają jedynie procesy biologiczne. Losy atropoizomerów PCB w ustroju i w środowisku można scharakteryzować przy użyciu wyżej wymienionych parametrów, z których szczególne zastosowanie znalazł parametr EF. Jest on używany jako narzędzie do monitorowania czasowych trendów zanieczyszczenia środowiska oraz biotransformacji atropoizomerów na poszczególnych stopniach drabiny troficznej [27, 31-33, 53, 96-112].

1.3. Właściwości fizykochemiczne i zastosowanie PCB

Pojedyncze, czyste chemicznie kongenery PCB są bezbarwne lub białe i na ogół krystaliczne. Z kolei konsystencja mieszanin handlowych uwarunkowana jest ilością chloru użytego w procesie syntezy. Mieszaniny handlowe różnią się między sobą ciężarem właściwym, temperaturą wrzenia, gęstością, rozpuszczalnością w wodzie oraz prężnością par. Preparaty techniczne są przeważnie bezbarwne lub jasno żółte, o konsystencji lepkiej cieczy (przy zawartości chloru w preparacie <60%), gęstego oleju (zawartość chloru 60-65%), lub krystalicznej, twardej żywicy (przy zawartość >65% chloru) [2].

Do głównych właściwości fizykochemicznych PCB (tabela 4) należą:

- charakter lipofilny - słaba rozpuszczalność w wodzie, dobra w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, olejach i tłuszczach; wraz ze wzrostem liczby atomów chloru w cząsteczce wzrost wartości współczynnika podziału olej-woda (K_{ow}),
- niska prężność par i wysoka temperatura zapłonu (170-380°C) - substancje niepalne, bez właściwości wybuchowych,
- niskie przewodnictwo elektryczne (dzięki właściwościom dielektrycznym stosowane były jako izolatory elektryczne),
- wysokie przewodnictwo cieplne,
- znaczna odporność na rozkład pod wpływem czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych [2, 4, 69].

Tabela 4. Fizyczne właściwości grup homologicznych PCB ^a [69].

Grupa homologiczna	Masa cząsteczkowa ^b [u]	Zawartość chloru [%]	Liczba izomerów	Prężność par [Pa] (25°C)	Rozpuszczalność w wodzie [g/m ³] (25°C)	log K_{ow}	Lepkość [mPa·s] (25°C)
Monochlorobifenyle	188,7	19	3	1,1	4,0	4,7	17
Dichlorobifenyle	223,1	32	12	0,25	1,6	5,1	20
Trichlorobifenyle	257,6	41	24	0,054	0,65	5,5	28
Tetrachlorobifenyle	292,0	49	42	0,012	0,26	5,9	56
Pentachlorobifenyle	326,4	54	46	0,0026	0,099	6,3	200
Heksachlorobifenyle	360,9	59	42	0,00058	0,038	6,7	1500
heptachlorobifenyle	395,3	63	24	0,00013	0,014	7,1	2900
Oktachlorobifenyle	429,8	66	12	0,000028	0,0055	7,5	>100000
Nonachlorobifenyle	464,2	69	3	0,0000063	0,0020	7,9	>100000
Dekachlorobifenyle	498,7	71	1	0,0000014	0,00076	8,3	>100000

^a wartości średnie obliczone dla przedstawicieli danej grupy homologicznej;

^b wyznaczona na podstawie liczb masowych izotopów węgla, chloru i wodoru występujących naturalnie.

Korzystne właściwości fizykochemiczne PCB spowodowały, że były one szeroko wykorzystywane w przemyśle, m.in. w systemach zamkniętych (płyny dielektryczne i materiały izolacyjne w transformatorach i kondensatorach), niecałkowicie zamkniętych (płyny hydrauliczne i płynne wymienniki ciepła w układach chłodzących i hydraulicznych) i otwartych (plastyfikatory, składniki farb, atramentu, klejów, smarów i in.) [2].

1.3.1. Właściwości fizykochemiczne metylosulfonowych i hydroksylowych pochodnych PCB

Metylosulfonowe pochodne PCB są krystalicznymi, nietłymi substancjami o temperaturach wrzenia przekraczających 130°C. Grupa metylosulfonowa zwiększa polarność cząsteczki i spełnia rolę donora wolnej pary elektronowej (MeSO₂-PCB są zasadami Lewisa) [36, 43, 86]. Podobnie jak PCB, MeSO₂-PCB wykazują właściwości hydrofobowe a wartości ich współczynników podziału olej-woda nieznacznie różnią się od macierzystych kongenerów. Ze względu na wartości log K_{ow} (od ok. 4 do 6,5) tri- do heksa-chloropodstawionych MeSO₂-PCB, ulegają one również biokumulacji i biomagnifikacji w tkankach o wysokiej zawartości tłuszczu.

Pochodne hydroksylowe są związkami nietłymi i wykazują słaby charakter kwasowy. Wartości ich pK_a wahają się od ok. 6 do ponad 10, w zależności od stopnia i miejsca podstawienia atomami chloru i grupą/grupami hydroksylowymi [43, 113].

1.4. Losy PCB w środowisku

Polichlorowane bifenyle nie występują naturalnie w środowisku. Zostały do niego wprowadzone w wyniku działalności człowieka. PCB przenikają do środowiska w wyniku parowania, wycieków, podczas spopielania, usuwania ścieków przemysłowych oraz składowania odpadów. Wieloletnia, niekontrolowana emisja PCB (pożary i wycieki transformatorów, wysypiska i spalarnie odpadów itd.) doprowadziła do rozprzestrzenienia się tych ksenobiotyków praktycznie we wszystkich ekosystemach. Jest rzeczą oczywistą, że tylko część ogólnej masy wyprodukowanych PCB dostała się do środowiska naturalnego (około 400 tys. ton). Znaczna ilość pozostaje wciąż uwięziona w różnych urządzeniach, bądź jest składowana jako odpad (130 tys. ton w samych Stanach Zjednoczonych), wciąż stanowiąc zagrożenie dla środowiska naturalnego [2].

PCB rozprzestrzeniają się głównie drogą swobodnego lub wymuszonego odparowywania do atmosfery [114, 115]. Pary PCB po przejściu do atmosfery są adsorbowane na cząstkach pyłu zawieszonego. W okresie od listopada 2006 do listopada 2007 średnie stężenie tych związków w powietrzu nad Chicago w USA (obliczone na sumę 169 pików na chromatogramach GC-MS/MS 184 próbek), wynosiło 840 pg/m³ i wahało się w zakresie 75-5500 pg/m³. Siedemdziesiąt PCB, oznaczonych na poziomie 3,7-2000 pg/m³, to kongenery o działaniu neurotoksycznym [116], a część z nich to związki chiralne. Frakcje

enantjomeryczne ($EF \approx 0,5$) atropoizomerów PCB 91, 95, 136 i 149, oznaczone w próbkach powietrza Birmingham i Nowego Jorku, wskazują na równomolowe zawartości par tych enancjomerów (mieszanki racemiczne) w atmosferze [27, 29]. Kongenery o mniejszej liczbie atomów chloru są bardziej lotne i mogą być transportowane z powietrzem nawet do nie zaludnionych obszarów takich jak Arktyka czy Antarktyda [117, 118]. Tak więc mierzalne ilości PCB są stwierdzane nie tylko nad terenami silnie uprzemysłowionymi, ale także nad oceanami, czy biegunami.

PCBs występujące w glebie pochodzą głównie z opadu aerozoli stałych obecnych w powietrzu, przy czym opad ten jest wyraźnie większy na obszarach wielkomiejskich niż na wiejskich. Małe ilości tych związków pochodzą ze ścieków oraz z wymywania zakopanych w ziemi nieczystości i odpadów przemysłowych. Przemiany PCB w glebach, w tym ich enancjoselektywna biodegradacja, następuje najczęściej na drodze biologicznej, głównie przy udziale mikroorganizmów aerobowych [119] jak i anaerobowych [103]. Wyniki badań środowiskowych wykazały nieracemiczny skład par atropoizomerów PCB 84, 95, 136, 149 przy stężeniach indywidualnych kongenerów rzędu 13 pg/g – 175 ng/g gleby [36].

PCB przedostają się do wody głównie w miejscach odprowadzania ścieków przemysłowych i komunalnych do rzek, jezior i wód przybrzeżnych. Oczyszczanie ścieków usuwa jedynie PCB zaadsorbowane na cząstkach stałych zawieszonych w wodzie. Frakcja rozpuszczona nie jest usuwana i przechodzi do różnych zbiorników wodnych. Odprowadzane ścieki i nieczystości są również źródłem zanieczyszczenia wód morskich. Ostatnie badania w USA wykazały, że sumaryczne stężenie PCB identyfikowanych w wodzie pitnej sięga nawet 186,6 ng/L [120]. Polichlorowane bifenylole mają tendencję do sorbowania się we frakcji organicznej osadów dennych wielu rzek, jezior i mórz, które są ich istotnym rezerwuarem [2, 121, 122]. Stężenia PCB, oznaczone w osadach, są proporcjonalne do zawartości całkowitego węgla organicznego (TOC). Wartości EF chiralnych PCB, oznaczone w próbkach osadów dennych pobranych w różnych regionach globu, o mniejszym i większym stopniu zanieczyszczenia PCB, wskazują również na nieracemiczny skład mieszanin poszczególnych par atropoizomerów [29, 123-126].

Trwałość związków chloroorganicznych, w tym polichlorowanych bifenyli, w środowisku naturalnym jest ściśle związana z ich budową i właściwościami fizykochemicznymi. Takie czynniki jak m.in.: wysoki udział wiązań C-C, C-H oraz C-Cl, bardzo

słaba rozpuszczalność w wodzie, niska prężność par oraz powinowactwo do tłuszczów czy niska reaktywność chemiczna, decydują o wysokiej odporności PCB na działanie czynników biotycznych i abiotycznych w środowisku. PCB w środowisku ulegają bardzo powolnym przemianom, których tempo jest m.in. funkcją liczby atomów chloru w szkielecie bifenylowym (więcej atomów chloru - wolniejsza degradacja) oraz rozmieszczenia podstawników (np. atomy chloru w położeniu *orto*- jednego lub obu pierścieni bifenylu radykalnie zmniejszają podatność związku na zmiany) [2, 69]. Chociaż PCB ulegają wydajnemu rozkładowi na drodze fotolizy *in vitro*, to jednak wykazują znaczną trwałość w środowisku. Kongenery zawierające do 4 atomów chloru z łatwością są rozkładane przez mikroorganizmy. Proces ten jednak jest hamowany w przypadku kongenerów zawierających większą liczbę atomów chloru [69].

Naturalną konsekwencją powinowactwa do tłuszczów i trwałości PCB jest ich biokumulacja i biomagnifikacja. Zjawisko to jest rozumiane powszechnie jako retencja (zatrzymanie) związku w organizmie na skutek aktywnego pobrania substancji z otaczającego środowiska (np.: wody, żywności, powietrza) połączona z biologicznym zwielokrotnieniem stężeń w łańcuchach pokarmowych. W praktyce biokumulacja oznacza, że organizmy stanowiące kolejne ogniwa łańcucha pokarmowego gromadzą w swoich tkankach wzrastające ilości związków chloroorganicznych. Zwierzęta zmiennocieplne kumulują PCB głównie ze środowiska, w którym żyją, stałocieplne natomiast pozyskują je dodatkowo z pożywienia. Przechodząc przez ogniwa łańcucha troficznego, PCB o większej liczbie atomów chloru w cząsteczce, ulegają biokumulacji i biomagnifikacji [3, 13, 39, 41, 127-130]. Szczególnie duże stężenia tych związków oznaczane są do dnia dzisiejszego w wysokotłuszczowych tkankach fauny morskiej [128, 129, 131-140].

Chiralne polichlorowane bifenyle dostały się do środowiska w postaci racematów, a wyniki oznaczeń nieracemicznych pozostałości w organizmach wodnych wskazują na biotransformację PCB w łańcuchu pokarmowym począwszy od fitoplanktonu i bezkręgowców, poprzez ryby i ptaki, na ssakach wodnych takich jak walenie i foki oraz niedźwiedziach polarnych kończąc [36]. Również chiralne MeSO₂-PCB oznaczano w ekstraktach: z podskórnych warstw tłuszczu foki szarej [53], z tkanek mięśniowych pelikanów [50], niedźwiedzi polarnych [43] oraz z wątrób morświnów [100].

Ze względu na swoje właściwości PCB są traktowane jako modelowy wskaźnik zanieczyszczenia środowiska średnio lotnymi związkami organicznymi w skali globalnej [1-3]. Różnicowanie jakościowe i ilościowe oznaczonych kongenerów w poszczególnych składnikach środowiska jest wynikiem różnej budowy chemicznej, właściwości fizykochemicznych, szybkości wchłaniania, metabolizmu, wydalania i rozpadu poszczególnych kongenerów, a także pochodną lokalnego skażenia środowiska, długości życia oraz indywidualnego sposobu odżywiania [3]. Dodatkowo chiralne PCB traktowane są jako wskaźniki przemian biochemicznych w środowisku, a enancjoselektywne oznaczanie atropoizomerów sprzyja identyfikacji i różnicowaniu źródeł narażenia/zanieczyszczenia tymi ksenobiotykami [29, 36].

1.5. Toksykokinetyka PCB

Badaniem kinetyki wchłaniania, rozmieszczenia, biotransformacji i wydalania ksenobiotyków (w tym PCB) oraz towarzyszących im skutkom toksycznym zajmuje się toksykokinetyka [141].

Decydujące znaczenie dla działania ksenobiotyku, oprócz ekspozycji na określoną dawkę, ma jego stężenie w miejscu docelowym. Przedostając się do miejsca działania, substancja obca musi przeniknąć w ustroju przez błony biologiczne. Podczas wchłaniania ksenobiotyk przechodzi przez bariery odgryzające środowisko wewnętrzne od środowiska zewnętrznego, tj.: wielowarstwowy naskórek, jednowarstwowy nabłonek oddechowy lub jednowarstwowy nabłonek jelitowy. Następnie przenika przez błony naczyń włosowatych, błony komórkowe narządów oraz błony organelli komórkowych [141, 142]. Istotną rolę w transporcie substancji obcych w organizmie odgrywa układ krwionośny, za pomocą którego są one przenoszone z miejsca wchłaniania, rozprowadzone do poszczególnych tkanek i narządów, a w końcu usunięte z ustroju w procesie wydalania. Stężenie ksenobiotyków w poszczególnych tkankach w dużym stopniu zależy od przepływu krwi. Zaledwie niewielki ułamek dawki dociera do miejsca działania i wywołuje skutki biologiczne, łącząc się swoiście z receptorami, umiejscowionymi najczęściej na powierzchni komórek lub w ich wnętrzu. Dostępność substancji dla receptora zależy od równowagi dynamicznej, jaka istnieje między przeciwstawnymi procesami. Z jednej strony na zwiększenie stężenia substancji wpływają procesy inwazyjne - absorpcja i dystrybucja, a z drugiej zmniejsza je eliminacja, obejmująca

wydalanie i biotransformację. Ten ostatni proces prowadzi jednak często do powstania metabolitu bardziej toksycznego od substancji macierzystej [142].

O losach ksenobiotyków w ustroju decydują:

- procesy biernego i/lub aktywnego transportu (wchłanianie, dystrybucja, wydalanie), w wyniku których substancje przechodzą przez błony biologiczne,
- procesy biotransformacji, w których na drodze przemian enzymatycznych lub nieenzymatycznych ksenobiotyki ulegają przekształceniu do jednego lub kilku metabolitów.

Czynnikami wpływającymi na toksykokinetykę PCB są: stopień i miejsce podstawienia atomem chloru, lipofilność cząsteczki, jej powinowactwo do monoksygenaz i szybkość (stopień) metabolizmu, a także dieta, stan ogólny organizmu, wiek, płeć i status reprodukcyjny [135, 136, 138, 140, 143-145]. Jednak głównym czynnikiem limitującym eliminację PCB z ustroju jest metabolizm [43].

1.5.1. Wchłanianie

W warunkach narażenia środowiskowego na PCB poniżej 5% dawki zostaje wchłonięte do organizmu przez drogi oddechowe i przez skórę. Pozostałe 95% dawki jest wchłaniane z przewodu pokarmowego [4]. Badania na zwierzętach wykazały, że zarówno pojedyncze kongenery jak i ich mieszaniny są łatwo wchłaniane z przewodu pokarmowego [39]. Absorpcja jelitowa poszczególnych PCB u szczurów waha się od 66% do 96% [146]. Wyniki badań Bergmana i wsp. wykazały, że dostępność biologiczna poszczególnych PCB zmniejsza się wraz ze wzrostem podstawienia cząsteczki atomami chloru [147]. Stwierdzono również, że rodzaj i ilość tłuszczu w diecie ma istotny wpływ na absorpcję jelitową wysoko lipofilnych ksenobiotyków [130]. Zwiększenie zawartości tłuszczu w przewodzie pokarmowym może zmniejszyć biodostępność PCB oraz zwiększyć ich ekskrecję do światła jelita i tym samym zwiększyć wydalanie PCB z kałem [148]. Zaobserwowano różnicę w poziomach PCB 136 oraz wartościach EF jego atropoizomerów w kale myszy w zależności od rodzaju stosowanej paszy (nisko- i wysokotłuszczowej). Wartości EF atropoizomerów w próbkach kału wzrastały wraz z upływem czasu od podania mieszaniny racemicznej (+)- i (-)- PCB 136. Wyniki badań Kani-Korwel i wsp. [148] wskazują, że niewchłonięte atropoizomery PCB 136 zostają wydalone w formie racematu w ciągu pierwszych 24 h od podania myszom

karmionym paszą wysokotłuszczową. Natomiast frakcja wchłonięta ulega enancjoselektywnym procesom biologicznym, a następnie jest wydalana z kałem ($EF > 0,5$ po 48 i 72h, niezależnie od ilości tłuszczu w paszy).

Szybkie wchłanianie i dystrybucja PCB zachodzi również po podaniu ich mieszaniny w postaci aerozolu drogą inhalacyjną. Stopień retencji zależy od współczynnika podziału krew-powietrze i jest porównywalny z tym po podaniu PCB drogą doustną [4]. Narażenie na PCB atmosferyczne wzrasta na terenach zurbanizowanych, gdzie PCB rozprzestrzeniają się głównie drogą swobodnego lub wymuszonego odparowywania do atmosfery [114, 149].

W odróżnieniu od narażenia środowiskowego główną drogą wchłaniania PCB w warunkach narażenia zawodowego jest układ oddechowy. Około 80% PCB oznaczonych w tkance tłuszczowej pracowników zatrudnionych przy produkcji kondensatorów pochodziło z wchłaniania przez drogi oddechowe, a pozostałe 20% z wchłaniania przez skórę [3, 4, 69]. Przeskórna droga wchłaniania PCB odgrywa istotną rolę w kumulacji tych związków w tkance tłuszczowej [150]. W badaniach na świnkach morskich wykazano, że wchłanianie PCB przez skórę po 16 dniach ekspozycji wynosi od 33% (PCB 54) do 56% (PCB 42) podanej dawki, podczas gdy u małp po 28 dniach narażenia jest $\geq 20\%$ [151]. Jackson i wsp. wykazali, że u szczurów ponad 60% dawki 3,3',4,4'-tetrachlorobifenylu zostało wchłonięte po 3 dniach narażenia [152].

Z kolei wyniki badań na myszach (C57Bl/6) wykazały znacząco wyższe ($p < 0,05$) stężenia PCB 136 we krwi i tkankach, po podaniu dootrzewnowym niż po podaniu *per os* mieszaniny racemicznej tych atropoizomerów. Zaobserwowano enancjoselektywne wzbogacenie większości tkanek i organów w (+)-PCB 136 niezależnie od drogi podania, jednakże statystycznie istotnie wyższe wartości EF ($p < 0,05$) odnotowano po podaniu *per os*. W badaniach tych wykazano także, że stężenie PCB 136 oraz wartości EF nie zależą od płci zwierząt [31]. Po podaniu dootrzewnowym racematu PCB szczurom, tylko w niewielkim stopniu następuje enancjoselektywne rozmieszczenie poszczególnych atropoizomerów w tkankach i organach tych gryzoni [26, 91].

Oceniając wpływ wielkości dawki na depozycję tkankową atropoizomerów PCB 136 po podaniu *per os* Kania-Korwel i wsp. [111] stwierdzili, że stężenie tego kongeneru w wątrobie myszy wzrasta liniowo wraz ze wzrostem dawki (mg/kg masy ciała), podczas gdy

depozycja (+)-PCB 136 maleje. Ten sam trend zaobserwowano również w innych tkankach, krwi oraz kale myszy. Wskazuje to na wysycenie procesu odpowiedzialnego za enancjoselektywną depozycję atropoizomerów PCB 136.

1.5.2. Dystrybucja

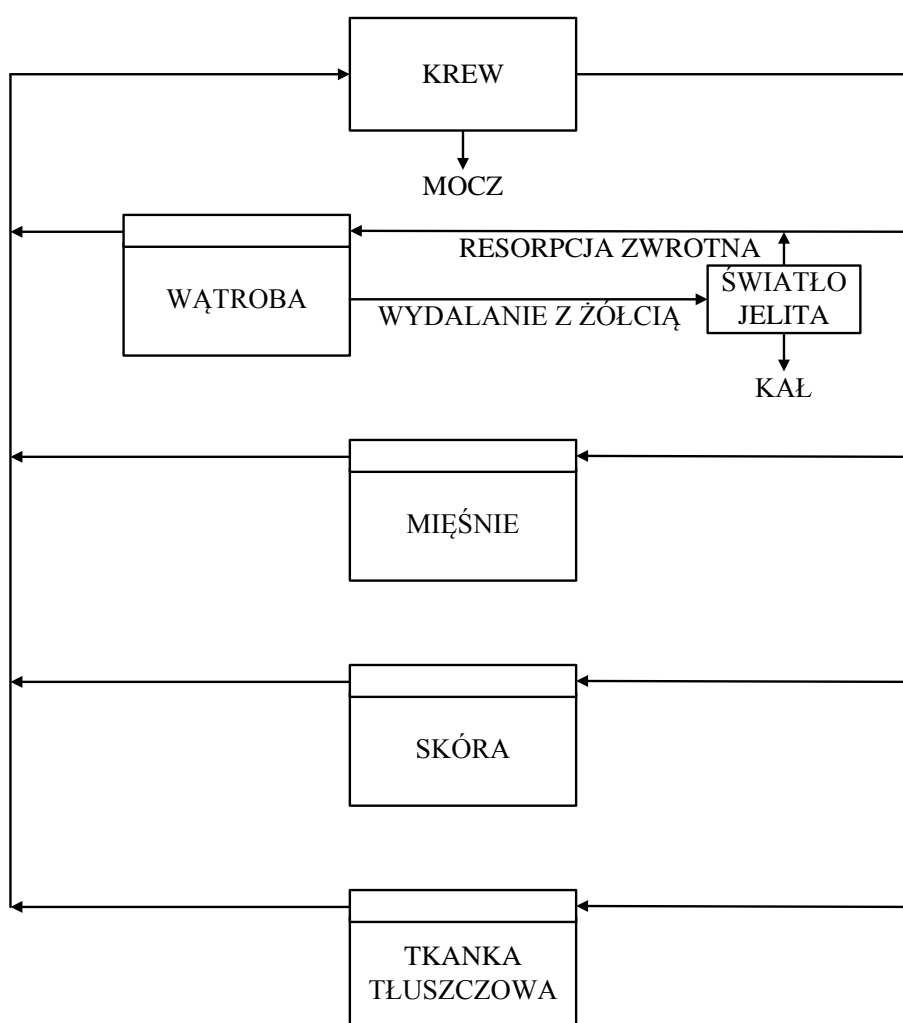
Rozmieszczenie PCB w organizmach żywych zależy zarówno od struktury, charakterystyki fizykochemicznej poszczególnych kongenerów jak i od wielkości podanej dawki. Po wchłonięciu, PCB są wychwytywane przez chylomikrony i za pośrednictwem limfy przedostają się do naczyń krwionośnych, a następnie wiążą się niespecyficznie z krwinkami i białkami osocza - zostają wbudowane do frakcji lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL), małej gęstości (LDL) oraz dużej gęstości (HDL) i w ten sposób są dystrybuowane po całym organizmie [143, 153-155].

Dystrybucja PCB, w swej początkowej fazie, jest warunkowana przez czynniki biofizyczne, takie jak: objętość tkanek i organów oraz stopień ich perfuzji, współczynnik podziału krew:tkanka, zdolność do wiązania z białkami i dlatego zachodzi podobnie u wszystkich gatunków ssaków (ryc. 5) [156]. Pierwotna depozycja PCB w wątrobie i mięśniach szkieletowych, jest efektem wysokiej perfuzji krwi przez wątrobę i jej powinowactwu do tych ksenobiotyków oraz dużej objętości mięśni w stosunku do masy ciała [156, 157].

Równolegle zaczyna się wolniejszy proces redystrybucji, w wyniku którego polichlorowane bifenyle (szczególnie wyżej chlorowane), ze względu na wysokie powinowactwo do tkanek i organów o wysokiej zawartości tłuszczu, rozprowadzane są do tkanki tłuszczowej i skóry. W wyniku procesu dystrybucji PCB, dla każdego kongeneru ustala się stan równowagi dynamicznej w poszczególnych tkankach i organach [156]. Zmiany w poziomach PCB w którymkolwiek organie lub tkance wpływają na zmiany poziomów tych ksenobiotyków we wszystkich tkankach i organach, proporcjonalnie do współczynnika podziału tkanka(organ):krew [158]. Na podstawie wyników oznaczeń dwudziestu czterech PCB w tkance tłuszczowej i krwi opracowano model regresyjny do obliczenia współczynników podziału tkanka(organ):krew dla wszystkich 209 PCB dla wątroby, skóry, mięśni i tkanki tłuszczowej. Wartości tych współczynników maleją wraz ze wzrostem stopnia niepodstawienia cząsteczki bifenylu atomami chloru w pozycjach *meta*- i *para*-. PCB z parami niepodstawionych atomów węgla w tych pozycjach są szybciej eliminowane z organizmu

[158-161], w odróżnieniu od kongenerów podstawionych, które wolniej ulegają biotransformacji [41, 127, 160, 162, 163].

Ze względu na różną zdolność magazynowania tłuszczów przez poszczególne organy, dystrybucja PCB zmienia się. Biokumulują się one przede wszystkim w tkance tłuszczowej i wątrobie, gdzie dominują kongenery 99, 118, 153, 138, 180 [51, 153, 164]. Jednak stężenia PCB w mózgu zwierząt i ludzi są niższe od spodziewanych, opartych na zawartości lipidów w mózgowiu [101, 114, 165]. Z kolei w mleku kobiecym stwierdza się obecność głównie PCB 28, 129, 118, 138, 153, 170 i 180 [7, 8, 153, 166], natomiast w tkance tłuszczowej dzieci przeważają PCB 153, 180, 138, 183, 156 i 107 [11, 167, 168].



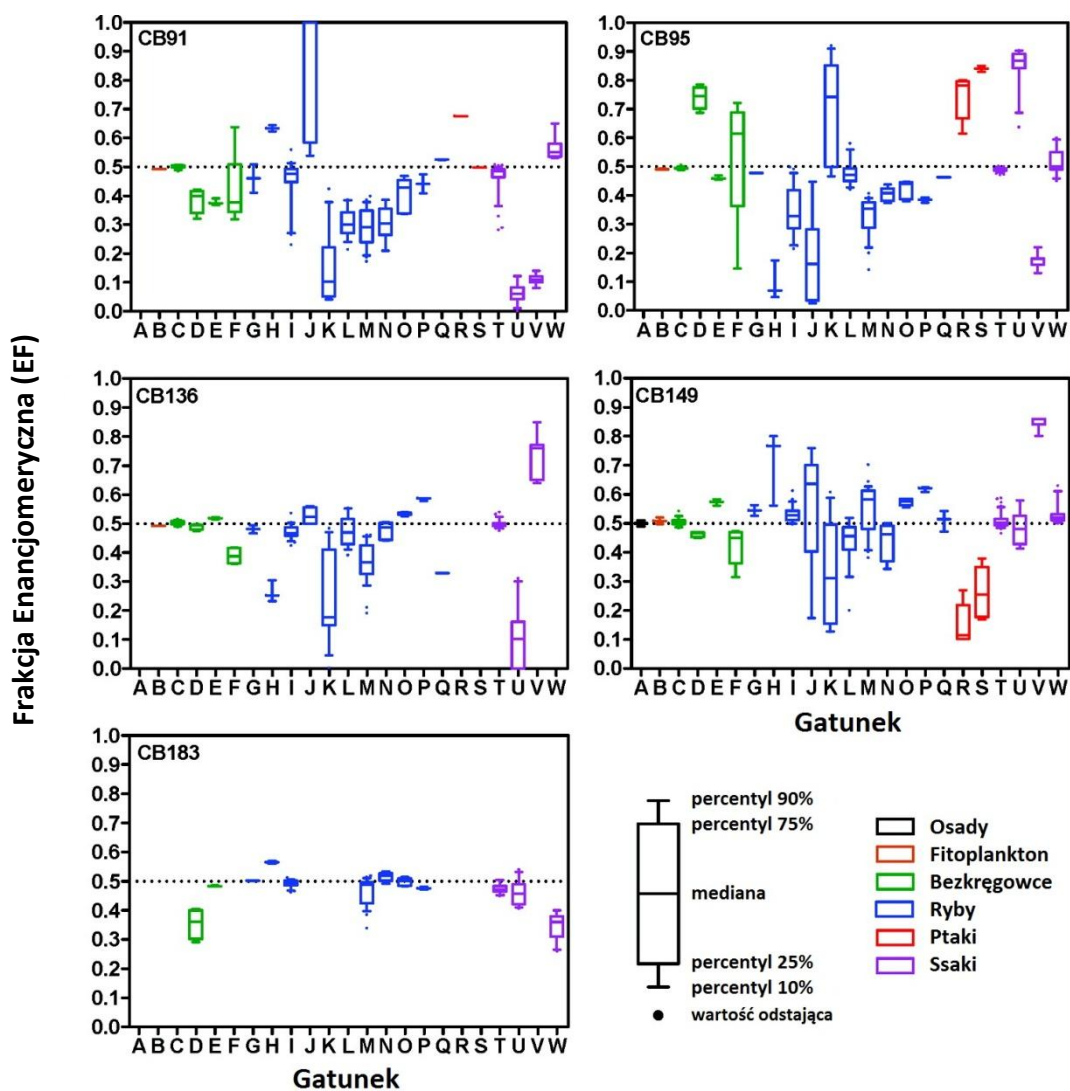
Rycina 5. Model dystrybucji polichlorowanych bifenyli w organizmach ssaków oparty na podstawach fizjologicznych [156].

Powszechnie uważa się, że wchłanianie i transport cząsteczek PCB jak i innych ksenobiotyków w organizmach żywych zachodzi zgodnie z mechanizmem dyfuzji biernej. W celu wyjaśnienia tego procesu opracowano doświadczenia oparte na analizie modeli

mechanistycznych, takich jak np. fluktuacyjny model wypłukiwania tłuszczu (*fat-flush diffusion model*) [38, 39]. Jeżeli założenia tych eksperymentów są poprawne, to nie powinny zachodzić procesy selektywnej absorpcji, dystrybucji i wydalania poszczególnych kongenerów PCB. Jednak wyniki niektórych badań na zwierzętach sugerują, że wchłanianie i depozycja PCB w kompartmentach organizmu zachodzi inaczej pomiędzy różnymi kongenerami [40, 41]. Niestety do tej pory nie przeprowadzono pełnych badań nad aktywnym transportem tej grupy związków w warunkach *in vivo*. Z nielicznych publikacji wynika, że PCB 169 (kongener planarny) nie kumuluje się w mózgu szczurów laboratoryjnych [20], z kolei w śledziona tych zwierząt deponują się wyżej ortopodstawione kongenery PCB [40]. Stwierdzono również, że poszczególne atropoizomery PCB 95, 132 i 149 różnią się od siebie parametrami toksykokinetycznymi ($t_{0,5}$, klirens) [42]. Wyniki w/w badań sugerują, że poszczególne PCB mogą ulegać procesom aktywnego transportu *in vivo*.

Z danych przedstawionych przez Lehmler'a i wsp. [36] wynika, że na wyższych szczeblach drabiny troficznej widoczna jest enancjoselektywna akumulacja PCB (ryc. 6).

Mimo, że PCB są rutynowo oznaczane we krwi ludzkiej, to jednak do tej pory w tej matrycy nie oznaczono frakcji enancjomerycznej poszczególnych par atropoizomerów. Istnieją natomiast doniesienia o enancjoselektywnej analizie PCB 95, 132 i 149 w niewielkiej liczbie ludzkich tkanek [101]. W próbkach mięśni, mózgow i nerek mieszkańców Belgii znaleziono niemal równomolową mieszaninę par poszczególnych atropoizomerów PCB 95, 132 i 149, jednak w próbkach wątrób wykazano stereoselektywne rozmieszczenie tych związków chiralnych. Wartości EF wyznaczono również dla chiralnych PCB w próbkach mleka kobiecego mieszkank Niemiec, Hiszpanii i Szwajcarii [36]. Przeprowadzone badania wykazały stereoselektywną akumulację (+)-PCB 132 z wartościami EF w granicach 0,53 - 0,82 oraz obecność niemal racemicznej mieszaniny atropoizomerów PCB 149 (EF = 0,49 - 0,60). Stwierdzono również równomolową obecność par atropoizomerów PCB 95 w próbkach mleka kobiet niemieckich i hiszpańskich (EF = 0,45 - 0,60), natomiast w próbkach ze Szwajcarii zaobserwowano stereoselektywną akumulację jednego z nich (EF = 0,64 - 0,76). Z kolei oznaczenia frakcji enancjomerycznej PCB 95 i 149 w kale ludzkim wykazały obecność niemal racemicznych mieszanin tych atropoizomerów [27].



Rycina 6. Wykresy ramka-wąsy wartości EF wybranych chiralnych kongenerów PCB oznaczonych w próbkach środowiskowych (zaadaptowano z [36]).

Na każdym wykresie linią przerywaną zaznaczono wartość EF = 0,5 (dla mieszaniny racemicznej). Literami oznaczono poszczególne gatunki i miejsce pobrania próbki do oznaczeń:

- A osad (Northwater Polynya);
- B fitoplankton (Lake Superior);
- C zooplankton (Bering-Chukchi-Beaufort Sea);
- D małż (*Corbicula* sp., U.S. rivers);
- E lasonóg (*Mysis relicta*, Lake Superior);
- F rak (*Procambarus* sp., Lake Hartwell, SC);
- G karp (*Cyprinus carpio*, U.S. rivers);
- H głowacz (*Cottus* sp., U.S. rivers);
- I czukuczian biały (*Catostomus commersoni*, U.S. rivers);
- J wąż wodny (*Nerodea sipedon*, Lake Hartwell);
- K okoń błękitnoskrzeli (*Lepomis macrochirus*, Lake Hartwell);
- L bass wielogębowy (*Micropterus salmoides*, Lake Hartwell);
- M palia jeziorowa (*Salvelinus namaycush*, Lake Superior);
- N śledź jeziorny (*Coregonus artedii*, Lake Superior);
- O stynka amerykańska (*Osmerus mordax*, Lake Superior);
- P obunóg (*Diporeia hoyi*, Lake Superior);
- Q dorsz polarny (*Boreogadus saida*, Northwater Polynya);
- R nurzyk polarny (*Uria lomvia*, Northwater Polynya);
- S mewa modrozioba (*Pagophila eburnea*, Northwater Polynya);
- T tłuszcz podskórny wieloryba grenlandzkiego (*Balaena mysticetus*, Bering-Chukchi-Beaufort Sea);
- U foka obrączkowana (*Phoca hispida*, Northwater Polynya);
- V wątroba myszy szczepu FVB;
- W mleko kobiece.

1.5.2.1. Transportery błonowe - nadrodzina białek ABC

Na każdym etapie dystrybucji ksenobiotyku (w tym również leku czy PCB) w organizmie może dojść do modyfikacji jego kinetyki. Jednymi z przyczyn mogą być interakcje pomiędzy: samymi ksenobiotykami, ich odmianami optycznymi oraz interakcje ksenobiotyków z pokarmem [141].

W badaniach farmakokinetycznych duże znaczenie przywiązuje się do identyfikowania mechanizmów oporności na stosowany lek na poziomie komórkowym i błonowym. Zjawisko oporności nie dotyczy tylko komórki w znaczeniu kompartmentu docelowego. Oporność na stosowany lek może manifestować się już w fazie wchłaniania i transportu przy pierwszych napotkanych przez cząsteczkę błonach biologicznych. W skali całego organizmu oporność na leki może być wywołana ekspresją białek odpowiedzialnych za aktywne usuwanie cząsteczek leku z błon komórkowych lub z wnętrza komórek. Białka te odpowiadają za wypompowywanie cząsteczek wielu leków o zróżnicowanej budowie i właściwościach fizykochemicznych. Powoduje to znaczne problemy w trakcie farmakoterapii lekami podatnymi na działanie tych białek (choć jest to aktywność pożądana w przypadku np. trucizn czy innych ksenobiotyków). Problemy te dotyczą zarówno tkanek zdrowych jak i patologicznie zmienionych. Z punktu widzenia dystrybucji leku w organizmie kinetyka leku może w takim wypadku zostać zmieniona na wielu etapach [141, 142].

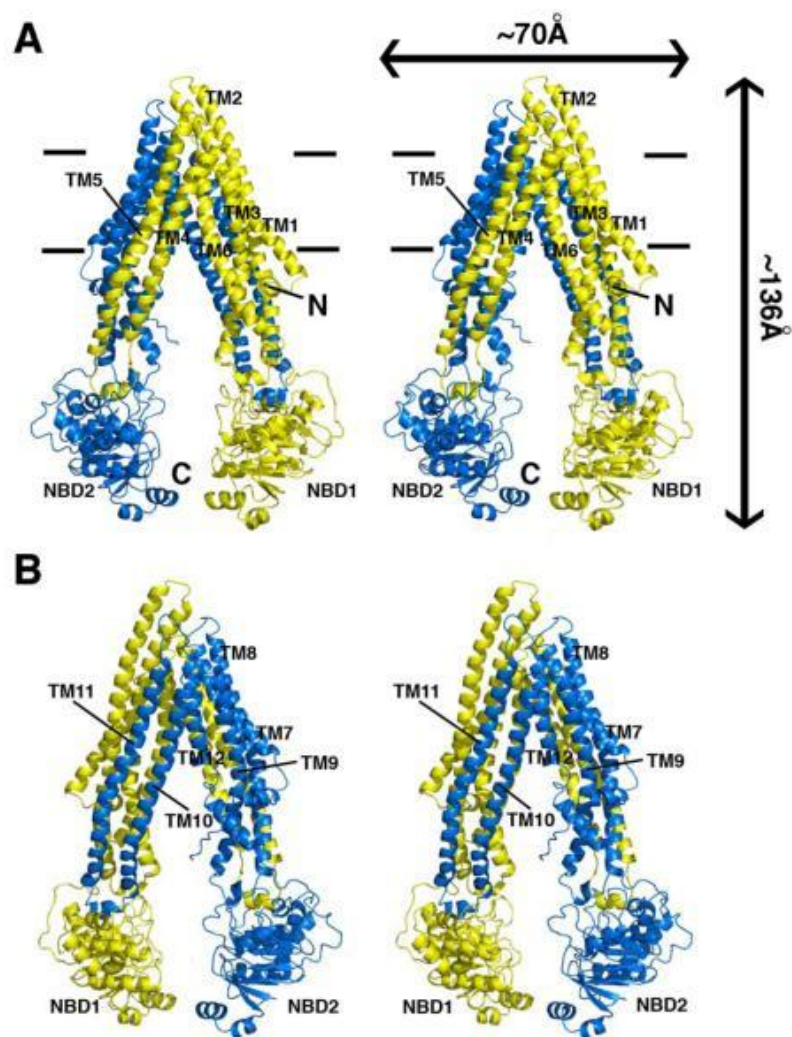
Oporność wielolekowa (ang. *multidrug resistance*, MDR), której efektem jest nadmierne usuwanie leku (ksenobiotyku) z wnętrza komórki, jest jedną z najważniejszych przyczyn niepowodzeń chemioterapii przeciwnowotworowej. Podstawowym mechanizmem wywołującym zjawisko oporności jest nadekspresja transporterów błonowych, z których większość należy do nadrodziny transporterów ABC [61]. Nadrodzina transporterów ABC jest jedną z najliczniejszych klas białek, występujących zarówno u organizmów pro- jak i eukariotycznych. Dotąd do nadrodziny ABC zaklasyfikowano 49 białek, które podzielono na 7 podrodzin [169]. Białka te zawierają charakterystyczne elementy strukturalne tj. region transbłonowy (ang. *transmembrane domain*, TMD) - prawdopodobnie bezpośrednio zaangażowany w przenikanie substratu przez błonę lipidową - oraz domenę wiążącą ATP (ang. *nucleotide binding domain*, NBD) - odpowiedzialną za wiązanie i hydrolizę ATP. W skład NBD wchodzi motyw Walkera A i B oraz region podpisu, czyli motyw C, a sekwencja tej domeny jest podstawą klasyfikacji białek ABC [61, 170]. Wśród nadrodziny białek ABC

opisano półtransportery (hemitransportery) - zawierające jedną domenę TMD i jedną domenę NBD (np. białko BCRP) - oraz pełne transportery - składające się z dwóch domen TMD i dwóch domen NBD (np. glikoproteina-P, ang. *Permeability – Glycoprotein*). Znane są także transportery rozbudowane, które mogą posiadać dodatkową domenę transbłonową (np. MRP1) [62, 170, 171].

Transportery ABC pełnią funkcje związane z przenoszeniem różnych substancji hydrofobowych przez błony zewnątrz i wewnątrzkomórkowe. U *Prokaryota* transportery ABC są w głównej mierze zaangażowane w pobieranie ze środowiska zewnętrznego niezbędnych dla życia związków, które nie mogą być uzyskane poprzez dyfuzję (np. węglowodanów, witamin, jonów metali). W komórkach *Eukaryota* większość pomp ABC przemieszcza szereg ksenobiotyków z cytoplazmy poza komórkę lub do wewnątrzkomórkowych kompartymentów [169]. Do tego typu transporterów należą m.in. P-gp oraz MRP. Część transporterów ABC funkcjonuje jako kanały jonowe lub regulatory kanałów np.: białko mukowiscydozy (CFTR), nabłonkowy regulator przenikania chlorków (EBCR). Natomiast funkcje niektórych transporterów ABC nadal oczekują na wyjaśnienie [57, 59, 62, 169, 171].

1.5.2.1.1. Glikoproteina-P - struktura, lokalizacja oraz mechanizm działania

Glikoproteina-P (P-gp, ABCB1) jest pierwszym zidentyfikowanym i scharakteryzowanym transporterem ABC u człowieka. Należy do podrodziny B nadrodziny transporterów ABC. Jest ATP-zależną pompą błonową o masie 170 kDa, zbudowaną z 1280 aminokwasów, kodowaną przez geny MDR1 oraz MDR3. Konstytutywne geny *mdr1a/b* u myszy kodują transportery białkowe homologiczne z ludzkimi, warunkowanymi obecnością genu MDR1 [60, 172]. P-gp posiada w swej strukturze dwie domeny transbłonowe (TMD), z których każda składa się z sześciu segmentów, oraz dwie domeny wiążące ATP (NBD), ulokowane w pętlach znajdujących się po cytoplazmatycznej stronie błony (ryc. 7). W NBD występują także specyficzne dla nadrodziny ABC sekwencje: „region podpisu”, motyw Walkera A i motyw Walkera B. Natomiast w obrębie TMD zlokalizowane są co najmniej dwa miejsca odpowiedzialne za stereoselektywne wiązanie przenoszonych substancji [61, 169].



Rycina 7. Struktura P-gp wg [61].

Widok pod różnym kątem: (A) z przodu i (B) z tyłu. Kolorem żółtym i niebieskim zaznaczono segmenty dwóch domen transbłonowych (TM1-6 – kolor żółty i TM7-12 – kolor niebieski). N - koniec aminowy, C - koniec karboksylowy łańcuchów polipeptydowych. Linie poziome oznaczają położenie błony lipidowej. NBD 1 i 2 – domeny wiążące ATP (ulożone w cytoplazmie komórkowej).

P-gp opisano po raz pierwszy w 1976 roku w komórkach nowotworowych [170]. Później stwierdzono, że występuje ona także w komórkach prawidłowych [171, 173]. Uważa się, że P-gp bierze udział w sekrecji i eliminacji z ustroju leków, toksyn oraz ich metabolitów. Wskazuje na to wysoki poziom ekspresji P-gp w komórkach gruczołów wydzielania wewnętrznego. Natomiast przez udział w tworzeniu barier przepuszczalności krew-mózg, krew-mocz oraz obecność w łożysku odgrywa ona istotną rolę ochronną, utrudniając przechodzenie z krwi do tkanek ww. substancji [57, 59]. P-gp prawdopodobnie odgrywa również istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej.

Badania SAR (*Structure-Activity-Relationship*) udowodniły, że wiązanie przez P-gp potencjalnych substratów, w dużym stopniu zależy od ich lipofilności, masy molekularnej i budowy przestrzennej [59, 63, 64]. Glikoproteina-P posiada szerokie spektrum substratowe, ukierunkowane na substancje hydrofobowe wielkości 330 - 4000 Da, zawierające pierścienie aromatyczne, wnikające do komórki na drodze biernej dyfuzji [60, 61]. Białko to usuwa cząsteczki wielu leków (w tym przeciwnowotworowych) i toksyn z wnętrza komórek, zapobiegając ich kumulacji i utrudniając osiągnięcie miejsc docelowych [59, 61, 169]. Od wielu lat jest wiadomo, że niektóre z TZO, np. chloroorganiczne pestycydy – takie jak chlordekan, endosulfan, heptachlor i epoksyd heptachloru – są również substratem dla P-gp [59].

Sposób przemieszczania substratów przez P-gp nie został dotychczas w pełni wyjaśniony. Udowodniono, że zjawisko to wymaga współdziałania obu TMD oraz równoczesnej hydrolizy ATP. Miejsce, do którego wiąże się ATP, znajduje się na domenach NBD. Istnieje kilka hipotez dotyczących działania P-gp, takich jak: model tzw. „odkurzacza molekularnego”, flipaza, klasyczna pompa jonowa, aktywacja kanału chlorkowego i podwyższenie pH. Wśród nich najbardziej prawdopodobny wydają się model „odkurzacza molekularnego”, który zakłada, że P-gp usuwa poza obręb komórki cząsteczki substratów znajdujące się pomiędzy wewnętrzną i zewnętrzną warstwą lipidową błon komórkowych. Energia potrzebna do tego procesu pochodzi z hydrolizy dwóch cząsteczek ATP [59, 61, 169, 174]. Zaobserwowano również, że P-gp transportuje niektóre substancje lecznicze w sposób stereoselektywny [175-177].

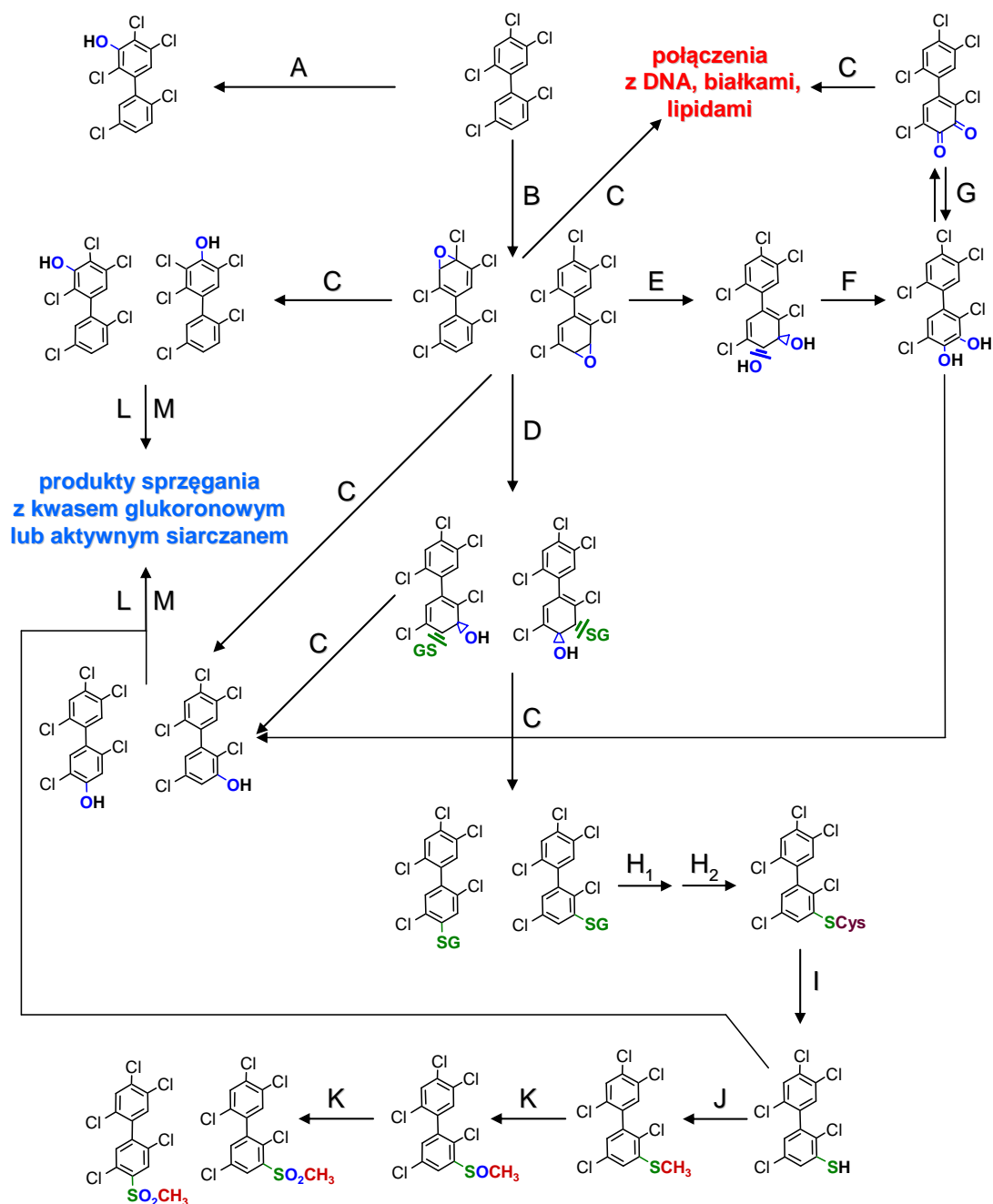
1.5.3. Biotransformacja i metabolity

Metabolizm polichlorowanych bifenyli przebiega w wątrobie w dwóch fazach. W pierwszej, enzymy z rodziny cytochromu P450 utleniają lipofilową cząsteczkę PCB, tworząc bardzo reaktywny epoksytlenek (pierścień oksarinowy) w pozycji *meta-para* (ryc. 8B) [66, 139, 178, 179]. Na drodze redukcji i/lub hydrolizy może on albo samorzutnie przegrupować się do grupy hydroksylowej (ryc. 8C), albo też tworzyć dihydrodiole (ryc. 8E,F). Dihydrodiole mogą następnie tworzyć chinony (ryc. 8G), które ze względu na swój elektrofilowy charakter, podobnie jak epoksytlenek, wykazują zdolność do formowania adduktów z DNA, białkami i lipidami [44, 180, 181]. Dihydrodiole mogą także tworzyć metabolity fenolowe po eliminacji cząsteczki wody (ryc. 8C) [43]. OH-PCB powstają również w wyniku bezpośredniego

wprowadzenia grupy hydroksylowej w pozycję *meta*-, katalizowanego przez enzym cytochromu P450 (ryc. 8A) [182, 183].

Aromatyczny tlenek PCB reaguje z glutationem (GSH, ryc. 8D) a następnie na drodze degradacji tworzy metabolit metylosulfonowy (ryc. 8C-K) [184, 185]. Pierwszą fazą tych przemian jest sprzężenie z GSH za pośrednictwem transferazy S-glutationu (GST). Utworzony addukt, po eliminacji cząsteczki H₂O, ulega hydrolizie pod wpływem peptydazy i na drodze szlaku przemian kwasu merkapturowego (MAP) zostaje sprzężony z cysteiną. Powstały produkt jest wydalany z żółcią i pod wpływem liaz mikroflory jelitowej tworzony jest tiol (SH-PCB). SH-PCB może ulegać glukuronidacji, sulfonowaniu lub S-metylacji. MeS-PCB są wchłaniane z przewodu pokarmowego i pod wpływem monooksygenaz wątrobowych, ulegają dwuetapowemu utlenieniu do metylosulfotlenku (MeSO-PCB) i ostatecznie do metylosulfonu (MeSO₂-PCB) [185]. Metabolity PCB z atomami chloru w pozycjach 2,5 lub 2,3,6 względem grupy MeSO₂- tworzone są z tri- do hepta- chlorobifenyli [129]. MeSO₂-PCB mogą ulegać dalszemu metabolizmowi do pochodnych dwumetylosulfonowych [186].

W drugiej fazie metabolizmu pochodne hydroksylowe PCB ulegają sprzężeniu z kwasem glukuronowym lub sulfonowaniu (ryc. 8L,M). W mikrosomach szczura z obu procesów sprzężania glukuronidacja jest procesem dominującym nad sulfonowaniem [187]. W odróżnieniu od pochodnych hydroksylowych i metylosulfonowych, glukuronidy i siarczany PCB uważane są za nietoksyczne [44].



Rycina 8. Schemat biontransformacji 2,2',4,5,5'-pentachlorobifenylu, zaadaptowano z [43].

Kolorami pokazano losy poszczególnych grup atomów. Literami oznaczono etapy przemian z udziałem:

- A enzymów z rodziny cytochromu P450; bezpośrednie podstawienie grupy hydroksylowej w pozycji *meta*;
- B CYP2B1 (gryzonie); CYP3A4 (ludzie); nie-planarne PCB: CYP2B, CYP2C, CYP3A;
- C reakcji nieenzymatycznej;
- D transferazy S-glutationu (GST);
- E hydrolazy epoksydowej;
- F dehydrogenazy dihydrodiolowej;
- G samoutlenienia i/lub peroksydazy;
- H szlaku przemian kwasu merkapturowego (MAP): H_1 - glutamylotransferazy, H_2 - dipeptydazy cysteinyloglicynowej;
- I liazy C-S;
- J S-metylotransferazy S-adenozylu-L-metioniny (SAM);
- K S-oksydacji za pośrednictwem monooksygenaz zawierających CYP i/lub FAD;
- L transferazy urydyno-5'-difosfoglukuronowej (UGT);
- M sulfotransferazy (SULT).

1.5.4. Wydalanie

Eliminacja kongenerów PCB zależy od stopnia ich metabolizmu do bardziej polarnych związków. Większość kongenerów wykazuje eliminację dwufazową. W początkowej fazie okresy połowicznego zaniku są stosunkowo krótkie dla wszystkich PCB. PCB mogą być wydalone w formie niezmienionej lub jako produkty przemian ustrojowych [44]. W zależności od ich właściwości fizykochemicznych eliminacja następuje głównie z żółcią i kałem [188], w mniejszym stopniu z moczem [187]. Najmniejsze ilości substancji wydalają się ze śliną, potem i mlekiem [143, 156]. Jednak niektóre hydroksy- i metylosulfonowe pochodne PCB są wybiórczo zatrzymywane zarówno w organizmie ludzkim [49-51] jak i w zwierzęcym [52-56].

Okres biologicznego półtrwania ($t_{0,5}$) poszczególnych PCB zależy od liczby i miejsca podstawienia atomów chloru w cząsteczce. Kongenery, zawierające atomy chloru w pozycjach 2,4,5-, 2,3,5- lub 2,3,6- w obu pierścieniach fenylowych, charakteryzują się bardzo dużą trwałością. Największe wartości $t_{0,5}$ stwierdzono u ryb, ptaków i ssaków w przypadku diortopodstawionych PCB 153, 138, 180 [1]. Najdłuższe biologiczne okresy półtrwania PCB, obliczone na podstawie wyników analizy próbek tkanki tłuszczowej i krwi zebranych w 1990 i 2003r. od 229 brytyjskich probantów, wahają się w granicach 10-15 lat: $t_{0,5}$ najbardziej trwałego kongeneru PCB 170 obliczono na 15,5 lat, PCB 153 na 14,4 lat, a PCB 180 na 11,5 lat [189]. Z kolei na podstawie analiz szwedzkich próbek mleka kobiecego, zebranych na przestrzeni kilkunastu lat, $t_{0,5}$ PCB wyniósł odpowiednio dla PCB 153 = 17 lat, PCB 138 = 14 lat, a PCB 118 = 11 lat [190]. Ponadto wykazano, że poszczególne atropoizomery chiralnych PCB 95, 132 i 149 różnią się od siebie parametrami toksykokinetycznymi takimi jak $t_{0,5}$ i klirens [42].

1.6. Mechanizmy toksycznego działania PCB i ich metabolitów

Pierwsze doniesienia o toksyczności polichlorowanych bifenyli przypadły na koniec lat sześćdziesiątych XX wieku [1, 191]. Wtedy to wykazano, że przyczyną trądzikowej wysypki skórnej typu *acne chlorica*, występującej u mieszkańców regionu Kyushu w Japonii (choroba Yusho - 1968), było spożycie oleju ryżowego, do którego w procesie produkcyjnym przedostały się PCB. Podobne objawy zaobserwowano jedenaście lat później na Tajwanie (choroba Yu-Cheng) [191, 192]. U ofiar obu katastrof stwierdzono m.in. uszkodzenie wątroby,

ostre zmiany skórne, zaburzenia układu nerwowego, hormonalnego, rozrodczego i oddechowego.

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wykazały, że niektóre PCB powodują uszkodzenia śródbłonna naczyń przejawiające się utratą funkcji bariery i zwiększoną adhezją leukocytów, wykazują także działanie neurotoksyczne i immunotoksyczne [4, 193].

Mechanizmy toksycznego działania polichlorowanych bifenyli oraz ich metabolitów są niezwykle skomplikowane i nie do końca poznane. Obecnie przyjmuje się, że polegają one m.in. na [3, 4, 6, 10, 14, 16, 36, 194, 195]:

- hamowaniu syntezy endogennych hormonów,
- inhibicji łączenia endogennych hormonów ze specyficznymi białkami transportującymi hormony z miejsca syntezy do punktu docelowego,
- modyfikacji metabolizmu endogennych hormonów,
- nieodwracalnym, kowalencyjnym wiązaniu się ze strukturami np. DNA czy białek,
- konkurencyjnym łączeniu się z odpowiednimi receptorami (aktywacja lub inhibicja),
- modyfikacji poziomu i powinowactwa różnych receptorów w komórkach.

W związku z tym wielu badaczy zaproponowało różne klasyfikacje toksyczności kongenerów PCB w zależności od: stopnia i miejsca ich podstawienia atomami chloru, powinowactwa do receptora i/lub receptorów (tabela 5) [4, 6, 36], zdolności indukowania enzymów [66, 179] czy wpływu na funkcje endokrynne [3, 5].

Tabela 5. Interakcje wybranych PCB z receptorami i enzymami.

Klasa PCB	Miejsce oddziaływania	
	Receptor	Rodzina izoenzymów cytochromu P-450
planarne	Arylowęglowodorowy (AhR)	CYP1A
podstawione w pozycji <i>orto</i> - i <i>para</i> -	Konstrytuwny receptor androstanu (CAR)	CYP2B
wieloorstopstawione	Pregnanu X (PXR)	CYP3A
kongenery 95 i 136	Rianodynowy (RyR)	CYP2B, CYP3A
Kongener 84	Kinazy białkowej C (PKC)	-

Struktura przestrzenna warunkuje dwa główne typy aktywności biochemicznej PCB [4], tj.: 3-metylocholantrenu (3MC) i fenobarbitalu (PB).

Przedstawicielei pierwszej grupy charakteryzuje brak w cząsteczce atomów chloru w pozycji *orto*- (PCB 77, 81, 126 i 169 – tabela 1). Mają one budowę przestrzenną podobną do 2,3,7,8-TCDD i wykazują porównywalne z nią efekty toksyczne, ponieważ tak jak ona mają zdolność do wiązania się z AhR. Z tego powodu kongenery te określane są jako PCB „dioksynopodobne” - z ang. *dioxin-like PCB* lub WHO-PCB [4, 191] i uznawane są powszechnie za najbardziej toksyczne PCB [4, 66].

Mechanizm działania planarnych PCB, podobnie jak dioksyn, jest oparty na pobudzaniu AhR, czego efektem jest przede wszystkim uruchomienie transkrypcji genów enzymów metabolizujących leki i ksenobiotyki, tj. izoenzymów CYP1A1, CYP1A2 (odpowiedzialnego za metaboliczną aktywację kancerogenów), CYP2A1 i CYP1B1 cytochromu P450. Stwierdzono również wysoką korelację pomiędzy powinowactwem PCB do AhR a indukcją hydroksylazy aryłowęgłowodorowej (AHH), o-deetylazy etoksyrezorufiny (EROD) i o-demetylazy metoksyrezorufiny (MROD) oraz pomiędzy indukcyjnością a toksycznością. Skutkuje to nasiloną proliferacją retikulum endoplazmatycznego komórek wątroby, zwiększając jej rozmiar i wpływając na wiele, jeśli nie na wszystkie jej funkcje. Receptor Ah wpływa również na ekspresję genów kontrolujących wzrost i różnicowanie się komórek. Jego aktywacja objawia się m.in. hamowaniem syntezy receptorów estrogenowych. W praktyce więc związki te wywołują pośrednio działanie antyestrogenne. Z drugiej strony kongenery te indukując różne molekularne formy cytochromu P-450 - m.in. z grupy CYP1A1 i CYP1B1, wpływają na kierunek metabolizmu 17 β -estradiolu [4, 196]. Następuje przesunięcie równowagi w kierunku powstawania 4-hydroksyestronu, metabolitu o dużej aktywności hormonalnej, a jednocześnie podejrzanego o wywoływanie nowotworów nerek u zwierząt doświadczalnych [197]. Ponadto induktory typu 3MC zaburzają funkcje immunologiczne ustroju (zmniejszają wielkość grasicy).

Induktory typu PB (PCB podstawione dwoma atomami chloru w pozycji *para*- i jednocześnie co najmniej dwoma atomami chloru w pozycji *orto*- np. PCB 128, 137, 153, 166, 170, 180, 190, 194, 205), poprzez interakcje z CAR, indukują powstawanie izoenzymów CYP2B1, CYP2B2. Efektem ich działania jest wzrost aktywności o-depentylazy pentoksyrezorufiny (PROD) prowadzący do reakcji dealkilacji. PCB typu PB wykazują mniejsze powinowactwo do receptorów białkowych - AhR i nie indukują aktywności AHH/EROD. PCB typu PB różnią się od induktorów typu 3MC mechanizmem działania kancerogennego, neurotoksycznego czy sposobem zaburzania funkcji endokrynnych [4, 6, 198]. Wykazano, że

induktory typu PB charakteryzują się działaniem estrogenym na drodze bezpośredniego wiązania z receptorem estrogenowym. Działanie to jest nawet o kilka rzędów wielkości słabsze w porównaniu z 17 β -estradiolem, ale może być rekompensowane stałą obecnością ksenobiotyków w organizmie człowieka [197]. PCB podstawione atomami chloru w pozycji *orto*- charakteryzują się różnym profilem aktywności biochemicznej i toksykologicznej. Niektóre z nich indukują CYP3A, podczas gdy inne oddziałują na inne miejsca docelowe w ustroju (tabela 3) [4, 6, 198, 199]. Wieloortopodstawione kongenery zmniejszają syntezę dopaminy w neuronach (na drodze inhibicji hydroksylazy tyrozynowej), zaburzają homeostazę wapnia w układzie nerwowym, indukują wydzielanie insuliny, pobudzają neutrofile do produkcji reaktywnych form tlenu [24, 25, 28, 34, 35, 194, 200-202].

Oprócz wyżej wymienionych spotyka się również kongenery wykazujące mieszany typ aktywności biochemicznej PB/3MC (monoortopodstawione PCB, występujące w matrycach biologicznych w stosunkowo dużych ilościach np. PCB 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167 czy 189), które są induktorami izoenzymów zarówno CYP1A, CYP1B, jak i CYP2B [4].

Z przedstawionych danych wynika jasno, że większość niekorzystnych objawów jest skutkiem zaburzenia homeostazy układu hormonalnego, głównie - funkcjonowania hormonów płciowych - żeńskich i męskich oraz hormonów tarczycy, dlatego PCB są zaliczane do związków z grupy tzw. „*endocrine disruptors*” [5, 37, 191]. Pod nazwą tą należy rozumieć czynniki egzogenne zdolne do pobudzania, bądź hamowania odpowiednich receptorów i wywołujące zaburzenia syntezy, wydzielania, transportu, łączenia z białkami receptorowymi, metabolizmu i wydalania z ustroju endogennych hormonów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy organizmu człowieka oraz wpływających niekorzystnie na płodność, rozwój i/lub zachowanie [3, 37, 191, 197].

Zaburzenie homeostazy hormonów tarczycy przez PCB wynika ze zbliżonej budowy przestrzennej fragmentu cząsteczek trójjodotyroniny, a zwłaszcza tyroksyny (T4) do struktury niektórych kongenerów. Wiadomo, że niektóre PCB, a zwłaszcza ich hydroksylowane metabolity, mają większe (nawet 4-8-krotnie) powinowactwo do transtyretyny (TTR) - białka przenoszącego hormony tarczycy. PCB mogą wypierać naturalny ligand jakim jest tyroksyna z miejsca łączenia się z białkami transportującymi. Dotyczy to zwłaszcza kongenerów nie posiadających atomów chloru w pozycji *orto*-, bądź tylko jeden taki podstawnik. Dopiero 4 atomy chloru w pozycji *orto*- (tj. 2,2',6,6') znoszą możliwość łączenia odpowiedniego PCB z

transtyretyną. Drugi mechanizm zakłada zwiększenie eliminacji hormonów tarczycy na skutek wzrostu aktywności transferazy urydyno-5'-difosfoglukuronowej (UGT) oraz nasilenie procesu selektywnej glukuronidacji tyroksyny. Ekspozycja na PCB może zwiększać klirens T4 z surowicy poprzez wpływ na metabolizm wątrobowy i w konsekwencji prowadzić do zmniejszenia czasu biologicznego półtrwania T4 we krwi. Poza tym PCB działają również na poziomie modyfikacji informacji przekazywanych przez hormony podwzgórza i przysadki mózgowej (działanie hormonu tyreotropowego - TSH), modyfikacji tempa metabolizmu oraz wywołują bezpośredni wpływ na odpowiednie receptory, co w efekcie powoduje niedoczynność tarczycy [3, 5, 12, 195, 203]. Jej skutkiem może być opóźniony rozwój organów i narządów. Od niedawna wiadomo też, że PCB mogą zaburzać transport i metabolizm retinoidów w organizmie człowieka [14].

Zdecydowana większość PCB, a szczególnie ich hydroksylowe metabolity, są uważane za związki estrogenne, zwiększające ryzyko zachorowalności na raka piersi wśród kobiet [14, 197, 204, 205].

Hydroksylowe pochodne PCB nie asocjują z lipidami, lecz wiążą się z białkami krwi, gdzie ich zawartość wynosiła 5-50% całkowitej zawartości PCB, przy czym najwyższe stężenia znaleziono w krwi pępowinowej (łożysko stanowi słabą barierę dla metabolitów PCB), niskie poziomy stwierdzono w mleku ludzkim. OH-PCB wykazują aktywność biochemiczną poprzez wiązanie się z receptorem estrogenowym, co w konsekwencji zaburza czynność endokrynną tarczycy [44, 45, 47, 48, 54, 206-209].

Metylosulfonowe PCB są bardziej lipofilowe niż OH-PCB i asocjują z lipidami. Największe ich zawartości oznaczano w wątrobie i płucach. Poziom MeSO₂-PCB we krwi ludzkiej jest niższy niż pochodnych hydroksylowych, natomiast w mleku kobiecym poziom obu grup metabolitów jest zbliżony [45, 210, 211]. Stwierdzono, że MeSO₂-PCB są również induktorami izoenzymów cytochromu P-450 [212], promotorami rozwoju nowotworów oraz zmniejszają stężenie tyroksyny w surowicy krwi [213] i dostępność progesteronu [214], dlatego tak jak OH-PCB są również zaliczane do grupy „*endocrine disruptors*” [5].

1.6.1. Aktywność biochemiczna i toksyczność chiralnych PCB

Aktywność biologiczna oraz toksyczność chiralnych kongenerów, podobnie jak pozostałych PCB, zależy od miejsca podstawienia atomów chloru w pierścieniu bifenylowym.

Kongenery planarne przejawiają aktywność biochemiczną typu 3-metylocholanotrenu (3MC) i charakteryzują się dużą toksycznością. Wieloortopodstawione PCB, w tym kongenery chiralne, wykazują zdolność wiązania się z konstytutywnym receptorem androstanu (CAR) [215], pregnanu X (PXR) [216], czy receptorami rianodynowymi (RyR) [25, 28, 217]. Enancjomery PCB różnią się siłą wpływu na homeostazę jonów wapnia i zmniejszają aktywność kinazy białkowej C [25, 28, 34]. Udowodniono, że niektóre tetrachloropodstawione bifenyly, o wartości kąta między płaszczyznami pierścieni powyżej 70°, są metabolizowane przez zespół enzymów cytochromu P-450 3A. Inne ortopodstawione PCB są induktorami zarówno receptora aryłowęgłowodorowego (AhR) jak i konstytutywnego receptora androstanu (CAR) [218]. Powszechne zainteresowanie wieloortopodstawionymi kongenerami PCB wzmożło się z odkryciem ich działania neurotoksycznego [24, 25, 28] oraz antyestrogenowego [197].

Autorzy badań *in vitro* na hepatocytach zarodków piskląt wykazali, że chiralne PCB różnią się siłą indukcji enzymów z rodziny cytochromu P450 (PCB 139 > PCB 197 ≥ PCB 88). Obydwa atropoizomery PCB 88 (2,2',3,4,6-pentachlorobifenyly) w jednakowym stopniu indukują izoenzymy CYP, podczas gdy tylko (+)-PCB 88 zwiększa aktywność EROD. Z kolei (-)-enancjomer jest silniejszym induktorem innej monooksygenazy błonowej - N-demetylazy benzfetaminy (BPDM). (+)-PCB 139 (tj. prawoskrętny enancjomer 2,2',3,4,4',6-heksachlorobifenyly), zwiększa całkowitą aktywność CYP oraz indukuje EROD i BPDM w stopniu większym niż jego izomer lewoskrętny. (-)-2,2',3,3',4,4',6,6'-oktachlorobifenyl ((-)-PCB 197) silniej indukuje BPDM, a (+)-PCB 197 – EROD. Ogólnie, BPDM jest aktywowana z różną siłą, w kolejności PCB 197 ≥ PCB 139 > PCB 88 [219].

Badania *in vivo*, przeprowadzone na szczurach rasy Sprague-Dawley, wykazały, że racemiczny PCB 88 nie indukuje enzymów metabolizujących leki. (±)-PCB 197, jak i każdy z jego atropoizomerów osobno, są słabymi induktorami CYP2B [75]. Natomiast (±)-PCB 139 jest silnym induktorem tej izoformy CYP, a jego izomer prawoskrętny aktywuje N-demetylazę aminopirenu, epoksydazę aldriny, UDP-glukuronylotransferazę czy zwiększa całkowity poziom CYP efektywniej niż jego forma lewoskrętna [220]. Na podstawie powyższych zależności stwierdzono, że PCB chiralne z trzema atomami chloru w pozycji *orto*- wykazują aktywność biochemiczną typu fenobarbitalu (PB) [75], natomiast tetraortopodstawione PCB indukują BPDM [219].

Procesy zachodzące podczas wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania mogą decydować w różnym stopniu o składzie ilościowym pary enancjomerów po podaniu racematu PCB. Efekt ten został zaobserwowany po raz pierwszy przez *Puttmana i wsp.* [75], którzy po pięciu dniach od podania mieszaniny racemicznej (\pm)-PCB 139 szczurom, zaobserwowali dwukrotnie większy poziom enancjomeru prawoskrętnego w wątrobie tych zwierząt. Dlatego też badania aktywności metabolicznej racematów PCB prowadzone w warunkach *in vitro* są obarczone mniejszym błędem ze względu na brak innych, stereoselektywnych procesów farmakokinetycznych zachodzących *in vivo* w organizmach. Pomijając wpływ losów w ustroju można stwierdzić, że poszczególne atropoizomery PCB wywierają enancjoselektywny wpływ na aktywność cytochromu P450, EROD, BPMD, N-demetylazy aminopirenu oraz epoksydazy aldriny.

Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że różna aktywność biologiczna atropoizomerów PCB wynika z faktu ich stereospecyficznego powinowactwa do miejsc wiążących (docelowych, receptorowych) w komórce [25, 28, 34, 221].

1.7. Skutki zdrowotne środowiskowego narażenia na PCB

Chroniczne narażenie na niskie dawki PCB dotyczy praktycznie całej populacji i jest konsekwencją globalnego rozprzestrzenienia się tych związków, które z kolei uzależnione jest od diety, położenia geograficznego oraz poziomu uprzemysłowienia.

Wyróżnia się dwa zasadnicze typy narażenia na PCB [3, 4, 222], tj.:

- narażenie zawodowe, występujące głównie:
 - podczas eksploatacji i konserwacji transformatorów, w czasie ich pożarów, wycieków lub rozlania płynów zawierających PCB na stanowiskach pracy,
 - w przypadku składowania odpadów niebezpiecznych, podczas oddychania skażonym powietrzem lub bezpośredniego kontaktu z glebą lub osadem zanieczyszczonymi tymi związkami,
- narażenie środowiskowe, które jest wynikiem pobrania tych ksenobiotyków drogą pokarmową, oddechową i przezskórną.

Mimo, że produkcja PCB oraz ich wykorzystanie w systemach otwartych praktycznie zakończyły się w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, to głównym źródłem narażenia

człowieka na polichlorowane bifenylo nadal pozostaje żywność [4, 5, 10, 13], zawierająca ich pozostałości na skutek:

- kumulacji z wody, gleby i powietrza atmosferycznego,
- przenoszenia i zagęszczania w ogniwach łańcucha pokarmowego (PCB o większej liczbie atomów chloru w cząsteczce, przechodząc przez ogniwa łańcucha troficznego, ulegają biokumulacji i biomagnifikacji),
- skażenia np. z opakowań,
- bezpośredniego kontaktu z materiałami i produktami zawierającymi w swoim składzie PCB.

Uwzględniając stałą obecność PCB w środowisku oraz sieć zależności pokarmowych człowieka (urozmaicona dieta), długość życia, a także fakt, że znajduje się on na szczycie piramidy pokarmowej, jest rzeczą oczywistą, że w jego tkankach (wątrobie, szpiku kostnym, mleku i płynach ustrojowych, a zwłaszcza w tkance tłuszczowej) polichlorowane bifenylo będą się nagromadzały w najwyższych stężeniach [4, 18].

Wyniki badań doświadczalnych potwierdziły, że ekspozycja na PCB promuje rozwój nowotworów u zwierząt, dlatego polichlorowane bifenylo zaliczane są do związków o potencjalnym działaniu rakotwórczym u ludzi (klasa rakotwórczości B2) [14, 223].

Pre- i postnatalna ekspozycja na PCB może niekorzystnie wpływać na zdrowie i liczne procesy fizjologiczne człowieka. Skutki odległego narażenia rozpatrywane są przez współczesną toksykologię pod kątem genotoksyczności, teratogenności, mutagenności, kancerogenności, embriotoksyczności, neurotoksyczności, immunotoksyczności oraz wpływu na przebieg procesów enzymatycznych [3, 5, 13, 36, 203]. Wyniki badań epidemiologicznych przeprowadzonych u osób długotrwale narażonych na PCB sugerują, że PCB mogą powodować szereg problemów zdrowotnych [3, 4, 10-14, 165, 203, 224-226], takich jak np.:

- zaburzenia rozwojowe (obniżenie aktywności układu odpornościowego czy rozwoju psychomotorycznego u dzieci), zaburzenia pamięci i spowolnienie procesów uczenia się u dorosłych,
- dysfunkcje układu hormonalnego (zaburzenia funkcji hormonów wydzielanych przez tarczycę),

- nieprawidłowości układu rozrodczego (postępujące w czasie zmniejszanie się ilości i obniżanie jakości plemników, wzrost liczby przypadków torbielowatości jajników i zewnętrznej gruczolistości błony śluzowej macicy (endometriosis)),
- zwiększona zachorowalność na choroby układu sercowo-naczyniowego i nerwowego,
- zwiększone ryzyko zachorowań na chłoniaka nieziarnicznego, nowotwory woreczka żółciowego i wątroby oraz czerniaka, nowotwory sutka, jąder, prostaty.

Do dnia dzisiejszego prowadzone są intensywne badania aktywności biologicznej i toksyczności PCB [16, 121, 227]. W ostatnich latach, w ocenie zagrożenia zdrowotnego uwzględnia się również narażenie na metabolity PCB. Szczególną uwagę zwraca się na OH-PCB, których udział w narażeniu wydaje się większy niż metylosulfonowych PCB, ze względu na ich wyższe poziomy oznaczane w organizmach oraz strukturalne podobieństwo do hormonu tyroidowego – T4 [43, 45, 47, 48, 54, 206, 207, 228-230].

1.8. Ocena i oszacowanie ryzyka narażenia na PCB

Ocena ryzyka dla zdrowia ludzi, wynikającego z narażenia na PCB stanowi problem, gdyż efekty biologiczne wywierane przez poszczególne kongenery są różne, ze względu na ich odmienny mechanizm działania toksycznego [3-6]. Związki te mogą wchodzić w interakcje między sobą i wykazywać synergizm działania.

Ocena narażenia i oszacowanie ryzyka zdrowotnego są określane na podstawie składu i pozostałości tych ksenobiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego, tkankach ludzkich lub płynach ustrojowych człowieka. Matrycami najczęściej wykorzystywanymi do badań są: mięso, tłuszcz zwierzęcy, ryby, mleko kobyce i surowica krwi. Ze względu na stosunkowo łatwą dostępność - stanowią one idealny materiał, zarówno do oceny długoterminowego narażenia na chloroorganiczne ksenobiotyki jak i do badań czasowych trendów zanieczyszczenia środowiska [154, 231, 232].

W tabeli 6 zestawiono poziomy tzw. PCB wskaźnikowych tj. kongenerów 28, 52, 101, 118, 138, 153 i 180 w żywności i tkankach ludzkich przedstawione w raporcie UNEP (ang. *United Nations Environment Programme*) [1].

Tabela 6. Poziomy PCB wskaźnikowych w żywności i tkankach ludzkich wg raportu UNEP [1].

Matryca	Stężenie Σ PCB wskaźnikowych
Warzywa, owoce, produkty zbożowe	< 10 ng/g produktu
Masło	0 - 80 ng/g produktu
Mleko krowie	5 - 200 ng/g produktu
Tłuszcz zwierzęcy	20 - 240 ng/g produktu
Ryby	10 - 500 ng/g tłuszczu
Wątroby i trany rybne	> 10 μ g/g produktu
Mleko kobiece	0,5 - 1,5 μ g/g tłuszczu
Tkanki ludzkie	od < 1 do > 5 μ g/g tłuszczu

Monitorowanie poziomów PCB w mleku ludzkim pozwala zarówno na ocenę ekspozycji matek jak i na oszacowanie wielkości pobrania PCB przez niemowlęta (ekspozycja postnatalna). Krew ludzka, obok mleka kobiecego zaliczana jest do matryc szeroko stosowanych w ocenie narażenia na PCB zarówno dorosłych osobników jak i płodów. Dodatkowo ocena poziomów PCB w surowicy krwi pępowinowej obrazuje skalę transportu PCB przez łożysko i narażenie jeszcze w łonie matki (ekspozycja prenatalna) [7, 8, 166].

Klasyczny model oceny długoterminowego narażenia człowieka na pozostałości zanieczyszczeń chemicznych w żywności polega na oszacowaniu dziennego pobrania EDI (ang. *Estimated Daily Intake*) tych związków z żywnością i porównaniu go z wartościami dopuszczalnymi. Otrzymane wartości EDI porównuje się z referencyjnymi wartościami akceptowanego dziennego pobrania ADI (ang. *Acceptable Daily Intake*), jak również ze skorygowanymi wartościami tolerowanego dziennego pobrania TDI (ang. *Tolerable Daily Intake*) [231, 233, 234].

W celu określenia potencjalnej toksyczności badanych próbek (preparatów handlowych PCB, ekstraktów próbek środowiskowych oraz innych złożonych mieszanin), zawierających PCDD, PCDF i PCB, w rutynowo prowadzonych analizach chemicznych standardem jest oznaczenie siedemnastu najbardziej toksycznych kongenerów PCDD/PCDF, spośród 210 możliwych (posiadających atomy chloru w pozycjach 2,3,7 i 8) oraz 12 tzw. „WHO-PCB”, spośród 209 możliwych. Toksyczność dioksynopodobnych PCB, dioksyn i furanów zawartych próbkach żywności, powietrza i itp. określa się za pomocą współczynnika TEF (ang. *Toxic Equivalency Factor* - współczynnik równoważny toksyczności 2,3,7,8-TCDD) oraz ilościowym wskaźnikiem toksyczności TEQ (ang. *Toxic Equivalency Quantity*) [1, 235,

236]. W/w współczynniki sprowadzają liczne dane toksykologiczne do jednej wartości, odpowiadającej toksyczności wzorca, którym jest 2,3,7,8-TCDD [1, 236, 237]. Ustalona wartość TEF dla 2,3,7,8-TCDD wynosi 1, natomiast dla poszczególnych kongenerów PCB waha się od 0,1 do 0,0001, dla najbardziej toksycznych (PCB 77, 81, 126, 169) a dla najmniej szkodliwych związków tej grupy (monoortopodstawione PCB) wynosi aktualnie 0,00003 [1, 16, 203, 235-237]. Wartości TEF dwunastu PCB planarnych i monoortopodstawionych, dziesięciu PCDF oraz siedmiu PCCD zestawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Wartości współczynników równoważnych toksyczności 2,3,7,8-TCDD (TEF) dla polichlorowanych: dibenzo-p-dioksyn (PCDD), dibenzofuranów (PCDF) oraz planarnych i monoortopodstawionych, dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) (wg WHO 1998 i 2005 r.) [235].

Związek chemiczny	WHO 1998 TEF	WHO 2005 TEF
<i>chlorowane dibenzo-p-dioksyny (CDD)</i>		
2,3,7,8-TetraCDD	1	1
1,2,3,7,8-PentaCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HeksaCDD	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HeksaCDD	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HeksaCDD	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0,01	0,01
OktaCDD	0,0001	0,0003
<i>chlorowane dibenzofurany (CDF)</i>		
2,3,7,8-TetraCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8-PentaCDF	0,05	0,03
2,3,4,7,8-PentaCDF	0,5	0,3
1,2,3,4,7,8-HeksaCDF	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HeksaCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HeksaCDF	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HeksaCDF	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HeksaCDF	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HeksaCDF	0,01	0,01
OktaCDF	0,0001	0,0003
<i>chlorowane bifenyli (CB)</i>		
<i>planarne (niepodstawione w pozycji orto-)</i>		
3,3',4,4'-TetraCB (PCB 77)	0,0001	0,0001
3,4,4',5-TetraCB (PCB 81)	0,0001	0,0003
3,3',4,4',5-PentacCB (PCB 126)	0,1	0,1
3,3',4,4',5,5' - HeksaCB (PCB 169)	0,01	0,03
<i>monoortopodstawione</i>		
2,3,3',4,4'-pentaCB (PCB 105)	0,0001	0,00003
2,3,4,4',5-pentaCB (PCB 114)	0,0005	0,00003
2,3',4,4',5-pentaCB (PCB 118)	0,0001	0,00003
2',3,4,4',5-pentaCB (PCB 123)	0,0001	0,00003
2,3,3',4,4',5-heksoCB (PCB 156)	0,0005	0,00003
2,3,3',4,4',5'-heksoCB (PCB 157)	0,0005	0,00003
2,3',4,4',5,5'-heksoCB (PCB 167)	0,00001	0,00003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (PCB 189)	0,0001	0,00003

Pogrubioną czcionką zaznaczono wartości TEF zaproponowane podczas spotkania ekspertów World Health Organization - International Programme on Chemical Safety (WGO-IPCS) w Genewie w czerwcu 2005 r.

TEQ oblicza się na podstawie wyników chemicznych analiz zawartości mas wszystkich siedemnastu kongenerów PCDD/PCDF oraz dwunastu kongenerów PCB ze wzoru:

$$TEQ = \sum([PCDD_i] \cdot TEF_i) + \sum([PCDF_i] \cdot TEF_i) + \sum([PCB_i] \cdot TEF_i)$$

gdzie: [PCDD_i] – stężenie kongeneru PCDD oznaczone w matrycy,

[PCDF_i] – stężenie kongeneru PCDF oznaczone w matrycy,

[PCB_i] - stężenie kongeneru PCB oznaczone w matrycy,

TEF_i - współczynnik toksyczności danego kongeneru.

Dla określenia toksyczności ortopodstawionych, nieplanarnych kongenerów, które wykazują słabe lub brak oddziaływania z receptorem Ah, Simon i wsp. zaproponowali ilościowy wskaźnik neurotoksyczności NEQ (ang. *Neurotoxic Equivalency Quantity*) [238]. Zaproponowana metodologia (NEQ) stała się cennym narzędziem, uzupełniającym informację o toksyczności złożonych środowiskowych mieszanin PCB [116].

Wyniki oznaczeń PCB w próbkach żywności pochodzenia zwierzęcego, mleka kobiecego i krwi ludzkiej z różnych krajów wskazują na korzystną tendencję obniżania się stężeń PCB w tych matrycach na przestrzeni ostatnich 30-40 lat w skali globalnej [4, 18, 154, 190, 232, 239]. Jednocześnie wiedza na temat efektów toksycznych PCB wzrasta o wiele szybciej niż spadek ich poziomów w środowisku, co ciągle stawia polichlorowane bifenyleny w gronie najczęściej oznaczanych i badanych TZO [48, 51, 124, 239].

Oszacowanie toksycznego działania środowiskowych poziomów większości ksenobiotyków (w tym PCB) na pojedyncze organizmy, gatunki i całe ekosystemy, czy też udowodnienie bezpośredniego związku między narażeniem na daną substancję a wystąpieniem określonego efektu zdrowotnego, jest nadal zadaniem niezwykle złożonym i trudnym. Wśród przyczyn tego oczywistego faktu należy wymienić m.in. [3-5, 10, 13, 15, 240]:

- bardzo niskie stężenia i współobecność różnych TZO (PCB, PCDD, PCDF, pestycydów chloroorganicznych, WWA) oraz ich metabolitów w różnych elementach środowiska,
- różne drogi narażenia (pokarmowa, oddechowa, skórna, *in utero*) populacji ludzkiej,
- trudności w oszacowaniu dawki progowej dla danego efektu toksycznego,
- wielokierunkowość mechanizmów działania pojedynczych substancji,

- abiotyczne i biotyczne przemiany, którym ksenobiotyki podlegają w środowisku zewnętrznym i w organizmie człowieka, prowadzące do powstawania nowych, często nieznanych metabolitów, wykazujących odmienne cechy toksykodynamiczne od substancji macierzystej,
- interakcje toksykologiczne (np.: synergizm, antagonizm) między substancjami toksycznymi po ich dostaniu się do organizmu,
- możliwość wystąpienia niekorzystnych skutków zdrowotnych ze znacznym opóźnieniem lub u następnych pokoleń,
- trudności w wyborze, interpretacji i ekstrapolacji wyników badań laboratoryjnych *in vivo* i *in vitro* na warunki rzeczywiste.

2. Analityka PCB i ich metabolitów w materiale biologicznym

Szerokie i wielokierunkowe stosowanie PCB oraz ich rozprzestrzenienie w ekosystemach spowodowało, że wraz ze swoimi metabolitami są one oznaczane praktycznie we wszystkich typach matryc biologicznych (mleko kobiece, krew, tkanki, organy, wydaliny, włosy, sperma) [7, 8, 13, 42, 43, 50-52, 86, 101, 154]. Oznaczanie tych ksenobiotyków w próbkach pochodzenia biologicznego stanowi dla analityka duże wyzwanie. Jest to związane ze specyfiką materiału biologicznego, którego podstawową cechą jest olbrzymia różnorodność i złożoność matryc. Narzuca to konieczność stosowania wielu metod przygotowywania próbek i stosowania bardzo wydajnych, selektywnych metod ekstrakcji oraz oczyszczania ekstraktów przed oznaczaniem końcowym [55, 241-243]. Przygotowanie próbek biologicznych do analizy jest zadaniem złożonym, a praco- i czasochłonne operacje i procesy wchodzące w skład tego etapu mogą być zarówno przyczyną straty analitów jak i źródłem dodatkowych zanieczyszczeń i błędów. Biorąc pod uwagę właściwości oraz zakres stężeń PCB, OH-PCB i MeSO₂-PCB spotykanych w środowisku, a także rodzaj analizowanego materiału biologicznego, procedura oznaczania tych związków obejmuje zazwyczaj następujące etapy:

- pobieranie i przechowywanie próbek,
- izolację/ekstrakcję z matrycy i wzbogacanie analitów,
- frakcjonowanie i oczyszczanie ekstraktów ze współekstrahujących się zanieczyszczeń,
- analizę jakościową i ilościową ekstraktów metodą chromatograficzną,
- walidację wykorzystywanych procedur analitycznych.

Przebieg pobrania i przygotowania próbki do analizy jak i wyodrębnienie analitów zależy głównie od rodzaju matrycy, natomiast etap oczyszczania jest podobny dla wszystkich typów ekstraktów. Identyfikację oraz oznaczanie PCB i ich metabolitów w oczyszczonych ekstraktach, pochodzących z różnych matryc, prowadzi się w ten sam sposób.

Ze względu na złożoność analizowanych matryc najbardziej czasochłonne w przygotowaniu próbek do analizy chromatograficznej są ekstrakcja i usunięcie zanieczyszczeń. Stąd też wiele uwagi poświęcono na opracowanie szybszych i bardziej wydajnych metod w tych procesach [55, 81, 241-255].

2.1. Pobieranie i przechowywanie próbek

Pobrana próbka musi być reprezentatywna dla badanego materiału, tzn. charakteryzować się składem zgodnym ze składem partii materiału, z którego została pobrana. Reprezentatywne próbki materiału biologicznego (surowica krwi, krew, tkanki, organy, mocz, kał) po pobraniu są przenoszone do odpowiednich pojemników i najczęściej zamrażane do czasu analizy. Tkanki i organy do czasu oznaczania przechowywane są zazwyczaj w całości. Temperatura do której zamraża się próbki nie jest jednoznacznie określona, najczęściej jest to zakres od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [8, 68, 256]. Krew przed zamrożeniem można wymieszać z EDTA lub heparyną jako antykoagulantem. Objętość próbek krwi i surowicy krwi analizowanych na obecność PCB, OH-PCB i MeSO₂-PCB jest różna i waha się od 0,1 do 5,0 ml [42, 45, 209]. W zależności od rodzaju pozyskanego materiału biologicznego zużywa się go do analizy w całości lub dzieli się go przed analizą na próbki np. o masie od 0,5 g [55] do 10 g [243]. Próbki stałe poddaje się rozdrabnianiu i homogenizacji przed rozpoczęciem procesu ekstrakcji w celu zwiększenia wydajności tego procesu [55, 68, 243, 257].

2.2. Metody wyodrębniania analitów z matrycy

Celem pozbycia się z próbek związków przeszkadzających (głównie białek) w oznaczaniu poszczególnych PCB i ich metabolitów poddaje się je procesowi denaturacji. Ekstrakcja analitów z matrycy bardzo często poprzedzona jest wytrąceniem białka przy użyciu rozpuszczalników organicznych. Denaturację przeprowadza się m.in.: metanolem, etanolem, kwasem octowym, kwasem mrówkowym, formaliną lub mieszaninami wymienionych rozpuszczalników [241, 243].

Podstawowym elementem przygotowania próbki środowiskowej do analizy chromatograficznej jest izolacja (wyodrębnienie) i/lub wzbogacenie, polegające na przeniesieniu analitów z matrycy pierwotnej (próbka oryginalna) do matrycy wtórnej z równoczesnym usunięciem substancji przeszkadzających i zwiększeniem stężenia analitów do poziomu powyżej granicy oznaczalności stosowanego przyrządu kontrolno-pomiarowego. Dodatkową zaletą jest zmniejszenie ilości i różnorodności interferentów w związku z tym, że do matrycy wtórnej przechodzą jedynie wybrane składniki [258].

Techniki ekstrakcyjne odgrywają szczególną rolę na etapie izolacji i wzbogacania analitów z próbek biologicznych. W przypadku większości materiałów biologicznych konieczne jest przeprowadzenie analitów z fazy stałej do ciekłej [55, 243]. Umożliwia to zastosowanie w kolejnych etapach oznaczeń, technik chromatograficznych, najczęściej stosowanych w analityce pozostałości PCB [43, 50, 86, 89, 91, 258, 259]

Proces ekstrakcji PCB i ich metabolitów można prowadzić różnymi metodami, jednak najpowszechniejsze to: ekstrakcja w układzie ciecz-ciało stałe po uprzednim rozdrobieniu/homogenizacji próbki [210, 243, 260-262], ekstrakcja w aparatach Soxhlet'a z różnym stopniem automatyzacji [188, 261, 263], ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (LLE, ang. *Liquid Liquid Extraction*) po uprzedniej denaturacji próbki [241, 264] oraz przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikami [55, 265, 266].

Klasyczną metodą wyodrębniania związków chloroorganicznych i ich metabolitów z surowicy krwi, plazmy i mleka a także z tkanek po ich rozdrobieniu, nie wymagającą stosowania skomplikowanej aparatury, jest ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą wytrząsaniem. Ekstrakcja analitów prowadzona jest bądź w rozdzielaczach, bądź w probówkach. Izolacja analitów oparta jest o współczynnik podziału pomiędzy ciecz i ciało stałe (lub dwie niemieszające się ciecze w przypadku LLE) i polega na przejściu analitów z matrycy do odpowiednio dobranego rozpuszczalnika. Uzyskanie korzystnych warunków izolacji opiera się na doborze odpowiednich rozpuszczalników lub ich mieszanin. Z kolei wybór rozpuszczalników dyktowany jest właściwościami analitów, interferentów i matrycy. W przypadku oznaczania wielu związków jednocześnie, rozpuszczalnik powinien dobrze izolować należące do różnych klas związki chemiczne z próbek zawierających pewne ilości wody, tłuszczu, białek, cukrów i innych substancji. Do ekstrakcji PCB najczęściej stosowane są niepolarne rozpuszczalniki organiczne (np. heksan, eter dietylowy), a w celu zwiększenia

selektywności procesu ekstrakcji PCB i ich metabolitów stosuje się mieszaniny rozpuszczalników o różnej polarności, jak: heksan/dichlorometan, heksan/aceton, heksan/2-propanol/eter dietylowy czy 2-propanol/heksan/eter tert-butyloowo-metylowy. Dodanie do ekstrahowanej matrycy soli, (najczęściej izotoniczny roztwór NaCl lub KCl), zwiększa wartość współczynnika podziału a tym samym skuteczność ekstrakcji. Podczas procesu ekstrakcji PCB i ich metabolitów, anality o właściwościach hydrofobowych, przechodzą do nie mieszającej się z wodą fazy organicznej. Zaletą ekstrakcji rozpuszczalnikiem/rozpuszczalnikami wspomaganą wytrząsaniem jest możliwość oznaczenia tłuszczu w próbce jeszcze przed rozpoczęciem etapu oczyszczania ekstraktu. Polega ono na odparowaniu rozpuszczalników w atmosferze azotu i grawimetrycznym pomiarze suchej pozostałości [241, 243].

W celu ekstrakcji analitów z odpowiednio przygotowanej matrycy lub oczyszczenia ekstraktów otrzymanych klasyczną techniką LLE wykorzystuje się technikę chromatografii adsorpcyjnej (SPE - ekstrakcja do fazy stałej, ang. *Solid Phase Extraction*). Pozwala ona na zużycie znacznie mniejszych objętości rozpuszczalników organicznych i często charakteryzuje się większą selektywnością w porównaniu do klasycznej metody ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz. Technika ta polega na naniesieniu próbki lub jej ekstraktu do kolumnienki chromatograficznej wypełnionej odpowiednim adsorbentem, a następnie elucji analitów właściwie dobranym rozpuszczalnikiem lub mieszaniną rozpuszczalników. Obecnie jako adsorbenty najczęściej wykorzystuje się Florisil, żel krzemionkowy lub tlenek glinu [7, 43, 100, 101, 241, 257, 260]. Do elucji PCB bądź ich metabolitów z fazy stałej wykorzystuje się heksan, mieszaninę aceton:heksan oraz dichlorometan [8, 45, 241].

Izolacja PCB z próbek techniką przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem (ASE, ang. *Accelerated Solvent Extraction*) umożliwia skrócenie czasu ekstrakcji do 5-15 min oraz objętości odczynników ekstrahujących nawet do ~ 20 ml. Przebiega ona pod zwiększonym ciśnieniem (do 20 MPa), w temperaturze (do 200 °C) przekraczającej temperaturę wrzenia poszczególnych rozpuszczalników użytych w procesie ekstrakcji. Zaletą ASE jest krótki czas trwania procesu, jego duża wydajność i powtarzalność. Umożliwia ona również oczyszczenie ekstraktu z zanieczyszczeń w warunkach *in situ* [55, 242, 246-248, 250-252, 258, 267].

Coraz częściej stosowane są także inne techniki, wśród nich: ekstrakcja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE, ang. *Microwave-Assisted Extraction*), ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym (SFE, ang. *Supercritical Fluid Extraction*),

mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME, ang. *Solid Phase Microextracion*) i dializa przez półprzepuszczalną membranę polietylenową (SPMD, ang. *Semi Permeable Membrane Dialysis*) [252, 258, 267]. Zaletą nowych technik ekstrakcji jest ich wydajność i szybkość procesu, wadą - cena aparatury.

2.3. Frakcjonowanie ekstraktów

Fizykochemiczne właściwości metylosulfonowych i hydroksylowych pochodnych PCB ($\text{MeSO}_2\text{-PCB}$ i OH-PCB) pozwalają na rozdzielanie tych związków od siebie i od swoich prekursorów (PCB) jeszcze przed analizą chromatograficzną. Metylosulfony PCB są zasadami Lewisa, natomiast pochodne hydroksylowe wykazują słaby charakter kwasowy. To właśnie te inne od związków macierzystych właściwości są wykorzystywane w trakcie rozdzielania ekstraktów na poszczególne frakcje. Frakcjonowanie ekstraktów może nastąpić przed lub po etapie usunięcia lipidów [43, 86]. W celu wyodrębnienia frakcji ekstraktów zawierających związki macierzyste oraz poszczególne grupy metabolitów PCB wykorzystuje się technikę LLE i podział pomiędzy dwie oddzielone od siebie, ale pozostające w kontakcie fazy [45, 91].

Metabolity o charakterze fenolowym (OH-PCB) oddziela się od frakcji zawierającej PCB i $\text{MeSO}_2\text{-PCB}$ przez podział analitów pomiędzy dwie niemieszające się ze sobą fazy, tj. organiczną (heksan) i wodno-alkoholową (0,5 M r-r KCl w 50% etanolu). Następnie frakcję fenolową zakwasza się i izoluje OH-PCB mieszaniną heksanu i eteru tert-butylo-*metylowego*. Otrzymaną frakcję zawierającą hydroksylowe pochodne PCB poddaje się derywatywacji diazometanem w celu otrzymania mniej polarnych pochodnych metoksylo-*wych* (MeO-PCB), których ekstrakty można poddać dalszym procesom oczyszczania a następnie analizie chromatograficznej [209, 241].

Pozostałe w fazie organicznej związki o charakterze obojętnym (PCB i $\text{MeSO}_2\text{-PCB}$) rozdziela się bądź na drodze chromatografii adsorpcyjnej (z użyciem kolumn wypełnionych tlenkiem glinu, żelem krzemionkowym i/lub Florisilem) bądź przez wymieszanie z bezwodnym dimetylosulfotlenkiem (DMSO) lub stężonym H_2SO_4 lub acetonitrylem i zebranie fazy organicznej zawierającej PCB. Do frakcji $\text{MeSO}_2\text{-PCB}$ w bardziej polarnym rozpuszczalniku dodaje się wody oczyszczonej i wyodrębnia metylosulfonowe pochodne ekstrahując niepolarnym rozpuszczalnikiem organicznym (heskanem) pozostały w próbówce r-r wodny [45, 108, 241, 257, 260, 268-270].

2.4. Metody oczyszczania ekstraktów

Pierwotne ekstrakty próbek biologicznych, obok PCB i ich metabolitów, zawierają wiele substancji przeszkadzających, współwyodrębnionych z matryc rozpuszczalnikami organicznymi. Do zanieczyszczeń występujących praktycznie we wszystkich typach ekstraktów zaliczyć należy m.in. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), pestycydy, dioksyny i furany. W przypadku matryc biologicznych do związków interferujących podczas oznaczania należy zaliczyć głównie lipidy, które mogą uszkodzić powierzchnię aktywną oraz zmniejszyć zdolność rozdzielczą kolumn GC [258, 271].

Oczyszczanie ekstraktu, łącznie z usunięciem lipidów, można prowadzić jedno-, dwu-, lub wieloetapowo metodami destrukcyjnymi i/lub niestrukcyjnymi [7, 43, 45, 55, 100, 101, 241, 257, 260, 267]. Należy pamiętać, że niestety żadna z ww. technik nie pozwala na całkowite usunięcie zanieczyszczeń (zwłaszcza lipidów), a wieloetapowe oczyszczanie powoduje straty analitu i może doprowadzić do obniżenia jego poziomu poniżej granicy wykrywalności. W metodach destrukcyjnych stosuje się m. in. stężony H_2SO_4 [45, 55, 241] lub etanolowy roztwór KOH lub NaOH [269]. Do metod niestrukcyjnych oczyszczania ekstraktów należą m. in.:

- chromatografia adsorpcyjna, z wykorzystaniem kolumn klasycznych oraz SPE, wypełnionych żelem krzemionkowym, tlenkiem glinu lub Florisilem [7, 43, 100, 101, 241, 257, 260],
- preparatywne oddzielanie zanieczyszczeń techniką HPLC [43],
- chromatografia żelowa z wykorzystaniem sorbentu typu Bio-Beads SX3 [53, 210, 260].

Jednym z nowszych rozwiązań jest zastosowanie polietylenowych membran do dializy z wykorzystaniem heksanu jako rozpuszczalnika odbierającego. Pozwala ono w jednym etapie uzyskać ekstrakt praktycznie pozbawiony tłuszczu i innych zanieczyszczeń oraz uzyskać odzysk analitów na poziomie 60-95% [272, 273].

2.5. Identyfikacja i oznaczanie PCB w oczyszczonych ekstraktach

Końcowy etap procedury analitycznej oznaczania PCB i ich metabolitów, czyli analizę jakościową i ilościową oczyszczonych ekstraktów, wykonuje się najczęściej metodą

chromatografii gazowej (GC), rzadziej wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) czy elektroforezą kapilarną (CE) [20, 43, 86, 274, 275].

Zakres stosowalności GC jest określony głównie trwałością termiczną próbek i materiałów chromatograficznych. Jako górną granicę przyjmuje się 400 °C, co odpowiada masie molowej do 1000 Da (związki bardzo lotne i lotne). Próbkę do analizy z wykorzystaniem techniki GC musi być trwała w temperaturze niezbędnej do odparowania oznaczanych analitów [276]. Związki które nie spełniają tego warunku są rozdzielane i oznaczane z wykorzystaniem technik HPLC i CE [275].

Do końca lat osiemdziesiątych i na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku analizę GC przeprowadzano na kolumnach pakowanych. Obecnie postępowanie analityczne wykorzystywane w oznaczaniu PCB uległo zasadniczym zmianom, np. kolumny pakowane zamieniono na kapilarne, metody o niedokumentowanej dokładności i precyzji na metody zwalidowane, oznaczanie całkowitych PCB zastąpiono analizą specyficznych kongenerów [276, 277].

Efektywność rozdzielania poszczególnych kongenerów PCB i ich metabolitów w procesie chromatograficznym zależy m. in. od: sposobu wprowadzania próbki na kolumnę GC, rodzaju gazu nośnego, parametrów kolumny GC, typu fazy stacjonarnej [276].

W analizie PCB, MeO-PCB i MeSO₂-PCB, ekstrakt do kolumny GC wprowadzany jest najczęściej przez dozownik z podziałem strumienia gazu nośnego (*split-splitless*). W innej technice wykorzystywana jest ruchoma igła oraz wstępne odparowanie rozpuszczalnika bez podziału analitu (*on-column moving needle, splitless and solvent cut injection system*) [20, 43, 258, 276, 278]. Jako gaz nośny stosowany jest wodór lub hel. Praktycznie nie możliwe jest użycie azotu ze względu na znaczne obniżenie sprawności kolumny GC [276, 279].

Kolumny kapilarne stosowane w analizie PCB i ich metabolitów najczęściej mają długość 25-60 m, średnicę wewnętrzną 0,1-0,25 mm i grubość filmu 0,1-0,25 μm. W publikacji Cochran i Frame [279] dostępne są wyniki rozdzielania PCB na 42 fazach stacjonarnych o różnym stopniu polarności. Rozdzielanie analitów prowadzone jest najczęściej na kolumnach o słabo polarnej fazie 5% difenylu 95% dimetylosiloksanowej i jej odpowiednikach (kolumny DB-5, Rtx-5, ZB-5, CP Sil-8, SLB5 itd.) oraz na kolumnach typu DB-1 (100% dimetylopolisiloksan) [45, 55, 276]. Rozdzielanie PCB na tych kolumnach jest możliwe

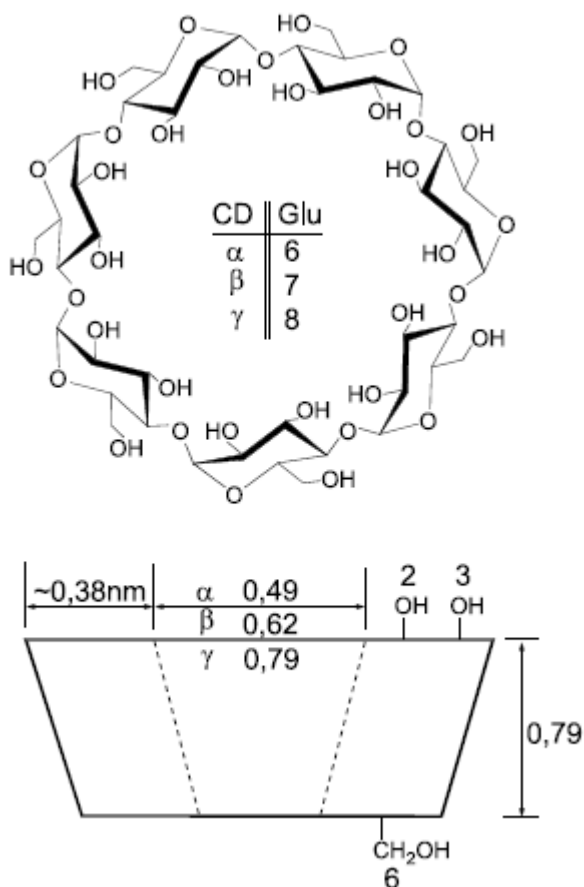
ze względu na ich stabilność termiczną (do 400 °C) [280]. Na ogół do potwierdzenia tożsamości PCB podczas zastosowania techniki GC-ECD wykorzystuje się dodatkowo drugą kolumnę o innej polarności np. DB-17 (50% metyl 50% fenylopolisiloksan), DB-XLB, Rtx-XLB (faza 12% fenylosiloksanowa) lub DB-1701, Rtx-1701, CP Sil-19 (14% cyjano-propylofenyl 86% dimetylopolisiloksan) [276, 277, 281, 282].

W procesie enancjoselektywnego rozdzielania PCB, MeO-PCB i MeSO₂-PCB stosuje się kolumny GC z fazą stacjonarną zawierającą tzw. selektor chiralny, który wchodzi w interakcje z enancjomerami analitu, zmieniając w ten sposób szybkość ich migracji [20, 43, 86, 275]. Do rozdzielania atropoizomerów PCB, jako selektory chiralne, wykorzystuje się podstawione cyklodekstryny (CD) i ich pochodne.

Cyklodekstryny są cyklicznymi oligosacharydami o budowie pierścieniowej (kształt torusa), złożonymi z 6-8 jednostek D(+)-glukozy (α -, β -, γ -CD) połączonych wiązaniami α -1,4, często podstawionymi grupami metylowymi, etylowymi, propylowymi, karboksymetylowymi, hydroksypropylowymi lub sulfonowymi. Cząsteczka cyklodekstryny posiada strukturę przypominającą wydrążony stożek ścięty, którego przestrzeń wewnętrzna ma charakter hydrofobowy, natomiast na zewnątrz cząsteczki znajdują się grupy hydrofilowe. Do środka stożka skierowane są II rzędowe grupy hydroksylowe (przy węglach C₂ i C₃) oraz atomy tlenu, tworzące eterowe wiązania cząsteczek glukozy. Na zewnątrz stożka zlokalizowane są I rzędowe grupy hydroksylowe (przy węglu C₆ glukozy), nadające właściwości hydrofilowe zewnętrznej powierzchni cząsteczki (ryc. 9) [79, 278]. Grupy hydroksylowe (w pozycjach 2, 3 i 6) można poddać estryfikacji lub eteryfikacji i uzyskać w ten sposób pochodne o różnej selektywności kompleksowania analitów i zwiększonej trwałości termicznej [89, 278, 283]. Zwiększenie stabilności termicznej można osiągnąć przez rozpuszczenie cyklodekstryn w konwencjonalnej, achiralnej fazie stacjonarnej (np. OV-1701) lub przez chemiczne związanie CD z fazą polisiloksanową [283].

Enancjoselektywne rozdzielanie chromatograficzne związane jest z różnicą powinowactwa atropoizomerów do wnętrza selektora chiralnego, a utworzone połączenia mają charakter kompleksów powstałych bez udziału wiązań chemicznych. Anality są wiązane siłami van der Waalsa, przy udziale oddziaływań elektrostatycznych dipol-dipol, fizycznych sił dyspersji oraz wiązań wodorowych. Proces ten jest kontrolowany entalpią powstałego układu, dlatego zdolność rozdzielcza kolumn z CD jest odwrotnie proporcjonalna do wzrostu

temperatury w piecu GC, co skutkuje długimi czasami analizy chromatograficznej [20, 259, 283].



Rycina 9. Model strukturalny i przestrzenny cyklodekstryn [275].

Wg danych z piśmiennictwa [20, 23, 42, 83, 86, 99, 105, 106], spośród komercyjnie dostępnych kolumn GC z wypełnieniem chiralnym, w analityce atropoizomerów PCB najczęściej stosuje się kolumnę Chirasil-Dex. W odróżnieniu od innych kolumn pozwala ona na rozdzielanie większości atropoizomerów analizowanych w ekstraktach próbek biologicznych (tj. PCB 84, 91, 95, 132, 136, 149, 174 i 176) i charakteryzuje się zwiększoną stabilnością termiczną oraz niskim wyciekem fazy stacjonarnej [20]. W mniejszym stopniu wykorzystywane są również kolumny B-PA Chiraldex, B-DM Chiraldex, Cyclosil-B oraz BGB-172 [20, 86, 105, 278]. Zastosowanie komercyjnych kolumn GC do rozdzielania enancjomerów metabolitów metoksylowych i metylosulfonowych PCB jest ograniczone ze względu na bardzo długi czas analizy i niestabilność chiralnych faz stacjonarnych w podwyższonej temperaturze (> 250 °C) [43, 86, 89, 91]. Zadowalające wyniki rozdzielania atropoizomerów MeSO₂-PCB uzyskał König i wsp. [49, 53] na własnoręcznie przygotowanej 10 m kolumnie GC pokrytej mieszaniną heptakis (2,3-di-O-metylo-6-O-*tert*-heksylo)- β -CD i fazy OV-1701 (1:1).

Wprowadzie na fazie 5% difenylo 1% winylodimetylosiloksanowej (kolumna SE-54) znane są czasy retencji 209 kongenerów PCB, jednak praktycznie nie istnieje żadna pojedyncza kolumna pozwalająca na rozdzielenie wszystkich kongenerów [279]. Wyeliminowanie problemu koelucji PCB i ich metabolitów na chromatogramach ekstraktów próbek biologicznych umożliwia technika wielowymiarowej chromatografii gazowej (MDGC, ang. *Multidimensional Gas Chromatography*), w której używa się dwóch kolumn [32, 105]. W przypadku tej techniki anality opuszczające pierwszą, słabo polarną kolumnę, są eluowane w sposób ciągły, a następnie strumień gazu nośnego okresowo jest dozowany do drugiej kolumny o większej polarności bądź z selektorem chiralnym. Proces ten można powtarzać wielokrotnie podczas analizowania jednej próbki [20, 86].

Spośród wielu typów detekcji największą rolę odgrywają: detektory wychwytu elektronów (ECD) i spektrometrii mas (MS, MS/MS, HRMS). Klasyczny system GC-ECD cechuje się dużą czułością oraz selektywnością w odniesieniu do chloroorganicznych TZO, co umożliwia uzyskanie dokładnych i precyzyjnych wyników. Wymaga to jednak wieloetapowego, starannego oczyszczenia ekstraktów oraz konieczności posiadania dużej gamy wzorców [276, 284]. Lepszą możliwość identyfikacji i oznaczania śladowych ilości związków organicznych, w złożonych mieszaninach, umożliwia połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS). Nowoczesne spektrometry mas (MS/MS, HRMS) charakteryzują się wyższą czułością niż ECD i stwarzają większe możliwości identyfikacyjne [102, 116, 203]. Po rozdzieleniu na kolumnie chromatograficznej, pojedyncze składniki wprowadzane są do spektrometru mas w celu identyfikacji. Dodatkową informację o strukturze analizowanej substancji uzyskuje się dzięki interpretacji widma mas. Widmo można wykonać w trybie full-scan lub w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM, ang. *selected ion monitoring*) [43, 214, 276, 282]. Ten ostatni sposób akwizycji danych pozwala na znaczne polepszenie czułości oraz wykrywalności poszczególnych kongenerów.

Warunkiem identyfikacji poszczególnego związku na chromatogramie jest zgodność jego czasu retencji (RT) z czasem retencji substancji wzorcowej. Ponadto do identyfikacji analitów na chromatogramach wykorzystuje się względne czasy retencji (RRT), indeksy retencji oraz dodatkowo widma mas (GC-MS). RRT to czas retencji analitu odniesiony do czasu retencji jednej lub kilku substancji wzorcowych. Jako wzorce wewnętrzne w analizie GC polichlorowanych bifenyli i ich metabolitów najczęściej wykorzystywane są te kongenery PCB, które nie występują w próbkach środowiskowych m. in. PCB 30, 204 i 209 [276, 284].

Zawartość analitów w ekstraktach oznacza się, porównując powierzchnię lub wysokość pików na chromatogramach roztworów wzorcowych i analizowanych ekstraktów, w obrębie zakresu liniowej odpowiedzi detektora. W celu uzyskania rzetelnego wyniku do oznaczania PCB i ich metabolitów stosuje się wzorce wewnętrzne i wzorce odzysku [55, 241, 284]. Rola wzorców odzysku i wzorców wewnętrznych polega na korekcji błędu spowodowanego stratą analitu podczas przygotowania próbki do analizy oraz błędów systematycznych lub przypadkowych popełnianych podczas procedury analitycznej.

3. Techniki chemometryczne w badaniach analitycznych

Wraz z rozwojem technik analitycznych poszukuje się metod analizy danych pochodzących z różnorodnych procesów technologicznych bądź też z eksperymentów naukowych. Jako pierwsze w praktyce analitycznej znalazły zastosowanie metody statystyki matematycznej. Podejście statystyczne wymaga jednak posiadania dużej liczby wyników pomiarów charakteryzujących się określonym rozkładem a ponadto umożliwia analizowanie jedynie pojedynczych zmiennych. Stosunkowo szybko stało się oczywiste, że analiza większości problemów praktycznych musi opierać się na podejściu wielowymiarowym, gdyż procesy zachodzące w realnym świecie są zjawiskami złożonymi, które można opisać korzystając jedynie z zależności występujących pomiędzy zmiennymi. Dlatego w latach trzydziestych XX w. podjęto wysiłki zmierzające do opracowania metod jednoczesnej analizy wielowymiarowych zbiorów danych. Powstały w ten sposób załączki chemometrii. Wraz z rozwojem technik chemometrycznych okazało się, że właśnie one mogą być przydatnym narzędziem do analizy danych wielowymiarowych. W połowie lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia chemometria została uznana za jedną z gałęzi chemii. Nie może ona być jednak traktowana jako pojedyncze narzędzie służące do analizy wyników, lecz jako szereg uporządkowanych i zaplanowanych procedur, które należy wykonać, aby uzyskać możliwie pełne informacje o obiekcie badań. Chemometria jest dziedziną nauki, wykorzystującą matematykę, rachunek prawdopodobieństwa, statystykę, informatykę oraz teorię podejmowania decyzji do optymalizacji doświadczeń oraz uzyskiwania maksimum użytecznej informacji z wielowymiarowych danych pomiarowych [285-287].

Zakres zastosowania chemometrycznych technik opracowywania wyników powiększa się z roku na rok, a doniesienia w literaturze światowej wskazują, że wiele problemów można efektywnie rozwiązać jedynie stosując techniki analizy chemometrycznej od momentu

planowania eksperymentu aż do etapu końcowego opracowania danych eksperymentalnych.

Do przykładowych zastosowań tych technik należą:

- optymalizacja procedur analitycznych (kalibracja, optymalizacja parametrów retencji, analiza widm) [287],
- monitoring środowiska (analiza zmian poziomu stężeń analitów w czasie, identyfikacja źródeł zanieczyszczeń, wyjaśnienie zależności pomiędzy grupami analitów) [288],
- analityka przemysłowa (kontrola przebiegu procesu i jakości produktów) [286],
- projektowanie nowych leków [285].

W technikach chemometrycznych stosuje się szereg uporządkowanych i zaplanowanych działań, które pozwalają uzyskać możliwie pełne informacje o obiekcie badań. Po wykonaniu eksperymentów następuje etap gromadzenia i wstępnej obróbki danych do analizy statystycznej. W większości przypadków analiza danych polega na poszukiwaniu zależności pomiędzy mierzonymi parametrami opisującymi badany obiekt lub zjawisko. Rozpoczyna się ona od poszukiwania zmiennych, pomiędzy którymi występują najsilniejsze zależności. Procedury te opierają się na podejściu wielowymiarowym, opisującym złożone zjawiska z zależności występujących pomiędzy zmiennymi [287]. Interpretacja dużych zbiorów danych pomiarowych niejednokrotnie wymaga przekształcenia skorelowanych zmiennych pierwotnych w nowe, wzajemnie nieskorelowane (ortogonalne) zmienne zwane czynnikami. Praktycznie cała informacja o analizowanych obiektach skupionych w wielowymiarowym zbiorze danych eksperymentalnych zawiera się w zasadzie w zaledwie kilku, nieskorelowanych ze sobą czynnikach [26, 31, 74, 154, 166, 287, 289-291].

Wraz ze wzrostem poziomu komputeryzacji aparatury badawczej techniki pomiarowe dostarczają coraz większych zbiorów wyników w coraz krótszym czasie. Jednakże forma tych danych powoduje, że nie zawsze są w pełni wykorzystywane jako źródło informacji. Nowoczesne wielowymiarowe techniki pozwalają na jednoczesne opracowanie praktycznie nieograniczonej ilości zmiennych (np. parametrów chromatograficznych i fizykochemicznych) [287]. Do obliczeń wykorzystuje się profesjonalne programy komputerowe (np. Statistica, Statgraphics czy Matlab), które umożliwiają wykonanie analizy statystycznej danych doświadczalnych oraz znalezienie korelacji lub innych zależności pomiędzy różnymi zmiennymi oraz graficzne przedstawienie wyników [285-288].

Najczęściej stosowanymi technikami chemometrycznymi w analizie próbek środowiskowych i biologicznych, zawierających PCB, są: analiza głównych składowych (ang. *Principal Component Analysis* - PCA), analiza czynnikowa, (ang. *Factor Analysis* - FA), analiza skupień (ang. *Cluster Analysis* - CA), analiza dyskryminacyjna (ang. *Discriminant Analysis* - DA), analiza członów końcowych (ang. *End Members Analysis* - EMA), czy też sieci neuronowe (ang. *Artificial Neuron Networks* - ANN), itp. [31, 40, 68, 137, 154, 285-288, 290-292]. W tabeli 8 przedstawiono najważniejsze techniki chemometryczne służące do analizy danych wielowymiarowych.

Tabela 8. Wybrane techniki chemometryczne służące do analizy danych wielowymiarowych [286].

Nazwa techniki	Przykładowe zadanie
<p>Technika rozpoznawania obrazów bez nauczyciela – analiza podobieństwa (ang. <i>Unsupervised pattern recognition</i>):</p> <ul style="list-style-type: none"> analiza skupień (CA), metody wizualizacji metod (ang. <i>Display methods</i>): mapy liniowe i nieliniowe, grafy najmniejszych odległości, analiza czynników głównych. 	Wykrywanie struktur podobieństwa pomiędzy zmiennymi lub obiektami w zbiorach danych.
<p>Technika rozpoznawania obrazów z nauczycielem – klasyfikacja (ang. <i>Supervised pattern recognition</i>)</p>	Znajdowanie reguł klasyfikacji obiektów (próbek).
<p>Techniki czynnikowe:</p> <ul style="list-style-type: none"> analiza czynnikowa (FA), analiza głównych składowych (PCA), kanoniczna analiza korelacji, cząstkowa metoda najmniejszych kwadratów (ang. <i>Partial Least Squares</i> – PLS). 	Poszukiwanie czynników, które umożliwiają zmniejszenie wymiarowości układów bez istotnej straty informacji zawartych w danych oraz takich, którym można nadać interpretację chemiczną, fizyczną bądź biologiczną.
<p>Korelacja i analiza regresji</p> <ul style="list-style-type: none"> ze znanymi zmiennymi, z ukrytymi zmiennymi (PCA i regresja PLS). 	Jakościowy opis zależności pomiędzy zmiennymi.
Analiza szeregów czasowych	Statystyczna analiza zależności pomiędzy kolejnymi obserwacjami, predykcja (prognozowanie) przyszłych wartości szeregu czasowego, wykrywanie mechanizmów rządzących zmianami obserwowanego zjawiska w czasie, czyli określenie natury zjawiska reprezentowanego przez sekwencję obserwacji.
Sztuczne sieci neuronowe	Prognozowanie, aproksymacja w przestrzeni, klasyfikacja obiektów, filtrowanie sygnałów, kompresja dźwięku i obrazu, sterowanie układami dynamicznymi.
Wielowymiarowa analiza wariancji (MANOVA) i analiza wykluczania	Wpływ czynników jakościowych na wartość średnią serii pomiarów.

3.1. Analiza wariancji

Jedną z najczęściej stosowanych metod statystycznych jest analiza wariancji (ang. *Analysis of Variance* - ANOVA). Technika ta służy do badania obserwacji, które zależą od jednego lub wielu działających równocześnie czynników. ANOVA stosowana jest w celu wykrycia możliwego wpływu czynników zewnętrznych na wartość mierzoną w próbie oraz wyjaśnienia z jakim prawdopodobieństwem wyodrębnione czynniki mogą być powodem różnic pomiędzy obserwowanymi średnimi grupowymi [286, 287]. Zatem ANOVA jest metodą statystyczną pozwalającą na podział zmienności zaobserwowanych wśród danych eksperymentalnych na części, z których każdą można przypisać znanemu źródłu.

Wyróżnia się analizę wariancji:

- jednoczynnikową, jeżeli na wartość mierzoną ma wpływ tylko jeden czynnik,
- wieloczynnikową, gdy występuje przypadek jednoczesnej zależności od większej liczby czynników zewnętrznych.

Analizę wariancji w wersji najprostszej stosuje się do badania istotności różnic między średnimi w różnych populacjach. Zagadnienie badania istotności różnic między średnimi pojawia się w eksperymentach zaplanowanych do badania zmiennej zależnej w porównaniu ze zmiennością zmiennej niezależnej [286].

W przypadku stosowania wieloczynnikowej analizy wariancji za istotne źródło zmienności, obok zmienności wewnątrzgrupowej i międzygrupowej, uznana jest interakcja, czyli oddziaływanie łączne obu czynników. Określa ona w jakim stopniu wpływ jednego czynnika zależy od poziomu drugiego. Jeżeli wpływ ten jest stały, to nie ma żadnej interakcji. Możliwość wykrywania istotnych efektów współdziałania czynników klasyfikujących i w związku z tym testowania bardziej złożonych hipotez czyni z analizy wariancji bardzo uniwersalne narzędzie. Interakcje pomiędzy poziomami czynników można wykryć tylko wtedy, gdy dysponuje się danymi reprezentującymi kilkukrotne powtórzenia dla każdej kombinacji czynników [287].

3.2. Analiza czynnikowa

Terminem „analiza czynnikowa” określa się grupę technik, które powszechnie stosuje się do analizy wielowymiarowych zbiorów wyników. Ich główna zaleta, to możliwość

transformacji danych w sposób, który ogranicza wielowymiarowość układu, a powstałe czynniki są wzajemnie nieskorelowane (ortogonalne). Główne zastosowania czynnikowych technik analitycznych to: redukcja liczby zmiennych oraz wykrywanie struktury w związkach między zmiennymi, to znaczy klasyfikacja zmiennych. W związku z powyższym analiza czynnikowa jest stosowana jako metoda redukcji danych lub wykrywania ich struktury [287].

W praktyce zastosowanie analizy czynników przynosi najlepsze efekty, gdy zmienne w danych „surowych” są wzajemnie silnie skorelowane. W obrębie analizy czynnikowej najczęściej stosuje się technikę zwaną analizą głównych składowych (PCA). Głównym zadaniem analizy z wykorzystaniem techniki PCA jest wykrycie wewnętrznej struktury danych i opisanie jej przy pomocy „utajonych”, abstrakcyjnych parametrów (składowych głównych), które z tej struktury wynikają. Czynniki te konstruuje się jako kombinację liniową zmiennych wyjściowych w taki sposób, aby każda kolejna składowa opisywała maksymalną wariancję danych i była ortogonalna do poprzedniej. Jeżeli między rozważanymi zmiennymi wyjściowymi istnieją istotne korelacje, wówczas liczba składowych głównych, niezbędna do poprawnego opisu danych, jest znacznie mniejsza niż liczba zmiennych wyjściowych [285-287].

Technika PCA prowadzi do stworzenia „nowych” wymiarów danych pomiarowych i umożliwia analizę mniejszej liczby czynników niezależnych lub składowych głównych opisujących informacje zawarte w systemie charakterystycznych, lecz częściowo zależnych zmiennych [285]. Zadaniem techniki PCA i FA jest znalezienie kilku składowych lub czynników, które wyjaśniają większe zróżnicowania w macierzy danych [137, 154, 166, 290]. Każda składowa lub czynnik (odpowiednio dla technik PCA i FA) jest ważoną kombinacją liniową zmiennych pierwotnych. Najbardziej pożądane jest branie pod uwagę tylko tych składowych lub czynników, których wartości własne są większe od jedności. Ładunki czynnikowe kwantyfikują udział poszczególnych zmiennych w odpowiednich czynnikach. Głównym krytycznym zarzutem w stosunku do techniki PCA są trudności w interpretacji głównych składowych, ponieważ czasami brak jest informacji na temat ich znaczenia - czy to w sensie fizycznym, czy też chemicznym. Ponadto wobec redukcji wszystkich zmiennych pierwotnych do zaledwie kilku czynników, względnie mała liczba składowych zostaje użyta do opisu znaczącej części całkowitej zmienności. Dlatego też część informacji jest pomijana. Jednakże, opierając się na danych literaturowych, można stwierdzić, że możliwe jest także

uwzględnienie niewyjaśnionej zmienności, co w rezultacie prowadzi do zwiększenia niezawodności takiego podejścia [31, 40, 137, 154, 288].

3.3. Analiza skupień

Podstawowym problemem w interpretacji dużych zbiorów danych eksperymentalnych jest określenie ich struktury. Jednym z rozwiązań tego problemu jest znalezienie zbiorów (podzbiorów) w całym obszarze danych, które grupują podobne do siebie obiekty. Zbiory te określa się mianem skupień lub klastrów. Obiekty jednego skupienia powinny być jednorodne w stosunku do pewnych charakterystycznych cech, wyjaśniających właściwości tego skupienia. Powinny one być także wyraźnie odrębne od innych zgrupowań [288, 293].

Proces poszukiwania skupień (analiza skupień, CA) ma na celu określenie „naturalnej” struktury zbioru tak, aby w poszczególnych klastrach znalazły się obiekty najbardziej do siebie podobne. Jednym z najważniejszych problemów jest zdefiniowanie kryteriów podziału całego zbioru danych na skupienia i wyznaczenie granicy pomiędzy nimi. Ze względu na te trudności w literaturze zaproponowano kilka różnych algorytmów klasyfikacji [286]. Techniki z tego zakresu dzielą się zasadniczo na dwie kategorie: metody hierarchiczne i niehierarchiczne. Wspólną cechą wszystkich metod jest porównywanie podobieństwa pomiędzy obiektami wewnątrz skupień z podobieństwem pomiędzy skupieniami. Innymi słowy, analiza skupień jest narzędziem do eksploracyjnej analizy danych, której celem jest ułożenie obiektów w grupy w taki sposób, aby stopień powiązania obiektów z obiektami należącymi do tej samej grupy był jak największy, a z obiektami z pozostałych grup jak najmniejszy [286, 294].

Podsumowując, zasadniczymi i głównymi celami analizy skupień są [288, 293]:

- zdefiniowanie miary podobieństwa pomiędzy obiektami i skupieniami oraz przyjęcie metody tworzenia skupień,
- znalezienie skupień w zbiorze i przypisanie do nich obiektów,
- sprawdzenie czy skupienia częściowo się pokrywają,
- stwierdzenie czy istnieje hierarchiczna zależność pomiędzy skupieniami,
- identyfikacja próbek nietypowych (odbiegających).

3.3. Analiza funkcji dyskryminacyjnej

Analiza dyskryminacyjna (DA) jest stosowana do rozstrzygnięcia, które zmienne pozwalają w najlepszy sposób dzielić dany zbiór przypadków na grupy. Główna idea leżąca u podstaw analizy funkcji dyskryminacyjnej to rozstrzygnięcie, czy grupy różnią się ze względu na średnią pewnej zmiennej, a następnie wykorzystanie tej zmiennej do przewidywania przynależności do grupy. Z rachunkowego punktu widzenia analiza funkcji dyskryminacyjnej jest bardzo podobna do analizy wariancji (ANOVA). Zawiera metody, które czynią z tej techniki niezwykle efektywne narzędzie do zagadnień klasyfikacyjnych i technik eksploracji danych. Jej zadaniem jest rozstrzygnięcie, które zmienne w najlepszy sposób dzielą dany zbiór przypadków na występujące w naturalny sposób grupy. Pozwala rozstrzygnąć, czy grupy różnią się ze względu na średnią pewnej zmiennej, oraz wykorzystanie tej zmiennej do przewidywania przynależności do danej grupy [285, 287, 288].

W metodzie tej możemy wyróżnić dwa główne etapy [288]:

- etap uczenia/budowy modelu – w którym znajdujemy reguły klasyfikacyjne w oparciu o tak zwany zbiór uczący (próbę statystyczną),
- etap klasyfikacji/wykorzystania modelu – w którym dokonujemy klasyfikacji zasadniczego zbioru obiektów, których przynależność jest nam nieznana w oparciu o znalezione charakterystyki klas.

Sposób przeprowadzania analizy w pakietach statystycznych najczęściej przebiega krokowo (postępująca lub wsteczna analiza krokowa). Pakiety oprócz licznych statystyk wykreślają też tak zwane funkcje klasyfikacyjne, które stanowią doskonałą ilustrację otrzymanych wyników. Postać tych funkcji może być dowolna, choć najczęściej wykorzystywane są funkcje liniowe (LDA). W tym podejściu opisowym obiekt przydzielany jest do tej klasy, dla której funkcja dyskryminacyjna osiąga największą wartość. Zaletą klasycznej analizy dyskryminacyjnej jest prostota jak i wysoka skuteczność na homogenicznych danych, wadą natomiast nieprzenośność i brak skuteczności na niehomogenicznych danych [286].

IV. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL PRACY

Opierając się na dostępnych wynikach badań **przyjęto hipotezę, że chiralne kongenery PCB mogą być substratem dla glikoproteiny-P**. Celem niniejszej pracy była weryfikacja tej hipotezy poprzez wykonanie badań aktywnego transportu *in vivo* w modelu zwierzęcym: na myszach FVB (typ dziki, ang. *wild-type* - WT) oraz myszach pozbawionych genów *mdr1a/b* (ang. *knockout mice* - KO). Polegały one na określeniu różnic w rozmieszczeniu wybranych, chiralnych kongenerów PCB w tkankach, organach i wydalinach myszy po jednorazowym podaniu ich mieszaniny *per os*.

Realizacja badań obejmowała następujące etapy:

1. Wybór chiralnych kongenerów PCB oraz opracowanie metodyki ekstrakcji i oznaczania wybranych chiralnych PCB w próbkach biologicznych.
2. Ustalenie, weryfikacja i przygotowanie mieszaniny wybranych PCB w roztworze olejowym do podania *per os* oraz dobór modelu zwierzęcego.
3. Oznaczenie poziomów PCB w wybranych tkankach, organach i wydalinach myszy doświadczalnych, którym uprzednio podano *per os* przygotowaną mieszaninę wybranych PCB.
4. Oznaczenie frakcji enancjomerycznej wybranych atropoizomerów PCB.
5. Analizę chemometryczną i statystyczną uzyskanych wyników.

V. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Odczynniki, wzorce i aparatura

Odczynniki, szkło, materiały i aparaturę stosowaną do:

- ekstrakcji tłuszczu, PCB i ich metabolitów z próbek biologicznych,
- rozdzielania ekstraktów na poszczególne frakcje,
- oczyszczania otrzymanych ekstraktów,

opisano w Standardowych Procedurach Operacyjnych (SOP) zawartych w Aneksie (pkt. 1-3 w dokumentach SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0).

1.1. Anality

3,5-dichlorobifenyl (PCB 14), 2,4,6-trichlorobifenyl (PCB 30), 2,3,5,6-tetrachlorobifenyl (PCB 65), 2,2',3,3',6-pentachlorobifenyl (PCB 84), 2,2',3,4',6-pentachlorobifenyl (PCB 91), 2,2',3,5',6-pentachlorobifenyl (PCB 95), 2,2',3,3',4,6'-heksachlorobifenyl (PCB 132), 2,2',3,4',5',6'-heksachlorobifenyl (PCB 149), 2,3,4,4',5,6-heksachlorobifenyl (PCB 166), 2,2',3,3',4,5,6'-heptachlorobifenyl (PCB 174), 2,2',3,3',4,6,6'-heptachlorobifenyl (PCB 176), 2,2',3,4,4',5',6'-heptachlorobifenyl (PCB 183), 2,2',3,4,4',5,6,6'-oktachlorobifenyl (PCB 204), 4-hydroksy-2',3,3',4',5,5'-heksachlorobifenyl (4-OH-PCB 159) and 3-methylsulfonylo-4-metylo-2',3',4',5,5'-pentachlorobifenyl (3-MeSO₂-4-Me-PCB 87) o czystości > 98 %, pozyskano z AccuStandard Inc. (New Haven, CT, USA). 2,2',3,3',6,6'-heksachlorobifenyl (PCB 136) został otrzymany na drodze syntezy opisanej w [26, 295] a jego czystość wynosiła > 99% (oznaczona metodą GC-FID w oparciu o względną powierzchnię piku na chromatogramach).

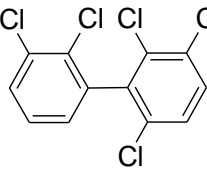
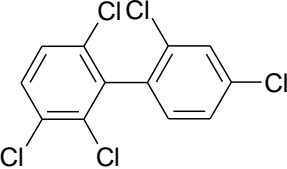
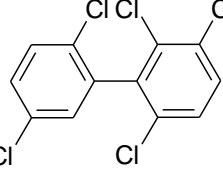
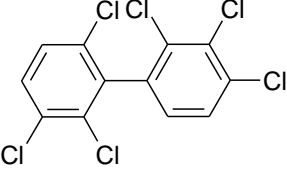
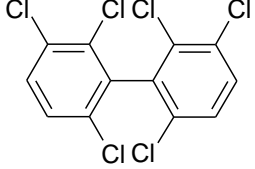
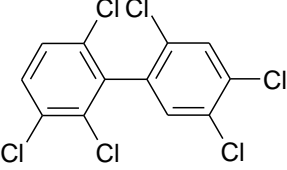
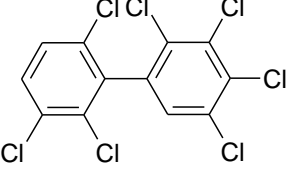
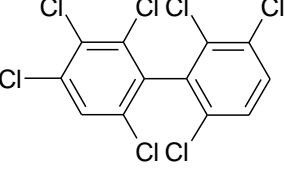
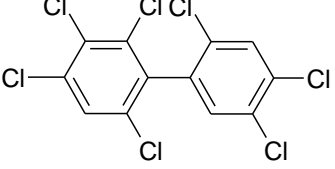
1.2. Roztwory wzorcowe chiralnych PCB

Roztwór podstawowy 9 chiralnych PCB (84, 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183), sporządzono z odpowiednich odważek substancji wzorcowych (pkt. 1.1.) rozpuszczając je w izooktanie (100 ml).

Roztwór roboczy (100 ml) przygotowano przez dziesięciokrotne rozcieńczenie roztworu podstawowego izooktanem.

Skład mieszaniny PCB oraz stężenia poszczególnych kongenerów w izooktanowych roztworach wzorcowych (podstawowym i roboczym) przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Stężenia chiralnych kongenerów PCB w roztworach wzorcowych.

Nazwa chemiczna	Kongener	Wzór strukturalny	Stężenie PCB [ng/ml]	
			Roztwór podstawowy	Roztwór roboczy
2,2',3,3',6-pentachlorobifenyl	PCB 84		997	99,7
2,2',3,4',6-pentachlorobifenyl	PCB 91		997	99,7
2,2',3,5',6-pentachlorobifenyl	PCB 95		1000	100
2,2',3,3',4,6'-heksachlorobifenyl	PCB 132		996	99,6
2,2',3,3',6,6'-heksachlorobifenyl	PCB 136		1020	102
2,2',3,4',5',6'-heksachlorobifenyl	PCB 149		986	98,6
2,2',3,3',4,5,6'-heptachlorobifenyl	PCB 174		998	99,8
2,2',3,3',4,6,6'-heptachlorobifenyl	PCB 176		1028	102,8
2,2',3,4,4',5',6,-heptachlorobifenyl	PCB 183		1000	100

1.3. Wzorce odzysku metody oznaczania PCB w matrycach biologicznych

Roztwory:

- izooktanowy - PCB 14, 65, 166 (stężenie każdego z kongenerów = 1,0 µg/ml),
- metanolowy - 4-OH-PCB 159 (1,37 µg/ml),
- izooktanowy - 3-MeSO₂-4-Me-PCB 87 (0,4 µg/ml),

przygotowano z odpowiednich odważek substancji wzorcowych (pkt. 1.1.), rozpuszczając je w odpowiednim rozpuszczalniku.

1.4. Wzorce wewnętrzne (chromatograficzne)

Roztwór PCB 30 (0,25 µg/ml) + 204 (0,25 µg/ml) został przygotowany przez rozpuszczenie odważek tych substancji wzorcowych (pkt. 1.1.) w izooktanie.

1.5. Adsorbenty

1.5.1. Aktywowanie adsorbentów

Porcje adsorbentów, tj. ok. 100 g Florisilu (60-100 mesh, Fisher Scientific, cat no F100-3) i krzemionki koloidalnej (Silica Gel, 70-230 mesh, Fisher Scientific, cat no S826-1) aktywowano bezpośrednio przed użyciem w temp. = 450 °C przez 12 h, a następnie doprowadzono do temperatury pokojowej w eksykatorze.

1.5.1. Impregnowanie żelu krzemionkowego

Do 50 g wyprażonego i ostudzonego żelu krzemionkowego dodano 25 g stężonego kwasu siarkowego (98%) i wymieszano składniki, uzyskując żel krzemionkowy impregnowany stężonym kwasem siarkowym (2:1).

Przygotowane w ten sposób adsorbenty wykorzystano do oczyszczania ekstraktów próbek biologicznych zawierających PCB techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE).

1.6. Chromatograf gazowy

Analiza chromatograficzna GC roztworów wzorcowych oraz oczyszczonych ekstraktów zawierających PCB prowadzona była na chromatografie gazowym Agilent Technologies 6890N, udostępnionym w *Department of Occupational and Environmental Health* Uniwersytetu w Iowa City. Wyposażony był on w:

- komorę nastrzykową z dozownikiem dzielącym strumień gazu nośnego (*split-splitless*), z programowaną temperaturą i elektroniczną kontrolą ciśnienia gazu,
- automatyczny dozownik próbek (*autosampler*),
- strzykawkę do automatycznego dozowania próbek o pojemności 10 µl,
- kolumnę kapilarną,
- detektor µECD – źródło promieniowania ⁶³Ni,
- detektor spektrometrii mas (5975 MSD) z modułem jonizacji strumieniem elektronów (EI) oraz analizatorem kwadropolowym o zakresie mas 2-1050 amu i szybkością skanowania 12500 amu/s,
- pompę molekularną o wydajności 250 l/s,
- komputer HP z oprogramowaniem *MSD ChemStation software*.

1.6.1. Warunki analizy GC-µECD

1.6.1.1. Rozdzielanie chromatograficzne (GC)

- kolumna kapilarna (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) SLB-5MS (Supelco, St. Louis, MO, USA) z fazą o małej polarności (5%-fenylo-95%-metylosiloksanowa); program temperaturowy pieca: temp. początkowa = 120 °C (1 min), przyrost z prędkością 10 °C/min do 300 °C (5 min),
- kolumna kapilarna (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) CP-Chirasil-Dex CB (Varian, Palo Alto, CA, USA) z fazą dimetylopolisiloksanową z immobilizowanym selektorem chiralnym, tj.: permetylo-(2,3,6-tri-*O*-metylo)-β-cyklodekstryną; program temperaturowy pieca: temp. początkowa = 100 °C (0 min), przyrost z prędkością 2 °C/min do 150 °C (0 min), przyrost z prędkością 0,2 °C/min do 185 °C (0 min), przyrost z prędkością 15 °C/min do 200 °C (10 min),
- gaz nośny – hel o deklarowanej czystości 99,997%, oczyszczony na pochłaniaczu tlenu, wilgoci i węglowodorów, prędkość przepływu – w zależności od metody: 1,4 ml/min (SLB-5MS) lub 1ml/min (CP-Chirasil-Dex CB),
- automatyczny dozownik próbek:
 - objętość nastrzykiwanej próbki – w zależności od metody: 2 µl (SLB-5MS) lub 5 µl (CP-Chirasil-Dex CB),
 - liczba płukań strzykawki izooktanem przed nastrzyknięciem próbki – 2 razy,
 - liczba płukań strzykawki próbką przed jej nastrzyknięciem – 2 razy

- liczba wpompowań próbki do strzykawki przed nastrzyknięciem – 6 razy,
- liczba płukań strzykawki acetonem po nastrzyknięciu próbki – 2 razy,
- liczba płukań strzykawki izooktanem po nastrzyknięciu próbki – 2 razy,
- komora nastrzykowa:
 - temperatura – w zależności od metody: 280 °C (SLB-5MS) lub 250 °C (CP-Chirasil-Dex CB),
 - przepływ helu podczas opłukiwania membrany (*purge*) – w zależności od metody: 17,1 ml/min (SLB-5MS) lub 12,9 ml/min (CP-Chirasil-Dex CB),
 - sposób nastrzykiwana – bez dzielenia strumienia gazu nośnego (*splitless*), czas otwarcia dzielnika – w zależności od metody: 0,75 min (SLB-5MS) lub dzielnik zamknięty (CP-Chirasil-Dex CB).

1.6.1.2. Detekcja μ ECD

- temperatura detektora – w zależności od metody: 340 °C (SLB-5MS) lub 250 °C (CP-Chirasil-Dex CB),
- gaz przepływający przez detektor (*make-up*) - argon/metan (95:5), o deklarowanej czystości 99,998%, oczyszczony na pochłaniaczu tlenu, wilgoci i węglowodorów,
- przepływ mieszaniny argon/metan – w zależności od metody 30,0 ml/min (SLB-5MS) lub 60 ml/min (CP-Chirasil-Dex CB).

2. Materiał i metodyka badań

2.1. Zakres i miejsce prowadzenia badań

Doświadczenie na modelu zwierzęcym oraz oznaczenia analitów PCB w próbkach materiału biologicznego przeprowadzono w trakcie stażu naukowo-badawczego w *Department of Occupational and Environmental Health, University of Iowa, (Iowa City, IA, USA)*. Eksperyment na zwierzętach został poprzedzony adaptacją, modyfikacją i walidacją:

- metod ekstrakcji i izolacji analitów z materiału biologicznego,
- oczyszczania uzyskanych ekstraktów,
- chromatograficznych metod oznaczania analitów w ekstraktach próbek biologicznych.

Protokół badań i przeprowadzenie eksperymentu na zwierzętach doświadczalnych uzyskały zgodę *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the University of Iowa, Iowa City, IA, USA*.

Opracowanie wyników oraz analizę chemometryczną i statystyczną uzyskanych danych wykonano w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

2.2. Opracowanie i walidacja metod oznaczania PCB w matrycach biologicznych

2.2.1. Analiza chromatograficzna

Do analizy chromatograficznej roztworów wzorcowych i ekstraktów matryc biologicznych zawierających polichlorowane bifenyly wykorzystano chromatograf gazowy Agilent Technologies 6890N z mikrodetekтором wychwyty elektronów (μ ECD). Warunki pracy chromatografu ustalono w oparciu o dane literaturowe [26, 278, 296] oraz wcześniej wykonywane badania. Podstawowe parametry układu GC- μ ECD podczas analizy chromatograficznej ekstraktów opisano w rozdziale 1, pkt. 1.6.1.

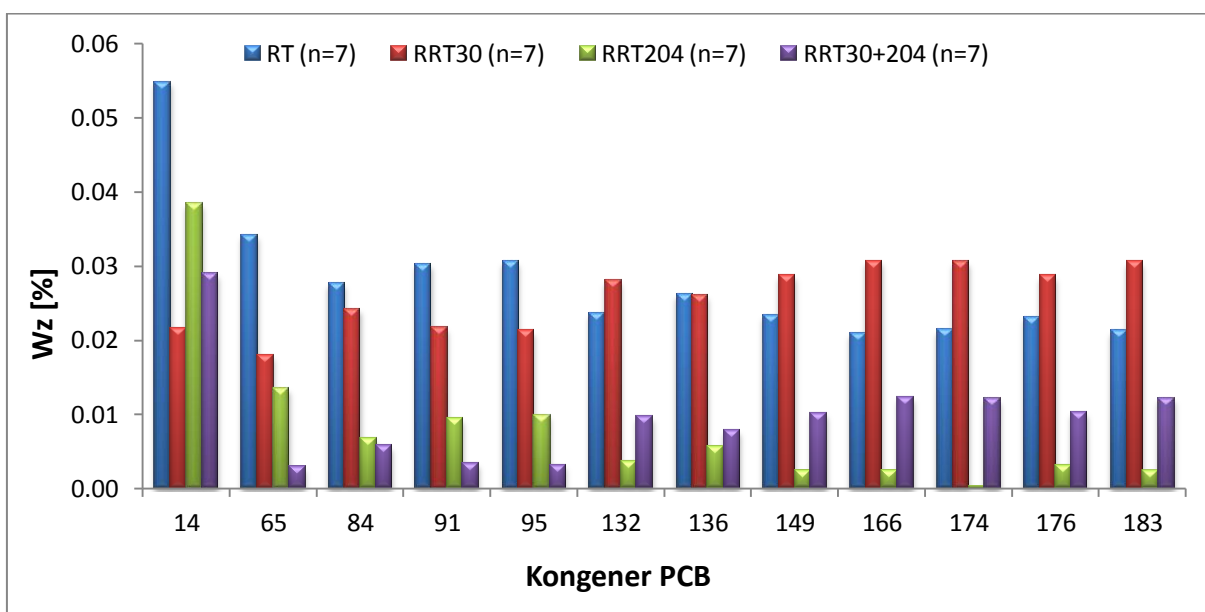
2.2.1.1. Ocena precyzji parametrów retencyjnych

Walidacji poddano parametry retencyjne pików poszczególnych analitów na chromatogramach GC- μ ECD 2 μ l mieszaniny roztworów wzorcowych: 1ml roztworu roboczego + 0,1 ml roztworu odzysku PCB + 0,1 ml roztworu wzorców wewnętrznych (tabela

9, pkt. 1.3. i pkt. 1.4.). Rozdzielanie analitów przeprowadzono na kolumnie SLB-5MS w warunkach opisanych w pkt. 1.6.1.

Analizie statystycznej poddano wartości czasów retencji (RT) oraz względnych czasów retencji (RRT_{30} , RRT_{204} i RRT_{30+204}) odpowiednio odczytanych lub obliczonych przez *ChemStation software*.

Jak wynika z danych przedstawionych na rycinie 10, obliczone wartości współczynników zmienności (Wz) wykazują zróżnicowanie w zależności od rodzaju parametru identyfikacyjnego, jednak we wszystkich analizowanych przypadkach nie przekraczają wartości 0,06%. Ponieważ dla większości kongenerów najlepszą powtarzalność stwierdzono w przypadku względnych czasów retencji analitów (RRT_{30+204}), obliczonych w odniesieniu do sumy czasów retencji PCB 30 i 204, właśnie ten parametr wykorzystano podczas identyfikacji analitów w oczyszczonych ekstraktach matryc biologicznych. Jako kongener zidentyfikowany uznano ten, którego RRT_{30+204} na chromatogramie ekstraktu nie różnił się więcej niż 0,0005 od RRT_{30+204} na chromatogramie roztworu wzorcowego danego PCB.

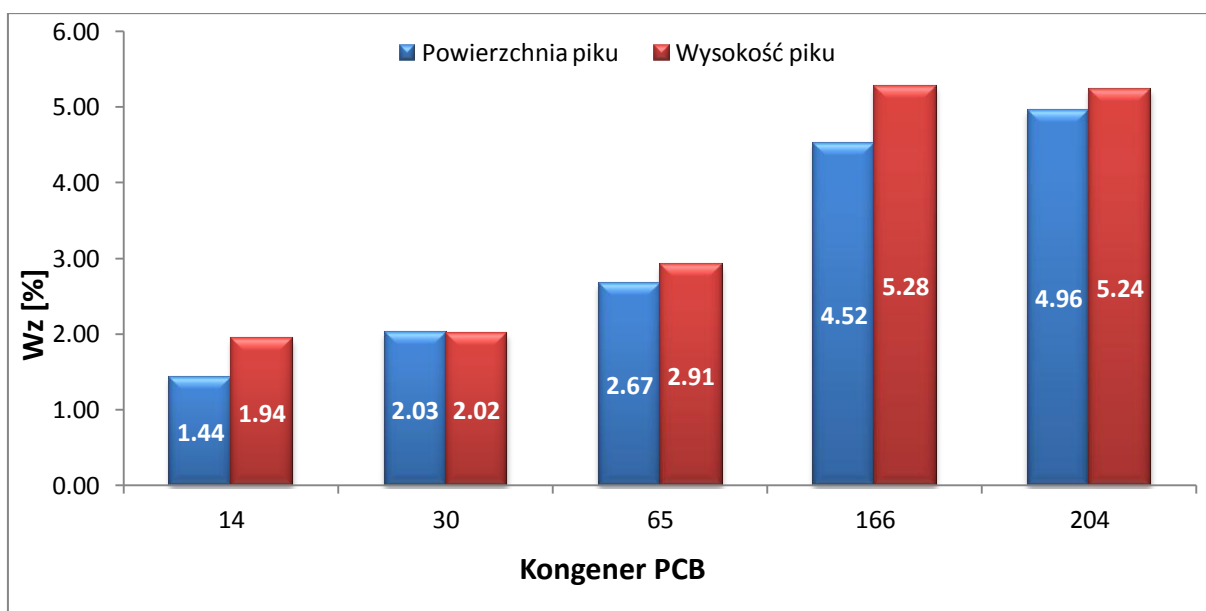


Rycina 10. Porównanie precyzji pomiarów parametrów retencyjnych wybranych PCB metodą GC- μ ECD (kolumna SLB-5MS) wykorzystywanych do identyfikacji analitów w ekstraktach matryc biologicznych.

2.2.1.2. Ocena precyzji parametrów ilościowych

Celem wyboru ilościowego parametru chromatograficznego, wykorzystanego do oznaczenia zawartości poszczególnych analitów w ekstraktach matryc biologicznych metodą wzorca wewnętrznego wg [284] (pkt. 2.4.5), porównano powtarzalność wysokości i pola powierzchni pików na chromatogramach uzyskanych po dziesięciokrotnym nastrzyknięciu na kolumnę SLB-5MS 2 μ l mieszaniny 1 ml izooktanu, 0,1 ml roztworu wzorca odzysku (PCB 14, 65 i 166, pkt. 1.3.) oraz 0,1 ml roztworu wzorców chromatograficznych (PCB 30 i 204, pkt. 1.4.). Analizę chromatograficzną GC- μ ECD prowadzono w warunkach opisanych w pkt. 1.6.1.

Przedstawione na rycinie 11 wartości Wz zarówno wysokości jak i powierzchni pików, mieszczą się w granicach od ok. 1,5% (powierzchnia piku PCB 14) do ok. 5,3% (wysokość piku PCB 166 i PCB 204). Mimo, że nie stwierdzono statystycznych różnic pomiędzy precyzją obu parametrów ilościowych, to ze względu na nieco lepszą powtarzalność powierzchni pików, właśnie ten parametr wykorzystano w obliczeniach zawartości poszczególnych analitów. Uzyskane wyniki potwierdziły sugestie niektórych autorów [55, 276, 284], że powierzchnia pików chromatograficznych może być z powodzeniem wykorzystana jako parametr ilościowy w oznaczeniach PCB techniką GC- μ ECD.



Rycina 11. Porównanie powtarzalności parametrów ilościowych pików chromatograficznych PCB, odczytanych przez ChemStation software.

2.2.1.3. Kalibracja detektora μ ECD

Krytycznym punktem w analizie ilościowej PCB techniką GC- μ ECD jest konieczność pracy w zakresie liniowej odpowiedzi detektora [284]. Celem określenia przedziału stężeń analitów, które mogą być oznaczone przy użyciu μ ECD, zbadano jego odpowiedź na wzrastające stężenia/iłości od ok. 1 do ok. 1000 ng/ml (pg) każdego z kongenerów (tabela 10) zawartych w 11 roztworach wzorcowych, przygotowanych przez kolejne rozcieńczenia roztworu podstawowego PCB (tabela 9). Rozdzielanie analitów przeprowadzono na kolumnie SLB-5MS w warunkach opisanych w pkt. 1.6.1. Dla każdego z poziomów stężeń PCB wykonano po 3 równoległe pomiary. Na podstawie uzyskanych wyników oznaczeń (wielkości pól powierzchni pików odpowiednich analitów) wykreślono krzywe kalibracyjne zależności wielkości powierzchni pików chromatograficznych od stężenia poszczególnych analitów w roztworach wzorcowych (tabela 10).

Tabela 10. Parametry krzywych kalibracyjnych detektora μ ECD.

Kongener PCB	Zakres stężeń [ng/ml]	$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	r
84	0,97-997	4235568 \pm 200943	39023654 \pm 10332606	0,9993
91	0,97-997	4831689 \pm 208072	50340197 \pm 11189212	0,9992
95	0,98-1000	5049620 \pm 209120	43320949 \pm 11869899	0,9994
132	0,97-996	4171010 \pm 222886	29518785 \pm 15155969	0,9993
136	1-1020	3457132 \pm 169173	32553731 \pm 10704091	0,9993
149	0,96-986	3561385 \pm 189991	27306875 \pm 11809893	0,9994
174	0,97-998	4292018 \pm 272570	25910092 \pm 18800617	0,9992
176	1-1028	2136186 \pm 126754	14799714 \pm 8880701	0,9994
183	0,98-1000	6859363 \pm 407080	63636590 \pm 26674394	0,9988

a – współczynnik kierunkowy krzywej regresji $y = ax + b$,
 Δa – odchylenie standardowe współczynnika kierunkowego,
b – wyraz wolny,
 Δb – odchylenie standardowe wyrazu wolnego,
r – współczynnik korelacji.

Obliczone wartości współczynników korelacji $r > 0,999$ (z wyjątkiem PCB 183) wskazują na liniowość odpowiedzi detektora μ ECD w zakresach stężeń analitów od ok. 1 do ok. 1000 ng/ml. Badanie istotności współczynników a i b równań wykazało, że w przypadku wszystkich kongenerów wartości współczynników a i b są istotnie różne od zera ($t > t_{\alpha, f}$ ($f=n-2$)).

2.2.1.4. Wyznaczenie granicy wykrywalności układu GC- μ ECD

W celu wyznaczenia granic wykrywalności stosowanego przyrządu pomiarowego Agilent Technologies 6890N dla poszczególnych PCB (IDL, ang. *Instrumental Detection Limit*) na kolumnę SLB-5MS sześciokrotnie nastrzyknięto po 1 μ l roztworów wzorcowych na 3 poziomach stężeń chiralnych kongenerów, w zakresie od 0,96 do 4,02 ng/ml (roztwory wzorcowe PCB uzyskano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu roboczego, opisanego w tabeli 9). Analizę chromatograficzną GC- μ ECD prowadzono w warunkach opisanych w pkt. 1.6.1. Na podstawie uzyskanych wyników oznaczeń (wielkości pól powierzchni pików odpowiednich analitów) metodą regresji liniowej wyznaczono zależności wiążące wielkości powierzchni pików chromatograficznych z wartościami stężeń poszczególnych analitów w roztworach wzorcowych. Następnie na podstawie obliczonych wartości odchylenia standardowego wyrazu wolnego (Δb) oraz współczynnika kierunkowego krzywej kalibracyjnej (a) dla poszczególnych analitów wyznaczono wartości IDL wg [297], zgodnie z zależnością $IDL = \frac{3,3 \times \Delta b}{a}$ (tabela 11).

Tabela 11. Granice wykrywalności (IDL) układu GC- μ ECD dla wybranych PCB.

Kongener PCB	Zakres stężeń [ng/ml]	Parametry krzywych kalibracyjnych oznaczania wybranych PCB					IDL [ng/ml] lub [pg]
		a	Δa	b	Δb	r	
84	0,97-3,89	6526154	241426	1320089	402393	0,9991	0,20
91	0,97-3,89	7741906	203539	920412	586731	0,9986	0,25
95	0,98-3,91	7759933	263305	1495730	611188	0,9992	0,26
132	0,97-3,89	5718794	265731	493088	567339	0,9992	0,33
136	1-3,98	5356323	252561	1635915	630724	0,9994	0,39
149	0,96-3,85	5180255	228438	1119651	562768	0,9977	0,36
174	0,97-3,90	5569606	338286	969208	616976	0,9976	0,37
176	1-4,02	2950883	172988	840981	261883	0,9977	0,29
183	0,98-3,91	9322849	509412	994694	429794	0,9991	0,15

a – współczynnik kierunkowy krzywej regresji $y = ax + b$,
 Δa – odchylenie standardowe współczynnika kierunkowego,
b – wyraz wolny,
 Δb – odchylenie standardowe wyrazu wolnego,
r – współczynnik korelacji.

Uzyskane wartości granic wykrywalności potwierdziły możliwość prowadzenia badań modelowych, związanych z doбором parametrów procesu izolacji analitów z próbek

materiału biologicznego i wykorzystaniem techniki ekstrakcji rozpuszczalnikami wspomaganą wytrząsaniem.

2.2.2. Metodyka przygotowania próbek do oznaczania PCB techniką GC- μ ECD

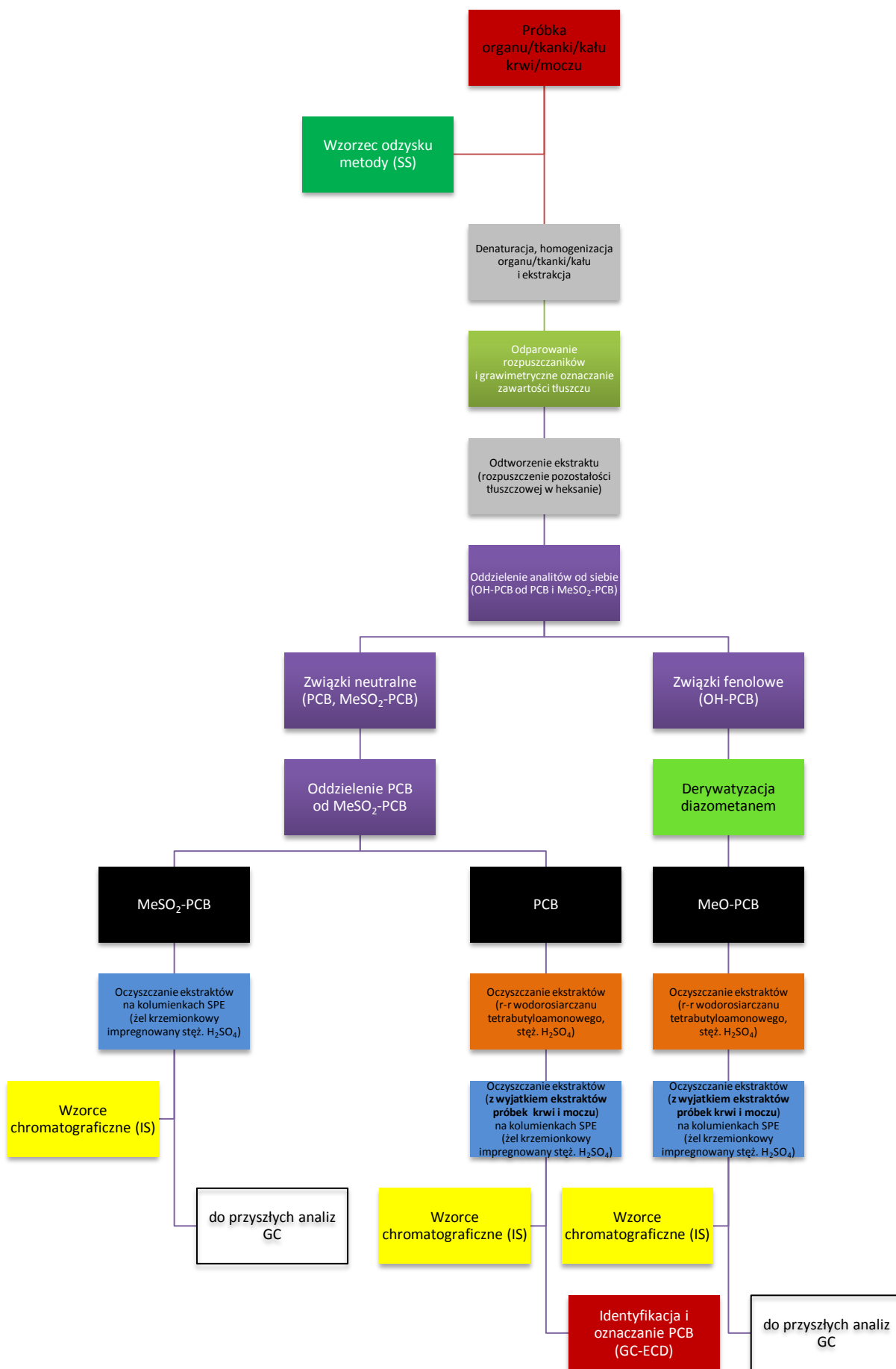
W celu opracowania własnych procedur przygotowania próbek materiału biologicznego do oznaczania wybranych PCB techniką GC- μ ECD wykorzystano:

- dane z piśmiennictwa [45, 55, 91, 241, 243],
- dostępne w laboratorium odczynniki, wzorce, sprzęt i procedury,
- doświadczenia zespołów badawczych w zakresie oznaczania PCB w takich matrycach jak: tkanki, organy, krew oraz wydaliny zwierzęce i/lub ludzkie [7, 8, 26, 31, 40, 74, 110, 111, 148].

Szczegółowy opis ostatecznych wersji Standardowych Procedur Operacyjnych (SOP), stosowanych w niniejszej pracy jako metody przygotowania próbek tkanek, organów i kału do oznaczania wybranych PCB techniką GC- μ ECD, przedstawiono w Aneksie:

- SOP_BM1_v2.0 (pkt. 6 - 17) – próbki tkanek, organów i kału,
- SOP_BM2_v2.0 9 (pkt. 6 - 15) – próbki krwi i moczu.

Schemat postępowania analitycznego zilustrowano na rycinie 12 i opisano w pkt. 2.4.



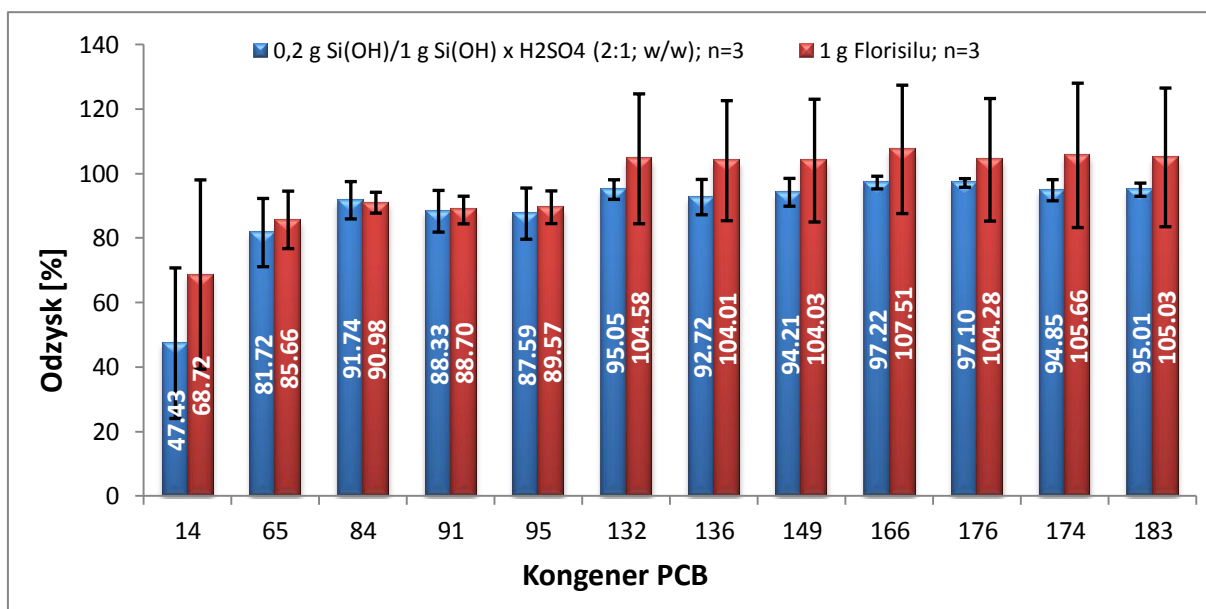
Rycina 12. Schemat postępowania analitycznego oznaczania chiralnych PCB w próbkach materiału biologicznego wg procedur SOP_BM1_v2.0 i SOP_BM2_v2.0.

2.2.2.1. Modyfikacja standardowych procedur operacyjnych (SOP)

Do przygotowania ekstraktów próbek biologicznych do analizy GC- μ ECD wykorzystano zmodyfikowane procedury wg Jensena i wsp. [243] (tkanki, organy) oraz Hovander i wsp. [45, 241] (krew, mocz) stosowane standardowo w laboratorium [55, 91].

2.2.2.1.1. Wybór adsorbentów stosowanych do oczyszczania ekstraktów zawierających PCB

Ocenie poddano odzysk 12 kongenerów PCB (14, 65, 84, 91, 95, 132, 136, 149, 166, 174, 176, 183) z adsorbentów używanych w procesie oczyszczania ekstraktów [45, 55, 241]. Na prekondycjonowane kolumnienki SPE wypełnione 1 g Florisilu (n=3) lub warstwą żelu krzemionkowego (0,2 g) i żelu krzemionkowego impregnowanego stężonym H_2SO_4 (2:1, 1 g) naniesiono 125 μ l roztworu roboczego PCB (tab. 9) i 125 μ l wzorców odzysku PCB (pkt. 1.3). Elucję analitów prowadzono 10 ml heksanu. Po odparowaniu eluatów, do odtworzonej w 1 ml izooktanu próbki dodano 100 μ l wzorców chromatograficznych (pkt. 1.4.). Zawartość poszczególnych PCB oznaczono metodą GC- μ ECD na kolumnie SLB-5MS w warunkach opisanych w punkcie 1.6.1. Odzyski analitów wahały się od 47,4% dla PCB 14 do 107,5% dla kongeneru 166 (ryc. 12).



Rycina 13. Odzyski [%] badanych kongenerów PCB z kolumnienek SPE wypełnionych Florisilem oraz Si(OH)/Si(OH) x H_2SO_4 (2:1).

Ze względu na lepszą precyzję oznaczeń uzyskanych podczas oczyszczania PCB na kolumnienkach SPE z żelem krzemionkowym impregnowanym stężonym H_2SO_4 (2:1)

adsorbent ten wykorzystano w dalszych etapach oczyszczania ekstraktów próbek materiału biologicznego o zwiększonej zawartości tłuszczu (tkanki i organy), zawierających PCB (SOP_BM1_v2.0).

2.2.2.1.2. Ocena precyzji grawimetrycznego oznaczania tłuszczu

Mając na uwadze fakt, że PCB kumulują się głównie w tkance tłuszczowej [156] oraz, że wyniki oznaczeń PCB w matrycach biologicznych są wyrażane zarówno w ng/g tłuszczu jak i w ng/g mokrej masy (m.m.) [8, 26, 40, 188, 243] ocenie poddano precyzję metody grawimetrycznego oznaczania tłuszczu wchodzącą w skład procedur SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0.

Ekstrakty próbek wątroby (masa próbki ok. 1 g, n=7) i krwi (masa próbki ok. 1 g, n=7) szczurów rasy Sprague-Dawley, otrzymane na etapie pkt. 8.2. procedur SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0, suszono w temperaturze ok. 40 °C w strumieniu azotu do otrzymania stałej masy.

Oznaczona zawartość tłuszczu w siedmiu równoległych próbkach wątroby wahała się od 2,96% do 3,34% (Wz = 6,79%) a w próbkach krwi od 0,33% do 0,46% (Wz = 10,53%). Otrzymane wyniki (tabela 12) były porównywalne z wynikami uzyskanymi przez Kanię-Korwel i wsp. [40, 55] a ich precyzja (Wz) była zbliżona do precyzji oznaczeń tłuszczu w próbkach ryb w metodzie przedstawionej przez Jensen'a i wsp. [243].

Tabela 12. Ocena statystyczna wyników oznaczania tłuszczu w próbkach materiału biologicznego metodami ekstrakcji rozpuszczalnikami (SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0).

Próbka	SOP_BM1_v2.0 (wątroba ok. 1 g, n=7)		SOP_BM2_v2.0 (krew ok. 1 g, n=7)	
	Zawartość tłuszczu [%]	Parametry oceny statystycznej	Zawartość tłuszczu [%]	Parametry oceny statystycznej
1	3,26	$X_{sr} = 3,17$ $SD = 0,22$ $Wz = 6,79\%$	0,33	$X_{sr} = 0,41$ $SD = 0,04$ $Wz = 10,53\%$
2	3,53		0,39	
3	2,96		0,43	
4	2,97		0,41	
5	3,34		0,42	
6	3,04		0,46	
7	3,07		0,45	

2.2.2.2. Ocena jakości Standardowych Procedur Operacyjnych

W kolejnym etapie badań przeprowadzono ocenę jakości procedur SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0 z wykorzystaniem niewzbogaconych i wzbogaconych PCB próbek materiału biologicznego (wątroby i krwi). Walidacja procedur obejmowała:

- określenie granicy wykrywalności i oznaczalności metod,
- ocenę precyzji i dokładności wyników oznaczeń wybranych PCB, oraz
- określenie zakresu liniowości metod.

2.2.2.2.1. Przygotowanie wzbogaconych PCB próbek materiału biologicznego

Próbki wątroby (n=13) i krwi (n=12) szczurów rasy Sprague-Dawley wzbogacono różnymi poziomami kongenerów PCB 84, 91, 95, 132, 136, 149, 147, 176 i 183. W tym celu do próbek zawierających ok. 1,000 g wątroby lub krwi dodano odpowiednie objętości izooktanowego roztworu podstawowego i/lub roboczego PCB (tabela 9), uzyskując:

- 7 próbek wątroby i 7 próbek krwi zawierających po ok. 100 ng każdego z kongenerów,
- 6 próbek wątroby zawierających wzrastające ilości analitów w zakresie od ok. 10 ng do 514 ng,
- 5 próbek krwi zawierających wzrastające ilości analitów w zakresie od ok. 25 ng do ok. 129 ng

Zawartość próbek wymieszano na wytrząsarce próbówkowej a następnie próbki umieszczono na 30 min w łaźni ultradźwiękowej celem maksymalnego połączenia kongenerów z matrycą.

Wzbogacone próbki materiału biologicznego poddano procedurom analitycznym, opisanym w Aneksie (SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0). Analizę GC- μ ECD oczyszczonych ekstraktów prowadzono na kolumnie SLB-5MS w warunkach opisanych w punkcie 1.6.1.

2.2.2.2.2. Wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności metod

Granice wykrywalności (MDL) oraz oznaczalności (MQL) opracowanych metod (SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0) określono na podstawie wyznaczonych średnich wartości stosunku sygnału do szumu linii podstawowej (S/N) na chromatogramach ekstraktów próbek ślepych (ok. 1 g wątroby lub krwi, n=3) szczurów rasy Sprague-Dawley w

zakresie zmiany sygnału w pobliżu czasu retencji poszczególnych analitów. Uzyskane wielkości pomnożono przez 3 (granica wykrywalności metody, MDL) lub przez 10 (granica oznaczalności metody, MQL), a następnie przeliczono na stężenie analitów wyrażone w ng/g m.m. analizowanej matrycy. Wartości MDL i MQL zestawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Granice wykrywalności (MDL) i oznaczalności (MQL) metod oznaczania PCB w próbkach materiału biologicznego.

Kongener PCB	SOP_BM1_v2.0 (niewzbogacona wątroba ok. 1 g, n=3)		SOP_BM2_v2.0 (niewzbogacona krew ok. 1 g, n=3)	
	MDL [ng/g m.m.]	MQL [ng/g m.m.]	MDL [ng/g m.m.]	MQL [ng/g m.m.]
14	2,94	9,79	4,91	16,36
65	2,89	9,63	3,18	10,59
84	1,89	6,30	3,44	11,45
91	0,95	3,17	4,52	15,06
95	0,75	2,50	5,21	17,37
132	0,71	2,38	2,29	7,64
136	0,44	1,45	3,34	11,14
149	2,10	6,99	2,87	9,56
166	0,70	2,33	1,91	6,36
174	0,51	1,72	2,90	9,67
176	0,51	1,70	1,42	4,73
183	0,30	1,01	2,22	7,39

2.2.2.2.3. Ocena precyzji metod

W celu określenia precyzji procedur SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0 siedmiokrotnie oznaczono zawartości analitów w próbkach wątroby i krwi szczurów rasy Sprague-Dawley (ok. 1 g), wzbogaconych PCB na poziomie ok. 100 ng/g m.m.

Powtarzalność wyników oznaczeń analitów oceniono na podstawie wartości odchylenia standardowego (SD) oraz współczynników zmienności (Wz). Jak wynika z danych zestawionych w tabeli 14 współczynniki zmienności wahają się od 7,90% dla PCB 95 do 23,36% dla PCB 65 dla próbek wątroby a dla próbek krwi od 0,85% dla PCB 176 do 4,34% dla PCB 14.

Powtarzalność wyników oznaczeń poszczególnych PCB w analizowanych ekstraktach zarówno pierwszą (SOP_BM1_v2.0, z wyjątkiem PCB 65) jak i drugą metodą (SOP_BM2_v2.0)

spełnia wymagania *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), dotyczące akceptowalnej precyzji oznaczania analitów na poziomach 100 ppb ($Wz < 15\%$) [297, 298].

Tabela 14. Ocena powtarzalności odzysków PCB ze wzbogaconych próbek wątroby i krwi (n=7).

Kongener PCB	Poziom wzbogacenia [ng]	SOP_BM1_v2.0 (wątroba ok. 1 g, n=7)				SOP_BM2_v2.0 (krew ok.1 g, n=7)			
		Średnia ilość oznaczona [ng]	Średni odzysk [%]	SD	Wz [%]	Średnia ilość oznaczona [ng]	Średni odzysk [%]	SD	Wz [%]
14	100	69,59	69,59	9,69	13,93	80,74	80,74	3,50	4,34
65	100	63,14	63,14	14,75	23,36	91,33	91,33	2,06	2,26
84	99,7	78,58	78,82	11,39	14,46	96,94	97,23	2,54	2,61
91	99,7	90,22	90,49	9,24	10,21	100,06	100,36	2,43	2,42
95	100	87,89	87,89	6,94	7,90	86,73	86,73	1,50	1,73
132	99,6	77,54	77,85	9,18	11,79	91,94	92,31	1,41	1,53
136	102	91,95	90,15	9,83	10,90	101,78	99,78	3,83	3,84
149	98,6	78,33	79,45	6,43	8,09	90,28	91,56	1,30	1,42
166	100	87,15	87,15	7,54	8,65	97,18	97,18	2,10	2,16
174	99,8	85,57	85,74	7,83	9,14	93,17	93,35	1,98	2,12
176	102,8	88,39	85,99	8,44	9,81	98,16	95,49	0,81	0,85
183	100	86,16	86,16	7,50	8,70	94,45	94,45	2,77	2,94

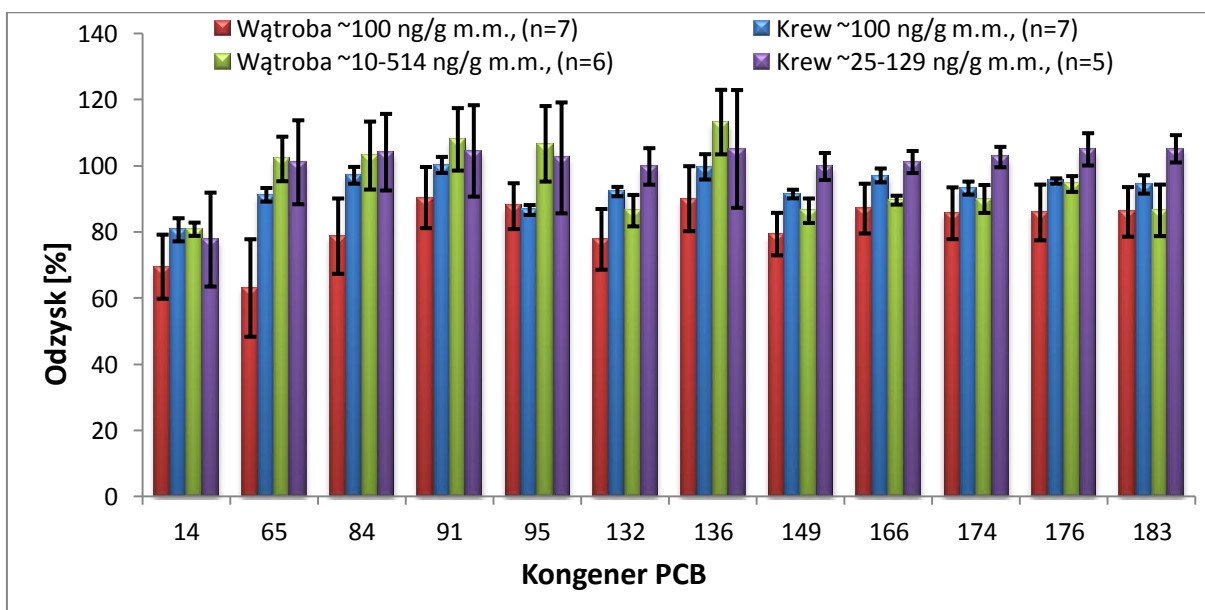
Wyniki precyzji pośredniej oznaczania analitów we wzbogaconych próbkach wątroby (poziom wzbogacenia od ok. 10 do 514 ng/g m.m.) oraz krwi (poziom wzbogacenia od ok. 25 do ok. 129 ng/g m.m.) szczura rasy Sprague-Dawley ($Wz < 18,3\%$, tabela 15) również potwierdziły akceptowalną precyzję opracowanych procedur analitycznych.

Tabela 15. Ocena precyzji pośredniej oraz odzysku PCB ze wzbogaconych próbek wątroby (n=6) i krwi (n=5).

Kongener PCB	SOP_BM1_v2.0 (wątroba ok. 1 g, n=6)				SOP_BM2_v2.0 (krew ok. 1 g, n=5)			
	Zakres/poziom wzbogacenia [ng]	Średni odzysk [%]	SD	Wz [%]	Zakres/poziom wzbogacenia [ng]	Średni odzysk [%]	SD	Wz [%]
14	100	80,91	2,01	2,48	100	77,78	14,20	18,26
65	100	102,17	6,74	6,60	100	101,16	12,70	12,55
84	9,97-498,5	103,19	10,28	9,96	24,93-124,63	104,22	11,58	11,11
91	9,97-498,5	108,10	9,45	8,74	24,93-124,63	104,60	13,83	13,22
95	10-500	106,74	11,42	10,70	25-125	102,49	16,78	16,37
132	9,96-498	86,53	4,76	5,50	24,9-124,5	99,91	5,52	5,52
136	10,2-510	113,32	9,76	8,62	25,5-127,5	105,20	17,81	16,93
149	9,86-493	86,50	3,70	4,28	24,65-123,25	99,90	4,07	4,08
166	100	89,71	1,35	1,50	100	101,24	3,34	3,30
174	9,98-499	90,07	4,22	4,69	24,95-124,75	102,74	3,09	3,01
176	10,28-514	94,59	2,39	2,52	25,7-128,50	105,07	4,89	4,65
183	10-500	86,62	7,79	9,00	25-125	105,23	4,13	3,93

2.2.2.2.4. Ocena dokładności metod

Dokładność metod SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0 oceniono na podstawie wyników badań średniego odzysku poszczególnych analitów z 7 próbek wzbogaconych wątrób/krwi oraz z 6 i 5 wzbogaconych próbek wątrób/krwi oznaczonych w czasie dwóch tygodni. Z danych zebranych w tabelach 14 i 15 oraz na rycinie 14 wynika, że odzyski poszczególnych analitów z próbek wątroby wahają się od 63,14% dla PCB 65 do 90,49% dla PCB 91 a z próbek krwi od 80,74% dla PCB 14 do 100,36% dla PCB 91. Natomiast w badaniach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej odzyski wynoszą od 80,91% dla PCB 14 do 113,32% dla PCB 136 w próbkach wątroby oraz od 77,78% dla PCB 14 do 105,20% dla PCB 136 w próbkach krwi. Mając na uwadze poziomy oznaczanych PCB (<1 ppm) uzyskane wartości odzysków poszczególnych kongenerów ($\bar{x}_{sr} \pm SD$) wynoszą >80%. Można stwierdzić, że opracowane metody spełniają kryterium dokładności proponowane przez AOAC [297, 298].



Rycina 14. Odzysk PCB ($\bar{x}_{sr} \pm SD$) [%] z próbek materiału biologicznego wzbogaconych na różnych poziomach.

2.2.2.2.5. Ocena liniowości metod

Zakres liniowości metod SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0 oznaczono na podstawie badania przebiegu zależności pomiędzy oznaczoną i oczekiwaną zawartością poszczególnych kongenerów PCB we wzbogaconych próbkach materiału biologicznego szczurów rasy Sprague-Dawley w zakresie od ok. 10 do 514 ng/g m.m. wątroby oraz od ok. 25 do ok. 129 ng/g m.m. krwi. W tabeli 16 przedstawiono wartości parametrów (a i b)

równań oraz wartości współczynników korelacji (r). Stwierdzono, że opracowane metody są liniowe w badanych zakresach stężeń w odniesieniu do wszystkich oznaczanych PCB ($r > 0,999$ dla metody SOP_BM1_v2.0 oraz $r > 0,978$ dla metody SOP_BM2_v2.0).

Tabela 16. Ocena liniowości metod SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0 oznaczania wybranych chiralnych PCB w materiale biologicznym.

Kongener PCB	SOP_BM1_v2.0 (wątroba ok. 1 g, n=6)			SOP_BM2_v2.0 (krew ok. 1 g, n=5)				
	Zakres wzbogacenia [ng]	a	b	r	Zakres wzbogacenia [ng]	a	b	r
84	9,97-498,5	0,989	4,110	1,000	24,93-124,63	0,834	12,215	0,994
91	9,97-498,5	1,021	4,562	1,000	24,93-124,63	0,820	13,531	0,985
95	10-500	0,992	5,588	1,000	25-125	0,748	16,464	0,978
132	9,96-498	0,998	3,687	0,999	24,9-124,5	0,951	3,224	0,997
136	10,2-510	0,999	6,194	1,000	25,5-127,5	0,785	16,229	0,970
149	9,86-493	0,999	2,518	1,000	24,65-123,25	0,994	0,556	0,998
174	9,98-499	0,856	4,529	0,999	24,95-124,75	1,026	0,409	0,999
176	10,28-514	1,000	2,296	1,000	25,7-128,50	1,000	3,384	0,998
183	10-500	0,996	9,807	0,998	25-125	1,038	1,177	0,997

a – współczynnik kierunkowy krzywej regresji,

b – wyraz wolny,

r – współczynnik korelacji.

W podsumowaniu można stwierdzić, że opracowane procedury spełniają wymogi stawiane metodom przewidzianym do oznaczania analitów w materiale biologicznym na poziomie ppb i mogą być wykorzystywane w badaniach poziomów PCB w realnych próbkach matryc biologicznych.

2.3. Badania *in vivo*

2.3.1. Ustalenie składu mieszaniny chiralnych PCB w roztworze olejowym do podania *per os*

Skład jakościowy mieszaniny chiralnych PCB, użytych do podania *per os* zwierzętom doświadczalnym, ustalono na podstawie danych z piśmiennictwa (ostatnie dziesięciolecie) na temat frakcji enancjomerycznych (EF) oraz poziomów chiralnych PCB w matrycach środowiskowych (ryc. 6) [27, 33, 99, 101, 104-107, 126, 299, 300].

W obliczeniach ilości wytypowanych kongenerów, tj. PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183, potrzebnych do przygotowania roztworu olejowego do podania *per os* uwzględniono:

- stosunki w/w kongenerów w mieszaninie środowiskowej PCB „Fox River” wg. Kostyniaka i wsp. [301] (Aroclory 1242 : 1248 : 1254 : 1260 zmieszane w stosunku wagowym 35 : 35 : 15 : 15), obliczone z danych zawartych w pracy Frame’a i wsp. [84],
- maksymalną objętość płynu (10 ml/kg masy ciała (m.c.)), możliwą do podania myszom przy użyciu sondy dożołądkowej,
- założoną całkowitą dawkę $\Sigma\text{PCB}_{\text{chiralnych}}$ do jednorazowego podania *per os* wynoszącą 50 mg/kg m.c.

Skład jakościowy i ilościowy chiralnych PCB w roztworze olejowym do podania *per os* przedstawiono w tabeli 17.

2.3.2. Przygotowanie roztworu olejowego chiralnych PCB do podania *per os*

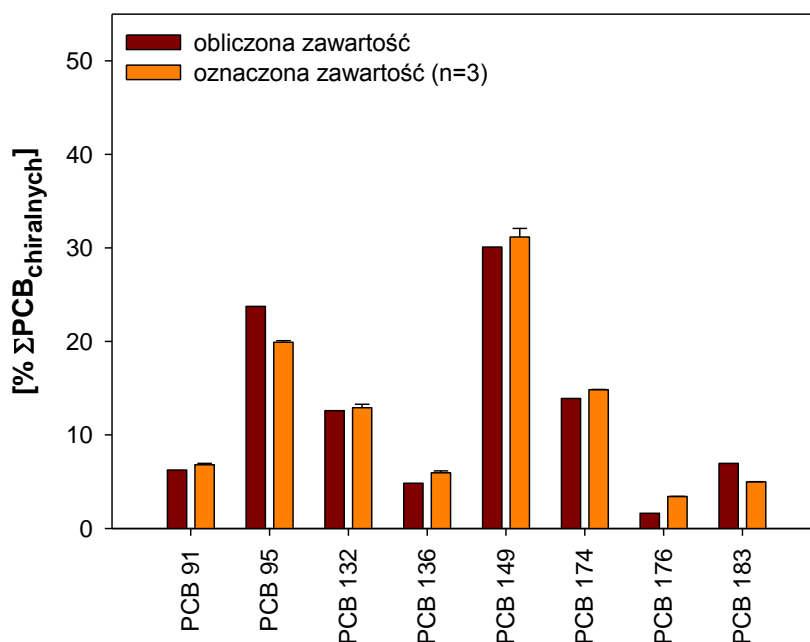
W fiolkach szklanych (1-8) o poj. 2 ml odważono z dokładnością $\pm 1 \mu\text{g}$ odpowiednie ilości poszczególnych substancji wzorcowych, tj. PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 (tabela 17). Następnie do każdej fiołki dodano po 1 ml dichlorometanu, fiołki szczelnie zakręcono i rozpuszczono w nich stałą zawartość. Roztwory poszczególnych kongenerów przeniesiono ilościowo (płuczac każdą fiołkę trzykrotnie 0,5 ml dichlorometanu) do jednej fiołki zbiorczej o poj. 25 ml. Połączone roztwory PCB odparowano do sucha w atmosferze azotu i umieszczono w suszarce próżniowej na 24 h. Do suchej pozostałości dodano 6,1482 g oleju kukurydzianego o gęstości = 0,918 g/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fiołkę

szczelnie zamknięto a następnie mieszano 30 min na wytrząsarce próbkowej i pozostawiono 90 min w łaźni ultradźwiękowej w celu uzyskania roztworu olejowego PCB.

Tabela 17. Skład jakościowy i ilościowy roztworu olejowego chiralnych PCB do podania *per os*.

Kongener PCB	Dawka [mg/kg m.c.]	Ilość obliczona do naważenia (Q_T) [mg]	Ilość naważona (Q_w) [mg]	Różnica $Q_w - Q_T$ [mg]	Udział % kongeneru w $\Sigma PCB_{chiralnych}$ w przygotowanym roztworze olejowym
91	3,07	2,052	2,092	0,040	6,3
95	11,89	7,947	7,947	0,002	23,7
132	6,33	4,231	4,217	-0,014	12,6
136	2,42	1,617	1,619	0,002	4,8
149	15,08	10,079	10,079	0,000	30,1
174	6,95	4,645	4,654	0,009	13,9
176	0,79	0,528	0,544	0,016	1,6
183	3,47	2,319	2,331	0,012	7,0
ΣPCB	50,00	33,418	33,485	0,067	100,0

Dodatkowo metodą SOP_BM2_v2.0 oznaczono poziomy poszczególnych kongenerów w trzech próbkach przygotowanego roztworu olejowego PCB. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy obliczoną i oznaczoną ilością analitów oraz uzyskano dobrą korelację ($R^2 = 0,98$, współczynnik podobieństwa $\cos \theta = 0,99$) profili stężeń PCB, wyrażonych jako % udział poszczególnych kongenerów w $\Sigma PCB_{chiralnych}$ [% $\Sigma PCB_{chiralnych}$] (ryc. 15).



Rycina 15. Profile chiralnych PCB w roztworze olejowym do podania *per os*.

2.3.3. Badania na zwierzętach

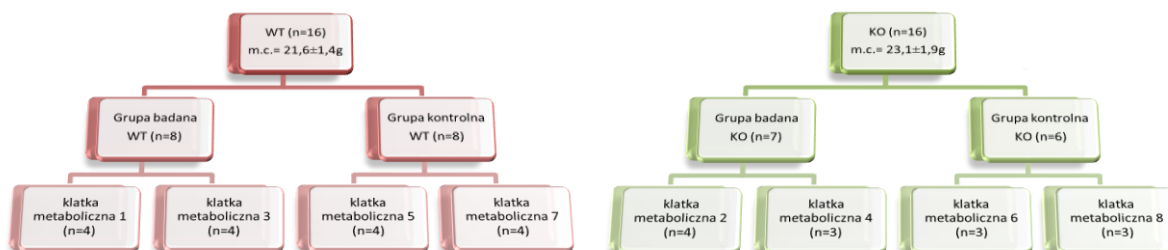
2.3.3.1. Zwierzęta laboratoryjne

Badania przeprowadzono na szesnastu dojrzałych płciowo samicach myszy szczepu FVB (homozygoty typu dzikiego *mdr1a/b* (+/+), *wild-type*, **WT**) oraz trzynastu myszach transgenicznym FVB.129P2-*Abcb1a*^{tm1Bor}*Abcb1b*^{tm1Bor}N12 pozbawionych transporterów *Abcb1a* i *Abcb1b* w wyniku podwójnej, celowanej mutacji genów *mdr1a* i *mdr1b* (homozygoty typu zmutowanego *mdr1a/b* (-/-), *knockout*, **KO**). Sześciotygodniowe zwierzęta pozyskano z hodowli firmy *Taconics Farm Inc.* (Germantown, NY, USA). Myszy aklimatyzowano przez dwa tygodnie. Hodowlę prowadzono w standaryzowanych warunkach temperatury (20-25°C), wilgotności względnej (50-60%) oraz oświetlenia (dzień:noc 12:12 h). Zwierzęta miały dostęp *ad libitum* do wody oraz do standardowej paszy laboratoryjnej (NIH #31 rodent diet).

2.3.3.2. Procedura badań na modelu zwierzęcym

Zwierzęta doświadczalne zważono po dwóch tygodniach kwarantanny, celem określenia ich tzw. początkowej masy ciała, a następnie podzielono losowo na 4 grupy (ryc. 16):

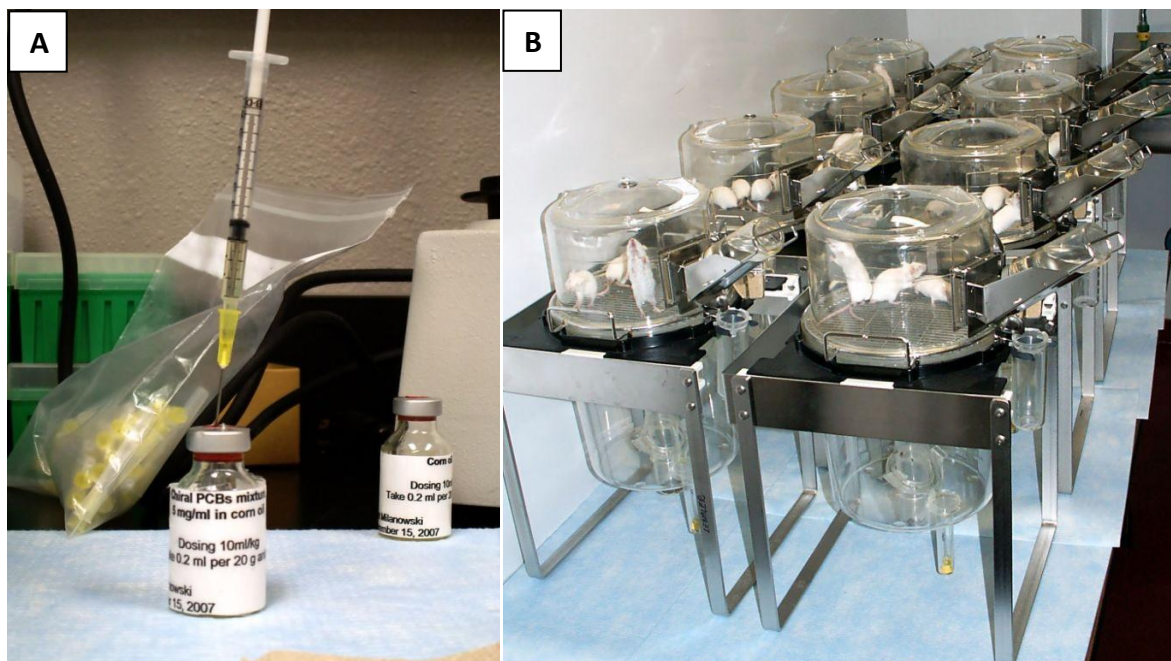
1. grupa kontrolna myszy WT (n=8),
2. grupa badana myszy WT (n=8),
3. grupa kontrolna myszy KO (n=6),
4. grupa badana myszy KO (n=7).



Rycina 16. Schemat podziału myszy doświadczalnych na grupy.

Poszczególnym myszom z grup badanych WT i KO za pomocą metalowej sondy podano dożołądkowo mieszaninę wybranych, chiralnych PCB w postaci roztworu olejowego (ryc. 17A), w jednorazowej dawce 50 µg/g m.c. (myszy ważono bezpośrednio przed

podaniem, objętość podania = 10 μ l/g m.c.). Z kolei zwierzętom z grup kontrolnych WT i KO podano sondą dożołądkową placebo (olej kukurydziany w objętości 10 μ l/g m.c.). Następnie zwierzęta (n = 3 lub 4) umieszczono w kłatkach metabolicznych typu Nalgene (ryc. 16 i 17B), firmy *Nalge Company* (Rochester, NY, USA).



Rycina 17. Doświadczenie na modelu zwierzęcym:

- A) roztwory olejowe podawane zwierzętom,
- B) myszy w kłatkach metabolicznych typu *Nalgene*.

2.3.3.3. Próbkę matrycy biologicznych

Uwzględniając krótki okres biologicznego półtrwania ($t_{0,5} < 30$ h) niektórych chiralnych kongenerów (PCB 91, 136 i 176) we krwi oraz wczesną fazę redystrybucji enancjomerów PCB u myszy [42], materiał do badań pobrano po 24 godzinach od podania ksenobiotyków (mocz i kał zebrano dwukrotnie w interwałach dwunastogodzinnych).

Po zakończeniu eksperymentu, zwierzęta ponownie zważono celem określenia tzw. końcowej masy ciała i poddano eutanazji. Śmierć myszy następowała poprzez dyslokację kręgow szyjnych (przerwanie rdzenia kręgowego) poprzedzoną uśpieniem za pomocą CO_2 w komorze gazowej. Następnie, zgodnie z wytycznymi *Institutional Animal Care and Use Commitee* (IACUC), pobrano krew a odpowiednie organy i tkanki wycięto *en bloc* i zważono. Materiał do badań (tabela 18) stanowiły niewzbogacone i wzbogacone analitami wybrane tkanki, organy i wydaliny myszy doświadczalnych WT i KO.

Tabela 18. Badany materiał biologiczny.

Matryca	Sposób przygotowania	Przechowywanie
Mocz Kał	zebrany frakcyjnie (0-12 h i 12-24 h) do fiolek szklanych o poj. 10 ml	zamrażarka, temp. = -80 °C
Krew	pobrana z komory serca do fiolek szklanych z dodatkiem roztworu antykoagulanta (7,5% r-r EDTA, 50 µl)	
Serce Płuca Wątroba Śledziona Jelita Tkanka tłuszczowa Nerki Macica Mózg	wycięcie organu/tkanki, zawinięcie w folię aluminiową, zamrożenie w ciekłym azocie	

Analiza biometryczna początkowej masy ciała myszy wykazała statystycznie istotne różnice (test *t*-Studenta dla zmiennych niepowiązanych, $\alpha=0,05$, $p=0,02$) pomiędzy średnimi masami ciała zwierząt WT (m.c._{WT} = 21.6±1,4 g; n=16) i KO (m.c._{KO} = 23,1±1,9 g; n=13). Utrata masy ciała po 24 godzinach była prawdopodobnie efektem stresu zwierząt, związanego ze sposobem podawania roztworów olejowych PCB lub placebo i przeniesieniem myszy do klatek metabolicznych. Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic pomiędzy masami poszczególnych organów, wyrażonymi jako % końcowej masy ciała, w grupach badanych myszy WT i KO (tabela 19).

Tabela 19. Zmiany masy ciała myszy doświadczalnych oraz masy badanych organów (odniesione do masy ciała zwierząt) po podaniu mieszaniny racemicznej chiralnych PCB lub placebo.

% końcowej masy ciała	WT grupa kontrolna (n=8)	KO grupa kontrolna (n=6)	WT grupa badana (n=8)	KO grupa badana (n=7)
Zmiana masy ciała ^a	-0,19 ± 1,43	-0,84 ± 1,49	-1,09 ± 5,02	-0,8 ± 2,38
Mózg ^b	1,78 ± 0,15	1,74 ± 0,26	1,78 ± 0,18	1,58 ± 0,22
Serce ^b	0,50 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,50 ± 0,04
Nerki ^b	1,13 ± 0,06	1,08 ± 0,04	1,08 ± 0,09	1,04 ± 0,05
Wątroba ^b	5,28 ± 0,22	5,21 ± 0,28	5,98 ± 1,48	5,49 ± 0,76
Płuca ^b	0,65 ± 0,12	0,64 ± 0,04	0,71 ± 0,08	0,68 ± 0,08
Śledziona ^b	0,49 ± 0,05 ^c	0,43 ± 0,05 ^c	0,45 ± 0,02	0,44 ± 0,03
Macica ^b	0,21 ± 0,03	0,29 ± 0,10	0,27 ± 0,16	0,24 ± 0,07

^a obliczona z zależności: $\frac{\text{końcowa masa ciała po 24 h ekspozycji} - \text{początkowa masa ciała}}{\text{końcowa masa ciała po 24 h ekspozycji}} \times 100\%$.

^b obliczony z zależności: $\frac{\text{końcowa masa organu po 24 h ekspozycji}}{\text{końcowa masa ciała po 24 h ekspozycji}} \times 100\%$.

^c statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi mas organów myszy z grup kontrolnych WT i KO (ANOVA z testem *post-hoc* Tukey'a, $\alpha=0,05$, $p=0,05$).

2.4. Schemat postępowania analitycznego

Próbki materiału biologicznego do analizy chromatograficznej przygotowano wg opracowanych i zwalidowanych procedur SOP_BM1_v2.0 (tkanki, organy, kał) oraz SOP_BM2_v2.0 (krew, mocz).

2.4.1. Przygotowanie próbek materiału biologicznego do analizy GC- μ ECD

Przechowywane w zamrażarce ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) matryce biologiczne przed przystąpieniem do badań zostały odmrożone i doprowadzone do temperatury pokojowej. Dodatkowo próbki krwi i moczu zmieszano na wytrząsarce próbówkowej przed procesem ekstrakcji.

2.4.2. Izolacja analitów: metody ekstrakcji rozpuszczalnikami wspomagane wytrząsaniem

Do próbek borokrzemowych o poj. 15 ml odważono próbki poszczególnych matryc biologicznych (w całości). Na wstępie do próbek dodano wzorce odzysku metody (PCB 166 - 100 ng, 4-OH-PCB 159 - 137 ng oraz 3-MeSO₂-4-Me-PCB 87 - 96 ng). Wzorce odzysku metabolitów PCB dodano ze względu na zakładaną dalszą analizę GC- μ ECD wyizolowanych i oczyszczonych ekstraktów metoksylowych oraz metylosulfonowych pochodnych PCB.

Próbki tkanek, organów i kału (wg SOP_BM1_v2.0) rozdrobniono za pomocą homogenizatora firmy IKA (Wilmington, NC, USA) w mieszaninie 2-propanolu i eteru dietylowego (5:2 v/v, 3,5 ml) przy 24000 obr/min przez 1 min. Homogenat ekstrahowano mieszaniną heksanu i eteru dietylowego (9:1 v/v, 2,5 ml). Uzyskane ekstrakty przemyto 5 ml 0,1 M kwasu ortofosforowego w roztworze soli fizjologicznej (0,9% wodny roztwór NaCl). Warstwy organiczne znad ekstraktu przeniesiono do kolejnej próbki, a wodną pozostałość reekstrahowano mieszaniną 2-propanolu i eteru dietylowego (5:2 v/v, 1 ml).

Próbki moczu oraz kału (wg SOP_BM2_v2.0) zdenaturowano kwasem solnym (6 M, 1 ml) i 2-propanolem (2 ml), ekstrahowano mieszaniną heksanu i eteru tert-butylo-*metylowego* (1:1 v/v, 5 ml) a następnie heksanem (3 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 5 ml 1% wodnego roztworu KCl.

W celu grawimetrycznego oznaczenia zawartości tłuszczu w analizowanych próbkach (z wyjątkiem próbek moczu) organiczne ekstrakty zagęszczono w temperaturze ok. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ w strumieniu azotu, aż do otrzymania stałej masy (tabela 20). Masy nielotnych pozostałości w

ślepych próbkach, w których materiał biologiczny zastąpiono heksanem, wahały się w granicach od 0,5 do 3,7 mg i średnio wynosiły $2,2 \pm 1,2$ mg (n=14).

Tabela 20. Wyniki oznaczeń wyekstrahowanych zawartości tłuszczu [%] z badanych matryc myszy grup WT i KO.

Matryca	grupa badana WT (n=8)	grupa badana KO (n=7)
Tk. tłuszczowa ^a	$88,3 \pm 7,4$	$91,6 \pm 5,5$
Krew ^a	$1,23 \pm 0,42$	$1,31 \pm 0,60$
Mózg ^a	$8,57 \pm 0,32$	$8,29 \pm 0,44$
Jelita ^a	$9,15 \pm 2,59$	$9,73 \pm 3,88$
Nerki ^a	$7,67 \pm 0,78$	$6,98 \pm 0,45$
Wątroba ^a	$6,11 \pm 1,17$	$6,19 \pm 0,94$
Kał 0-12 h ^b	5,12 (4,28; 5,95)	7,53 (6,67; 8,39)
Kał 12-24 h ^b	1,96 (1,19; 2,72)	2,94 (2,87; 3,00)

^a nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między średnimi z grup badanych WT i KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p>0,05$).

^b próbki kału zebrano w interwałach dwunastogodzinnych po podaniu mieszaniny PCB chiralnych i przeniesieniu do klatek metabolicznych zwierząt z grup badanych: WT (dwie klatki po 4 myszy na klatkę) i KO (jedna klatka z trzema, druga z czterema myszami). Liczby w nawiasach prezentują procentową zawartość wyekstrahowanego tłuszczu z próbek kału pobranych z poszczególnych klatek ze zwierzętami.

2.4.3. Oddzielanie PCB od metabolitów

Pozostałości tłuszczowe rozpuszczono w heksanie (4 ml). W dalszym toku procedur przygotowania próbek do analizy GC- μ ECD wykorzystano ok. połowy każdego z odtworzonych ekstraktów (drugą połowę przeniesiono do czystych probówek, zważono, opisano i przechowywano w temp. = -20 °C w razie konieczności wykonania ewentualnych powtórzeń analiz). Następnie, wykorzystując różne właściwości fizykochemiczne analitów (metylosulfony PCB są zasadami Lewisa, natomiast pochodne hydroksylowe wykazują słaby charakter kwasowy), wyodrębniono frakcje ekstraktów zawierające związki macierzyste oraz poszczególne grupy metabolitów PCB [45, 91].

Metabolity o charakterze fenolowym (OH-PCB) oddzielono od frakcji zawierającej PCB i MeSO₂-PCB przez podział analitów pomiędzy dwie niemieszające się ze sobą fazy, tj. organiczną (heksan) i wodno-alkoholową (0,5 M r-r KCl w 50% etanolu, 2 ml). Frakcję fenolową zakwaszono 0,5 ml 2 M r-ru HCl i dwukrotnie ekstrahowano OH-PCB mieszaniną heksanu oraz eteru tert-butylo-*w*-metylowego (9:1 v/v). Otrzymaną frakcję zagęszczono, rozpuszczono w 1 ml heksanu, dodano 0,5 ml 5 mM r-ru diazometanu w eterze dietylowym i poddano derywatywacji w czasie > 12 h i temp. = $4-8$ °C, otrzymując pochodne metoksyłowe - MeO-PCB.

Pozostałe w fazie organicznej związki o charakterze obojętnym (PCB i MeSO₂-PCB) rozdzielono przez wymieszanie z 0,5 ml bezwodnego dimetylosulfotlenku (DMSO) i zebranie fazy organicznej zawierającej PCB. Do frakcji MeSO₂-PCB w DMSO dodano 1 ml wody oczyszczonej i wyodrębniono metylosulfonowe pochodne ekstrahując dwukrotnie heksanem pozostały w probówce r-r wodny DMSO.

Fracje ekstraktów zawierających metabolity oczyszczono (szczegółowy opis w załączonych procedurach), dodano wzorzec wewnętrzny i przeniesiono do fiolek chromatograficznych. Do chwili obecnej są one przechowywane w temp. = -20 °C do dalszych analiz.

2.4.4. Oczyszczanie ekstraktów

Uzyskane po frakcjonowaniu ekstraktów roztwory heksanowe oprócz analitów zawierały jeszcze wiele związków przeszkadzających w rozdzielaniu PCB na kolumnach GC. Wśród nich na pierwsze miejsce wysuwały się związki siarki i lipidy.

W pierwszym etapie frakcje zawierające PCB zostały oczyszczone z pozostałości związków siarki w wyniku przemycia roztworem wodorosiarczanu tetrabutloamonowego. W kolejnym etapie lipidy usunięto stężonym kwasem siarkowym (2 ml, mieszanie 5 min na wytrząsarce probówkowej a następnie odwirowanie przez 3 min, 3000 obr/min) [31, 296]. Czynność tą powtórzono, za każdym razem zbierając oczyszczone warstwy organiczne nad kwasu siarkowego do nowych probówek.

Ze względu na zawartość tłuszczu > 2% w próbkach organów, tkanek i kału, ich wstępnie oczyszczone ekstrakty poddano dodatkowemu etapowi oczyszczania z wykorzystaniem techniki SPE. W tym celu połączone ekstrakty odpowiednich próbek zagęszczono do około 0,5 ml i przeniesiono ilościowo do kolumniek SPE na pozostawioną po kondycjonowaniu 2 mm warstwę heksanową nad żelem krzemionkowym impregnowanym stęż. H₂SO₄ (2:1, 1 g) a następnie eluowano 10 ml heksanu.

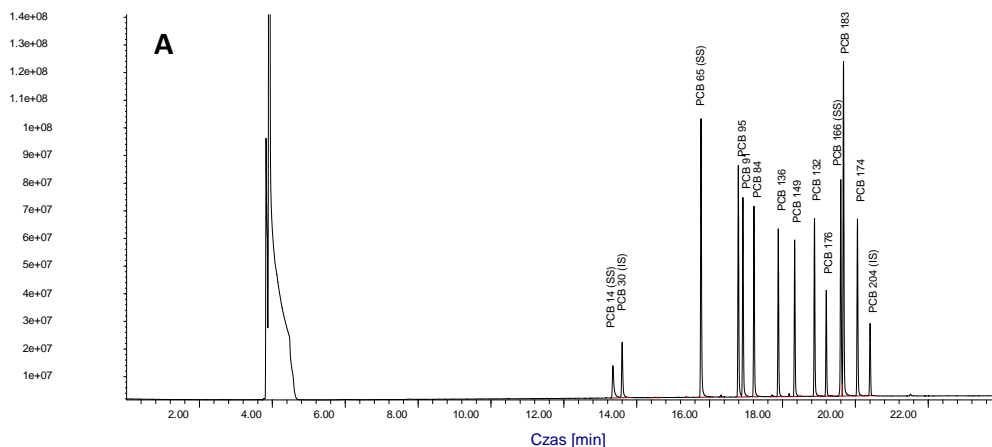
Zebrane eluaty odparowano do sucha w atmosferze azotu i w zależności od rodzaju analizowanej matrycy suchą pozostałość rozpuszczono w 1 ml lub 0,1 ml izooktanu a następnie dodano 100 µl roztworu wzorców chromatograficznych PCB 30 i 204 (po 25 ng). Otrzymane roztwory izooktanowe przeniesiono do fiolek chromatograficznych.

2.4.5. Analiza jakościowa i ilościowa ekstraktów

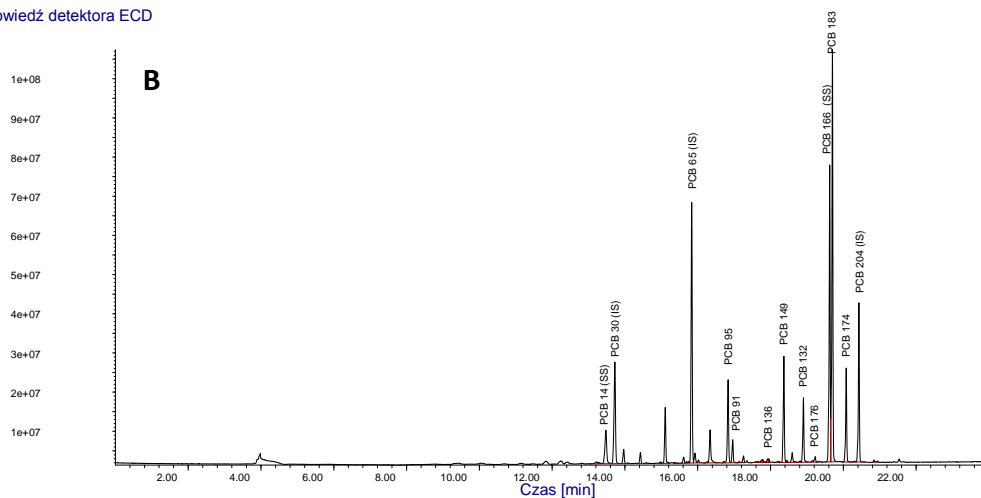
Do oznaczeń chromatograficznych polichlorowanych bifenyli w ekstraktach wykorzystano chromatograf gazowy Agilent Technologies 6890N z mikrodetekтором wychwytu elektronów (μ ECD). Analizę chromatograficzną oczyszczonych ekstraktów prowadzono w warunkach opisanych w rozdziale 1, pkt. 1.6.1.

Celem identyfikacji PCB rozdzielanych na kolumnie SLB-5MS porównano czasy retencji (RT) i względne czasy retencji (RRT_{30+204}) pików poszczególnych kongenerów na chromatogramach roztworów wzorcowych PCB i oczyszczonych ekstraktów. Jako kongener zidentyfikowany uznano ten, dla którego różnica RRT_{30+204} w próbce i roztworze wzorcowym nie była większa niż 0,0005. Przykładowe chromatogramy GC- μ ECD roboczego roztworu wzorcowego PCB (tabela 9) oraz oczyszczonych ekstraktów przedstawiono na rycinie 18.

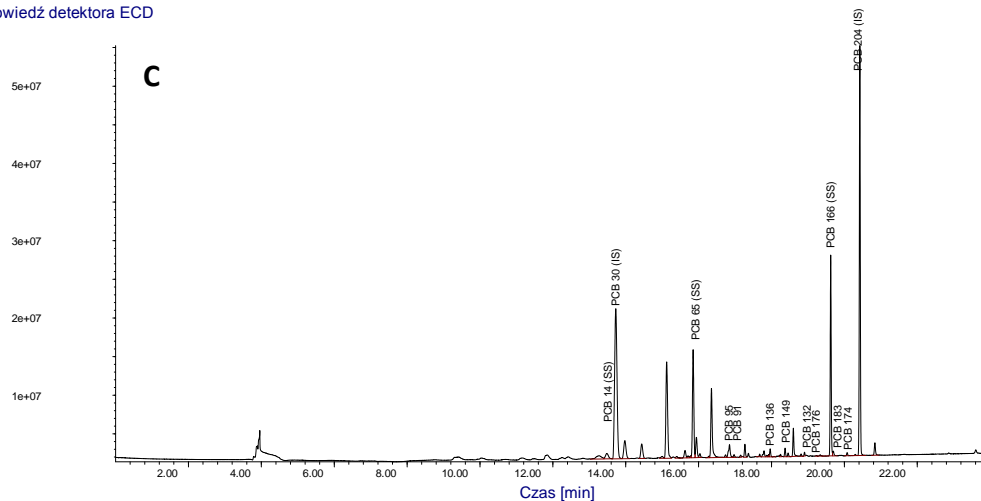
Odpowiedź detektora ECD



Odpowiedź detektora ECD



Odpowiedź detektora ECD



Rycina 18. Przykładowe chromatogramy GC- μ ECD (kolumna SLB-5MS):

- A) roboczego roztworu wzorcowego PCB (tabela 9),
- B) ekstraktu próbki mózgu myszy z grupy badanej WT (pobranej 24 h po jednorazowym podaniu *per os* mieszaniny racemicznej wybranych chiralnych PCB w dawce 50 μ g/g m.c.),
- C) ekstraktu próbki ślepej (gdzie materiał biologiczny zastąpiono heksanem).

Analizę ilościową PCB w ekstraktach przeprowadzono metodą wzorca wewnętrznego [284]. Stężenia poszczególnych analitów w próbce zostały obliczone ze wzoru:

$$\text{Stężenie analitu} \left[\frac{\text{ng}}{\text{g}} \text{ próbki} \right] = \frac{P_A \times \text{Amt}_{IS}}{P_{IS} \times \text{RRF}_A \times \text{Amt}_S}$$

gdzie:

P_A – powierzchnia pików analitu na chromatogramie analizowanej próbki,

P_{IS} – powierzchnia pików wzorca wewnętrznego na chromatogramie analizowanej próbki,

Amt_{IS} – ilość dodanego wzorca wewnętrznego [ng],

Amt_S – masa próbki [g],

RRF_A – względny współczynnik odpowiedzi detektora μECD na analit (*Relative Response Factor*), wyznaczony ze wzoru:

$$\text{RRF}_A = \frac{P_{Wz} \times C_{IS}}{P_{IS} \times C_{Wz}}$$

gdzie:

P_{Wz} – powierzchnia pików analitu na chromatogramie r-ru wzorcowego,

P_{IS} – powierzchnia pików wzorca wewnętrznego na chromatogramie r-ru wzorcowego,

C_{IS} – stężenie wzorca wewnętrznego [ng/ml],

C_{Wz} – stężenie analitu w r-rze wzorcowym [ng/ml].

Stężenia PCB w matrycach biologicznych zostały podane w oparciu o:

- masy mokre matryc [ng/g m.m.] (tabele 25-26),
- oznaczoną ilość tłuszczu [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu] (tabele 27-28), oraz
- % ułamek całkowitej dawki *per os* poszczególnego kongeneru [%TD] (tabele 29-30).

W celu oznaczenia frakcji enancjomerycznych (EF) analitów wykonano enancjoselektywną analizę GC- μECD uzyskanych ekstraktów stosując kolumnę CP-Chirasil-Dex CB i zmodyfikowany program temperaturowy pieca, opracowany przez Wong'a i Garrison'a [278] (pkt. 1.6.1.). Pomimo określenia czasów retencji i względnych czasów retencji dla poszczególnych atropoizomerów rozdzielanych na enancjoselektywnej fazie kolumny CP-Chirasil-Dex CB, występowały trudności w interpretacji uzyskanych chromatogramów. W trakcie badań stwierdzono, że na wybranej fazie nie zachodzi rozdzielanie atropoizomerów PCB 183, a podczas eksploatacji kolumny spada jej zdolność rozdzielcza, skracają się czasy retencji poszczególnych analitów i zachodzi koelucja rozdzielanych wcześniej par enancjomerów PCB 132 i 176 (ryc. 19).

Parametrem najlepiej charakteryzującym jakość rozdzielania chromatograficznego jest rozdzielczość pików (R). Wartość rozdzielczości określa stopień rozdzielenia dwóch pików na chromatogramach (tj. danego pików i pików go poprzedzającego). Im lepiej rozdzielane są piki tym wartość R jest wyższa. Jeżeli $R = 1$ to piki o podobnej wysokości są rozdzielone w około 96%, natomiast gdy $R \geq 1,15$ piki są rozdzielone do linii podstawowej [95].

W niniejszej pracy rozdzielczość pików poszczególnych, racemicznych par atropoizomerów PCB na chromatogramach GC- μ ECD roztworu wzorcowego ($n=14$) obliczono korzystając z równania:

$$R_{PA} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{BW_2 + BW_1}$$

gdzie:

- R_{PA} – rozdzielczość pików dwóch atropoizomerów PCB,
- t_{R1} – czas retencji pików 1 atropoizomeru PCB,
- t_{R2} – czas retencji pików 2 atropoizomeru PCB,
- BW_1 – szerokość u podstawy pików 1 atropoizomeru PCB,
- BW_2 – szerokość u podstawy pików 2 atropoizomeru PCB.

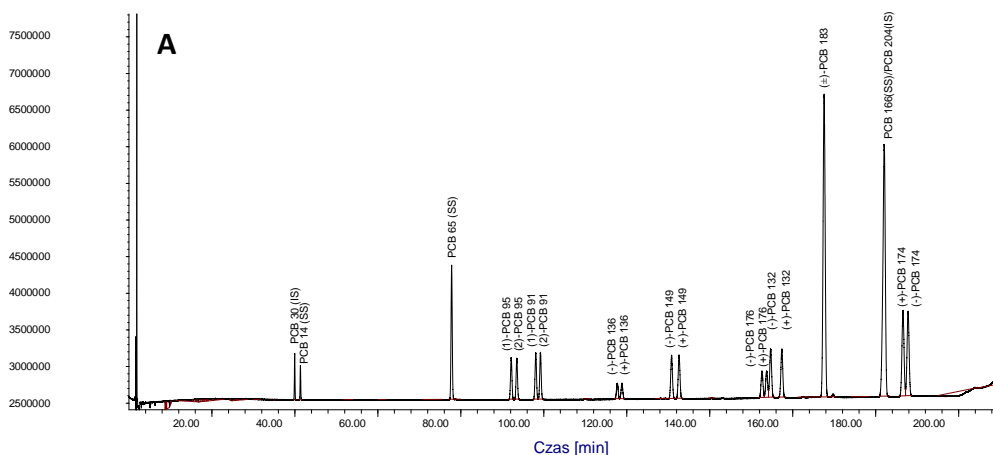
Zjawiska koelucji i spadku zdolności rozdzielczej kolumny CP-Chirasil-Dex CB w trakcie jej eksploatacji, szczególnie widoczne w przypadku PCB 132 i 176, komplikowały wykonywanie oznaczeń końcowych i interpretację wyników. W związku z tym we wszystkich analizowanych ekstraktach oznaczono frakcje enancjomerycznej (EF) dla częściowo rozdzielonych ($R_{PA} = 0,56 - 0,83$) atropoizomerów PCB 91, 95, 136, 149 i 174.

Wartości EF (tabela 31) dla par poszczególnych atropoizomerów wyliczono na podstawie stosunków powierzchni:

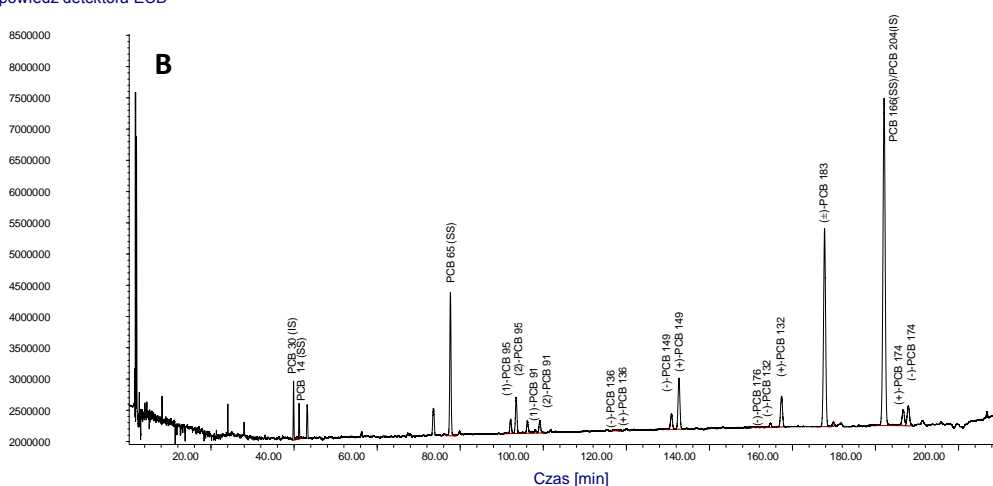
- a) pików pierwszego enancjomeru - dla izomerów o nieznaną kolejność elucji na kolumnie CP-Chirasil-Dex CB (PCB 91 i 95), lub
- b) (+)-enancjomeru (PCB 136, 149 i 174),

do sumy powierzchni pików obu enancjomerów na chromatogramie (str 17, pkt. 1.2.3.) [92]. Średnie wartości parametrów EF ($n=14$) oznaczone w roztworze wzorcowym, zawierającym mieszaninę racemicznych PCB 91, 95, 136, 149 i 174, wynosiły odpowiednio $0,49 \pm 0,01$, $0,50 \pm 0,01$, $0,51 \pm 0,01$, $0,50 \pm 0,01$, and $0,49 \pm 0,01$.

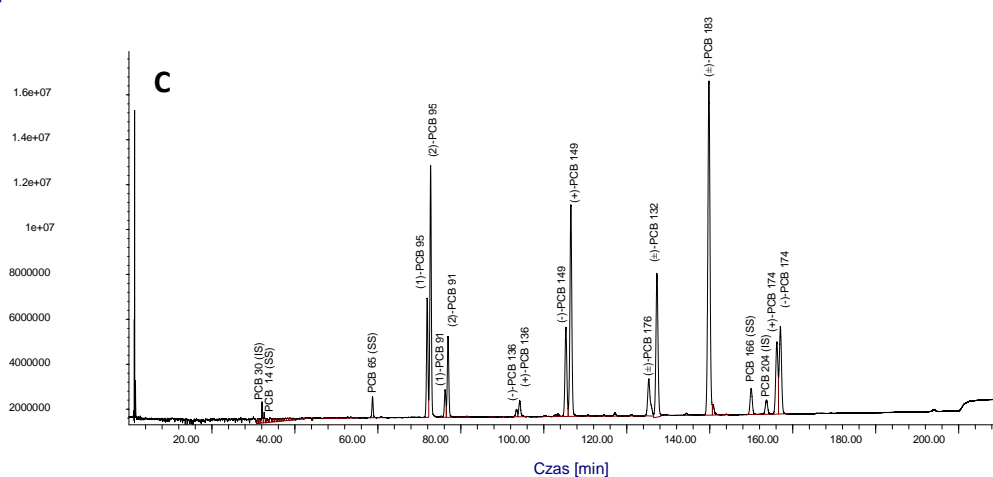
Odpowiedź detektora ECD



Odpowiedź detektora ECD



Odpowiedź detektora ECD



Rycina 19. Wpływ liczby nastryknięć na zdolność rozdzielczą kolumny CP-Chirasil-Dex CB:

- A) 10-te nastryknięcie - chromatogram GC- μ ECD roboczego roztworu wzorcowego PCB (tabela 9),
- B) 30-te nastryknięcie - chromatogram GC- μ ECD ekstraktu próbki nerek myszy z grupy badanej WT (pobranej 24 h po jednorazowym podaniu per os mieszaniny racemicznej wybranych chiralnych PCB w dawce 50 μ g/g m.c.),
- C) > 150-te nastryknięcie - chromatogram GC- μ ECD ekstraktu próbki tkanki tłuszczowej myszy z grupy badanej WT (pobranej 24 h po jednorazowym podaniu per os mieszaniny racemicznej wybranych chiralnych PCB w dawce 50 μ g/g m.c.).

2.4.6. Zapewnienie i kontrola jakości oznaczeń

Niewłaściwe postępowanie na jakimkolwiek etapie procedury analitycznej może być przyczyną tego, że wynik analizy będzie źródłem dezinformacji. W celu minimalizacji ryzyka popełnienia błędów laboratoryjnych stosowano zasady systemu zapewnienia i kontroli jakości wyników (QA/QC), m.in. takie jak:

- odpowiednie pobranie, zabezpieczenie i opisanie materiału biologicznego wg wytycznych IACUC,
- sprawdzanie czystości szkła laboratoryjnego (nastrzykiwanie do kolumny chromatograficznej zagęszczonego izooktanu po płukaniu szkła),
- okresowa weryfikacja rzetelności wskazań stosowanego przyrządu pomiarowego poprzez:
 - wyznaczanie wielopoziomowych krzywych kalibracyjnych dla sprawdzenia zakresu liniowości odpowiedzi detektora μ ECD do analizy ilościowej ($R^2 > 0,998$);
 - sprawdzanie stopnia zanieczyszczenia układu chromatograficznego (nastrzykiwanie heksanu co każdą nową sekwencją analizowanych ekstraktów);
 - sprawdzanie zdolności rozdzielczej kolumny CP-Chirasil-Dex CB (wyznaczenie wartości EF pików badanych analitów na chromatogramach roztworów wzorcowych, zawierających mieszaninę racemicznych atropizomerów PCB, nastrzykiwanych co każdą nową sekwencją analizowanych ekstraktów),
- stosowanie zwalidowanych i opisanych procedur przygotowania próbek do analizy GC- μ ECD (SOP_BM1_v2.0 - tkanki, organy, kał oraz SOP_BM2_v2.0 - krew, mocz) i oznaczania wybranych chiralnych kongenerów PCB w matrycach biologicznych,
- archiwizacja ok. połowy uzyskanego ekstraktu każdej próbki w razie konieczności wykonania ewentualnych powtórzeń analiz,
- odpowiednia archiwizacja uzyskanych wyników (oznaczeń) i dokumentacja etapów przygotowania każdej próbki do analizy,
- sprawdzanie rzetelności całego toku postępowania analitycznego poprzez:
 - analizę tła badanych ksenobiotyków w matrycach zwierząt z grup kontrolnych (dwie próbki odpowiedniego materiału biologicznego zwierząt z grup kontrolnych WT i KO były analizowane co 15 próbek matryc biologicznych zwierząt z grup badanych WT i KO). Wyniki zestawiono w tabeli 21;

- analizę próbek ślepych, w których matrycę biologiczną zastąpiono heksanem. Próby ślepe były wykonywane przy przygotowywaniu każdej nowej serii analizowanych ekstraktów (jedna próbka ślepa analizowana co 17 próbek matrycy biologicznych);
- dodawanie wzorców odzysku do każdej analizowanej próbki w celu śledzenia i oceny precyzji oraz dokładności uzyskiwanych wyników: odzysk PCB 166 z analizowanych tkanek, organów i kału wynosił $103\% \pm 12\%$ ($n=103$, w obliczeniach nie uwzględniono sześciu próbek kału, które na chromatogramach uzyskanych ekstraktów zawierały interferent koeluujący z pikiem wzorca odzysku) oraz $92\% \pm 8\%$ dla próbek krwi i moczu ($n=28$);
- korektę wyników oznaczeń PCB w próbce gdy odzysk PCB 166 $< 100\%$;
- obliczenie granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) tła laboratoryjnego (tabela 21) dla pików o czasach retencji poszczególnych analitów w próbach ślepych, poddanych procedurom przygotowania próbek do analiz GC- μ ECD (SOP_BM1_v2.0 i SOP_BM2_v2.0) równoległe z próbkami materiału biologicznego;
- wewnętrzną kontrolę dokładności oznaczeń na podstawie okresowych analiz przygotowanego materiału laboratoryjnego (wątroba szczura rasy Sprague-Dawley wzbogacona analitami na poziomie ok. 100ng/g; odzysk poszczególnych PCB w granicach 80-110%, $n=8$).

Tabela 21. Granice wykrywalności (LOD) oraz granice oznaczalności (LOQ) tła laboratoryjnego na podstawie analizy próbek ślepych oraz poziomy tła w matrycach zwierząt z grup kontrolnych WT i KO.

Piki na chromatogramach odpowiadające kongenerowi PCB	Metoda ekstrakcji i oczyszczania próbek tkanek/organów/kału (SOP_BM1_v2.0)			Metoda ekstrakcji i oczyszczania próbek krwi/moczu (SOP_BM2_v2.0)		
	LOD [ng] (n=11)	LOQ [ng]	Stężenia tła [ng/g m.m.] w tkankach/organach/kale myszy z grup kontrolnych WT i KO (n=15)	LOD [ng] (n=3)	LOQ [ng]	Stężenia tła [ng/g m.m.] w krwi i moczu myszy z grup kontrolnych WT i KO (n=4)
91	3,7	36,5	1,1 ± 0,7	4,8	48,3	8,2 ± 3,8
95	3,8	38,4	7,6 ± 5,2	4,3	43,2	7,3 ± 2,8
132	1,8	17,9	1,8 ± 1,9	5,0	50,4	6,7 ± 1,9
136	3,3	33,0	3,3 ± 3,9	6,6	65,6	0,6 ± 0,2
149	4,9	49,4	2,6 ± 1,5	3,9	38,7	1,8 ± 0,6
174	1,0	10,3	0,6 ± 0,3	8,8	88,3	0,6 ± 0,3
176	0,9	9,2	1,7 ± 1,9	5,0	49,8	0,4 ± 0,1
183	1,1	10,7	1,1 ± 0,7	7,8	77,6	0,7 ± 0,6

2.4.7. Ocena chemometryczna i statystyczna wyników

Chemometryczną i statystyczną analizę wyników oznaczeń poziomów analitów ($x_{sr} \pm SD$), wyrażonych w ng/g m.m., $\mu\text{g/g}$ tłuszczu, %TD oraz EF w matrycach zwierząt z grup badanych WT i KO przeprowadzono przy pomocy programu STATISTICA 8.0 PL (StatSoft Inc., Tulusa, OK, USA). Etapy analizy chemometrycznej i statystycznej przedstawiono w tabeli 22 a wyniki zestawiono w tabelach 25-42 i na ryc. 21-30).

Tabela 22. Etapy i cel przeprowadzanych analiz statystycznych i chemometrycznych.

Etap analizy	Cel
1. test Shapiro-Wilka	➤ weryfikacja normalności rozkładu danych w obrębie porównywanych grup
2. test Grubbsa	➤ ocena znamienności statystycznej (weryfikacja/odrzućenie wyników odbiegających istotnie od wartości średniej)
3. test Levene'a	➤ sprawdzenie założenia o równości (jednorodności) wariancji
4. analiza głównych składowych (PCA)	➤ redukcja liczby zmiennych (zdefiniowanie nowych zmiennych objaśniających), ➤ wykrycie struktury i ogólnych prawidłowości w związkach między zmiennymi, ➤ opis i klasyfikacja badanych obiektów w nowych (ortogonalnych) przestrzeniach zdefiniowanych przez nowe zmienne (główne składowe)
5. wielowymiarowy test T^2 Hotelling'a	➤ weryfikacja prawidłowości i powiązań, wykrytych techniką PCA dla poszczególnych zmiennych (porównanie poziomów poszczególnych PCB oznaczonych we wszystkich tkankach i organach między grupami badanych myszy WT i KO)
6. test t -Studenta dla zmiennych niepowiązanych	➤ statystyczna ocena różnic między średnimi poziomami poszczególnych analitów wyrażonych w ng/g m.m. lub $\mu\text{g/g}$ tłuszczu lub %TD lub EF w poszczególnych tkankach i organach myszy z grup badanych WT i KO (różnice międzygrupowe w obrębie danej matrycy)
7. ANOVA z testem <i>post-hoc</i> Tukey'a	➤ statystyczna ocena różnic między średnimi poziomami poszczególnych analitów wyrażonych w ng/g m.m. lub $\mu\text{g/g}$ tłuszczu lub %TD lub EF w obrębie wszystkich tkanek i organów myszy z grupy WT lub KO (różnice międzytkankowe w obrębie danej grupy)
8. test t -Studenta dla pojedynczej próby	➤ statystyczna ocena różnic między średnimi wartościami wyników oznaczeń EF poszczególnych par atropoizomerów PCB w tkankach i organach myszy WT lub KO a wartością EF=0,5 (dla racemicznej pary atropoizomerów)

Pierwszy etap obróbki danych stanowiła weryfikacja normalności rozkładu danych (poziomów PCB) w obrębie porównywanych grup przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Dla większości analizowanych zmiennych rozkład odbiegał istotnie od normalnego, dlatego

wyniki odstające od wartości średniej wykryto testem Grubbsa i wyeliminowano. Stąd też, w dalszych analizach nie zostały uwzględnione m.in. wyniki oznaczeń w tkankach i organach jednej myszy z grupy badanej WT, które z nieznanych przyczyn charakteryzowały się statystycznie istotnie zwiększoną zawartością PCB w porównaniu z matrycami pozyskanymi od pozostałych zwierząt z tej grupy. W końcowym etapie obróbki danych do analiz chemometrycznych i statystycznych porównano wariancje wyników oznaczeń poszczególnych PCB w analizowanych matrycach myszy WT i KO testem Levene'a i stwierdzono brak istotnych różnic między wariancjami zmiennych.

2.4.7.1. Analiza chemometryczna (wielowymiarowa)

W celu eksploracji i interpretacji wielowymiarowych matryc danych doświadczalnych, uzyskanych w wyniku oznaczeń PCB w badanym materiale biologicznym, spośród technik chemometrycznych (tabela 8) wybrano i zastosowano analizę głównych składowych (PCA) opartą na macierzy korelacji. Użycie macierzy korelacji pozwoliło na wstępną standaryzację wejściowego zbioru danych tak, aby każda zmienna miała na wejściu identyczną wariancję.

Analizie poddano cztery macierze danych wielowymiarowych, w których:

- wiersze, zwane obiektami, stanowiły próbki badanych matryc biologicznych, tj. tkanek tłuszczowych, krwi, mózgow, jelit, nerek, wątrób, moczu i kału myszy WT i KO,
- kolumny zawierały wyniki oznaczeń - poziomy analizowanych PCB.

Zastosowanie PCA do analizy doświadczalnego zbioru danych przedstawionego w formie macierzy D o wymiarach $n \times p$ (tabela 23), gdzie n stanowi liczbę obserwacji (wierszy), natomiast p jest liczbą zmiennych (kolumn), prowadzi do obliczenia macierzy ładunków głównych składowych L (ang. *principal component loadings*) oraz macierzy wartości głównych komponentów F (ang. *principal component scores*). Ładunki głównych składowych zawarte są w macierzy L o wymiarach $p \times k$ (tabela 24), zaś wartości komponentów są zawarte w macierzy F o wymiarach $n \times k$ (tabela 25), przy czym k oznacza liczbę ortogonalnych (wzajemnie nieskorelowanych) składowych głównych obliczoną dla danego zbioru. Zazwyczaj liczba głównych składowych jest równa lub mniejsza niż liczba zmiennych doświadczalnych p .

Tabela 23. Przykładowa macierz *D* do analizy PCA poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń [ng/g m.m.].

charakterystyka próbki			liczba zmiennych <i>p</i>							
lp.	rodzaj matrycy	grupa	PCB91	PCB95	PCB132	PCB136	PCB149	PCB174	PCB176	PCB183
1	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	9,03	29,82	14,28	2,61	27,72	7,96	1,17	7,41
2	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	9,62	28,53	13,55	2,87	27,30	9,49	1,23	7,40
3	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	9,60	26,81	14,36	3,10	28,27	9,32	1,31	7,23
4	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	8,85	28,76	14,17	2,30	26,79	9,79	1,24	8,10
5	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	9,81	29,25	14,46	2,58	26,42	9,29	1,14	7,05
6	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	10,27	30,64	14,22	2,48	25,60	8,57	1,02	7,18
7	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	9,63	28,48	14,09	2,87	26,33	10,22	1,33	7,04
8	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	10,20	33,89	13,70	2,22	25,21	6,09	0,78	7,91
9	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	11,18	30,28	13,93	3,44	25,54	7,87	1,09	6,68
10	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	10,55	30,96	13,89	2,65	25,58	7,61	0,98	7,79
11	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	10,72	30,28	13,78	2,95	25,63	8,11	1,10	7,44
12	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	9,66	31,75	14,36	1,71	25,42	7,01	0,77	9,32
13	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	10,29	30,67	14,39	2,46	24,87	8,27	0,99	8,06
14	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	10,32	29,26	14,04	2,81	25,09	9,86	1,26	7,36
15	krew	WT (wild-type)	7,26	23,60	11,44	0,91	23,87	5,77	0,75	26,41
16	krew	WT (wild-type)	6,50	21,06	13,75	0,28	21,26	6,13	11,00	20,03
17	krew	WT (wild-type)	6,46	20,81	11,48	0,94	23,25	8,92	4,41	23,72
18	krew	WT (wild-type)	7,36	27,05	10,81	1,34	22,07	5,84	5,63	19,90
19	krew	WT (wild-type)	7,16	24,18	11,85	1,09	22,22	5,89	9,40	18,21
20	krew	WT (wild-type)	7,90	26,86	11,16	0,81	23,19	5,13	1,50	23,46
21	krew	WT (wild-type)	7,58	26,99	11,33	1,01	24,59	5,29	4,05	19,16
22	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	7,30	21,01	13,54	1,02	17,65	5,58	9,86	24,05
23	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	5,83	19,42	12,48	0,77	24,08	6,55	2,40	28,48
24	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	6,39	19,55	12,73	1,18	19,13	6,14	8,02	26,86
25	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	5,69	21,34	12,13	0,66	26,12	6,66	2,11	25,28
26	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	6,83	22,99	11,02	0,24	17,66	4,25	7,40	29,60
27	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	7,18	23,58	10,41	1,04	17,15	4,36	7,22	29,05
28	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	7,78	24,75	12,07	1,02	21,88	6,27	6,04	20,18
29	mózg	WT (wild-type)	4,31	13,82	9,95	0,86	19,06	15,60	2,01	34,40
30	mózg	WT (wild-type)	4,13	13,78	10,29	1,61	19,51	15,21	1,78	33,70
31	mózg	WT (wild-type)	4,23	14,66	10,43	1,78	17,71	11,98	1,56	37,65
32	mózg	WT (wild-type)	4,23	13,34	10,77	0,81	21,63	15,96	1,73	31,53
33	mózg	WT (wild-type)	3,94	12,59	11,03	0,78	22,17	16,99	1,84	30,66
34	mózg	WT (wild-type)	3,92	12,47	10,16	0,71	20,86	16,32	1,97	33,60
35	mózg	WT (wild-type)	3,88	12,29	10,39	0,91	21,31	18,12	1,99	31,11
36	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	3,73	12,46	10,21	0,86	20,10	15,69	1,87	35,09
37	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	3,96	12,90	10,34	0,87	18,60	13,98	1,96	37,39
38	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	4,15	13,19	10,89	0,99	20,29	14,75	1,97	33,75
39	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	4,32	13,44	10,44	0,95	19,55	15,88	2,10	33,32
40	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	3,60	11,72	9,00	1,70	16,88	13,42	1,69	41,99
41	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	3,12	9,91	8,18	1,22	15,92	16,11	1,95	43,60
42	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	3,43	11,55	9,66	1,02	20,40	17,29	1,87	34,79
43	jelita	WT (wild-type)	7,91	27,65	12,93	2,64	27,17	7,96	1,19	12,56
44	jelita	WT (wild-type)	8,10	28,95	12,74	2,73	26,60	7,84	1,20	11,83
45	jelita	WT (wild-type)	8,00	28,06	13,00	2,63	27,78	9,08	1,31	10,15
46	jelita	WT (wild-type)	8,76	29,18	12,50	2,41	25,95	10,03	1,12	10,05
47	jelita	WT (wild-type)	8,65	28,37	13,39	2,48	27,57	9,86	1,25	8,44
48	jelita	WT (wild-type)	8,01	27,04	12,89	2,70	27,84	10,63	1,42	9,46
49	jelita	WT (wild-type)	9,04	30,68	12,55	2,50	26,29	9,07	1,06	8,81
50	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	8,67	31,52	12,91	2,37	24,85	6,80	1,01	11,87
51	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	8,76	31,55	13,01	2,37	26,45	7,02	0,98	9,87
52	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	8,59	30,79	13,01	2,16	25,79	7,17	0,97	11,52
53	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	8,45	30,47	13,22	2,24	26,68	7,24	0,98	10,71
54	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	9,36	31,68	13,03	1,89	24,79	6,77	0,83	11,66
55	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	8,48	28,27	12,95	2,27	25,27	7,42	0,91	13,93
56	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	8,81	30,60	12,96	2,21	26,77	8,03	0,99	9,63
57	nerki	WT (wild-type)	6,93	22,92	14,53	1,65	28,49	9,01	1,28	15,19
58	nerki	WT (wild-type)	6,21	21,78	13,97	1,29	25,84	8,17	2,81	19,93
59	nerki	WT (wild-type)	5,01	16,13	14,53	1,24	29,55	11,29	3,63	18,63
60	nerki	WT (wild-type)	7,31	20,13	13,58	1,24	27,09	10,35	1,92	18,39
61	nerki	WT (wild-type)	5,40	18,16	14,36	1,40	29,33	9,60	2,68	19,08
62	nerki	WT (wild-type)	6,32	19,38	14,12	0,99	26,90	7,90	1,12	23,27
63	nerki	WT (wild-type)	6,96	23,30	14,23	1,32	30,67	8,24	1,07	14,21
64	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	5,79	20,16	17,75	1,47	24,80	5,48	5,11	19,45
65	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	6,03	21,04	14,17	1,29	29,40	8,55	1,20	18,31
66	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	7,02	23,40	13,32	1,09	25,83	7,91	1,72	19,71
67	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	6,77	22,72	14,07	1,19	26,96	8,77	1,51	18,01
68	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	6,68	21,73	14,17	1,53	29,04	9,94	1,60	15,31
69	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	7,14	21,67	14,89	1,47	30,11	9,32	1,35	14,05
70	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	5,88	19,18	14,93	1,38	31,21	10,20	2,09	15,13
71	wątroba	WT (wild-type)	5,05	16,40	11,88	0,68	19,42	4,41	0,52	41,64
72	wątroba	WT (wild-type)	5,52	17,98	13,03	0,62	20,58	3,99	0,46	37,83
73	wątroba	WT (wild-type)	5,12	16,29	12,07	0,59	18,95	4,19	0,42	42,36
74	wątroba	WT (wild-type)	5,17	15,36	12,81	0,55	22,19	5,32	0,45	38,16
75	wątroba	WT (wild-type)	4,92	15,12	13,66	0,49	23,38	5,17	0,43	36,84
76	wątroba	WT (wild-type)	4,85	13,95	12,34	0,51	21,84	4,63	0,37	41,51
77	wątroba	WT (wild-type)	5,32	16,44	12,99	0,69	23,04	5,28	0,46	35,79
78	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	4,80	15,09	10,47	0,53	14,94	2,98	0,39	50,81
79	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	5,04	16,30	12,36	0,74	20,49	4,82	0,47	39,79
80	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	5,40	17,15	11,85	0,88	17,67	4,27	0,47	42,31
81	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	5,14	16,65	12,76	0,76	20,21	4,73	0,48	39,27
82	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	4,71	14,40	11,37	0,44	17,72	3,47	0,33	47,56
83	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	4,17	12,80	9,94	0,38	14,82	3,33	0,29	54,27
84	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	4,63	13,42	12,22	0,48	21,88	4,85	0,40	42,12
85	mocz 0-12 h	WT (wild-type)	48,78	8,33	16,28	0,51	15,25	4,51	1,17	5,17
86	mocz 0-12 h	WT (wild-type)	46,07	10,37	14,56	0,66	15,48	5,74	2,28	4,83
87	mocz 0-12 h	KO (mdr1a/b (-/-))	47,27	6,68	17,05	0,55	17,57	4,80	1,24	4,83
88	mocz 0-12 h	KO (mdr1a/b (-/-))	44,24	7,75	17,93	0,43	17,24	4,79	1,46	6,15
89	mocz 12-24 h	WT (wild-type)	50,63	12,87	14,51	0,81	10,13	3,31	1,52	6,22
90	mocz 12-24 h	WT (wild-type)	50,33	11,60	15,62	0,44	10,54	2,84	1,22	7,41
91	mocz 12-24 h	KO (mdr1a/b (-/-))	33,59	15,35	16,19	2,01	16,02	6,42	2,21	8,19
92	mocz 12-24 h	KO (mdr1a/b (-/-))	32,27	18,95	17,16	1,31	11,09	7,62	2,11	9,48
93	kał 0-12 h	WT (wild-type)	7,02	19,86	12,61	5,41	30,06	16,00	3,60	5,45
94	kał 0-12 h	WT (wild-type)	5,77	16,60	12,52	4,66	31,83	18,39	3,64	6,59
95	kał 0-12 h	KO (mdr1a/b (-/-))	10,21	25,85	11,82	7,80	21,82	14,41	3,14	4,95
96	kał 0-12 h	KO (mdr1a/b (-/-))	7,40	20,65	12,82	5,66	28,43	16,12	3,38	5,54
97	kał 12-24 h	WT (wild-type)	5,24	15,49	12,37	5,00	29,95	16,42	7,02	8,52
98	kał 12-24 h	WT (wild-type)	5,10	16,40	12,28	3,08	28,42	17,81	4,88	12,03
99	kał 12-24 h	KO (mdr1a/b (-/-))	6,80	18,16	12,82	5,76	29,07	16,52	3,96	6,92
100	kał 12-24 h	KO (mdr1a/b (-/-))	6,98	19,26	12,87	5,49	28,82	15,97	3,94	6,57
101	roztwór olejowy PCB	per os mixture	6,98	20,11	13,34	6,15	30,13	14,86	3,43	5,01
102	roztwór olejowy PCB	per os mixture	6,72	19,81	12,74	5,76	31,74	14,84	3,42	4,97
103	roztwór olejowy PCB	per os mixture	6,74	19,82	12,65	5,96	31,65	14,78	3,42	4,97

Pierwsza główna składowa (PC1) jest kombinacją zmiennych charakteryzujących się największą wariancją, tzn. wyjaśnia największą część zmienności w poziomach badanych PCB. Natomiast druga składowa (PC2) jest kombinacją zmiennych oryginalnych pomniejszonych o tę część zmienności, która definiowała PC1, a która cechuje się największą wariancją dla wszystkich funkcji liniowych tych zmiennych. Ponadto PC2 jest ortogonalna (wzajemnie nieskorelowana) względem PC1. Kolejne główne składowe (PC3→PC7) zostały definiowane w analogiczny sposób.

Tabela 24. Przykładowa macierz L ładunków głównych składowych, otrzymana w toku analizy PCA poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń [ng/g m.m.].

		liczba głównych składowych k						
		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
liczba zmiennych P	PCB 91	-0.10	0.87	-0.41	0.14	-0.17	-0.07	-0.12
	PCB 95	0.67	0.07	0.60	-0.25	-0.31	-0.15	0.09
	PCB 132	0.38	0.82	-0.01	0.02	0.37	0.08	0.19
	PCB 136	0.81	-0.22	-0.29	0.13	-0.25	0.36	0.02
	PCB 149	0.83	-0.29	0.24	0.07	0.37	-0.01	-0.19
	PCB 174	0.34	-0.64	-0.54	0.32	0.05	-0.24	0.12
	PCB 174	0.10	-0.17	-0.46	-0.86	0.08	-0.01	-0.01
	PCB 183	-0.84	-0.46	0.20	0.01	0.10	0.16	0.05

Tabela 25. Przykładowa macierz *F* wartości głównych składowych, obliczona w toku analizy PCA poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń [ng/g m.m.].

lp.	Charakterystyka próbki		Liczba głównych składowych <i>k</i>						
	rodzaj matrycy	grupa	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
1	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	1,75	0,67	0,95	0,14	-0,07	-0,09	0,12
2	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	1,69	0,31	0,58	0,30	-0,30	-0,16	0,01
3	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	1,86	0,50	0,44	0,35	0,11	0,10	0,07
4	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	1,54	0,48	0,67	0,25	-0,02	-0,39	0,31
5	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	1,67	0,69	0,67	0,27	-0,12	-0,23	0,38
6	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	1,56	0,77	0,85	0,19	-0,37	-0,28	0,37
7	tk. tłuszczowa	WT (wild-type)	1,71	0,44	0,42	0,30	-0,23	-0,20	0,34
8	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	1,41	0,92	1,49	-0,05	-0,76	-0,28	0,16
9	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	1,78	0,72	0,69	0,22	-0,70	0,22	0,21
10	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	1,51	0,76	0,97	0,14	-0,55	-0,12	0,20
11	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	1,60	0,65	0,77	0,18	-0,60	-0,03	0,18
12	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	1,22	0,99	1,34	0,06	-0,24	-0,43	0,36
13	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	1,46	0,87	0,88	0,17	-0,40	-0,21	0,49
14	tk. tłuszczowa	KO (mdr1a/b (-/-))	1,57	0,55	0,47	0,26	-0,43	-0,22	0,44
15	krew	WT (wild-type)	-0,73	-0,21	1,25	0,14	-0,34	-0,12	-0,53
16	krew	WT (wild-type)	-0,49	0,16	-1,07	-4,10	0,86	-0,27	0,26
17	krew	WT (wild-type)	-0,57	-0,69	-0,09	-1,06	0,00	-0,40	-0,31
18	krew	WT (wild-type)	-0,26	-0,47	0,32	-2,02	-0,87	-0,29	-0,49
19	krew	WT (wild-type)	-0,19	-0,32	-0,62	-3,50	-0,11	-0,24	-0,34
20	krew	WT (wild-type)	-0,58	-0,11	1,36	-0,36	-0,71	-0,34	-0,54
21	krew	WT (wild-type)	-0,10	-0,21	0,83	-1,38	-0,46	-0,36	-0,68
22	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	-0,86	0,24	-1,05	-3,64	0,20	0,22	0,61
23	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	-0,85	-0,21	0,62	-0,35	0,44	0,07	-0,26
24	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	-0,97	-0,17	-0,76	-2,75	0,13	0,30	0,27
25	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	-0,49	-0,31	0,88	-0,28	0,42	-0,20	-0,55
26	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,65	-0,34	-0,02	-2,88	-0,58	-0,16	-0,14
27	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,47	-0,54	-0,13	-2,76	-1,06	0,10	-0,23
28	krew	KO (mdr1a/b (-/-))	-0,34	-0,11	0,04	-2,09	-0,27	-0,27	-0,16
29	mózg	WT (wild-type)	-1,76	-1,96	-0,87	0,61	-0,29	-0,73	0,21
30	mózg	WT (wild-type)	-1,43	-1,89	-0,90	0,75	-0,34	-0,32	0,25
31	mózg	WT (wild-type)	-1,80	-1,53	-0,48	0,56	-0,61	0,21	0,31
32	mózg	WT (wild-type)	-1,32	-1,77	-0,82	0,80	0,24	-0,78	0,15
33	mózg	WT (wild-type)	-1,20	-1,81	-0,99	0,86	0,45	-0,88	0,23
34	mózg	WT (wild-type)	-1,61	-2,03	-0,95	0,73	0,10	-0,83	0,08
35	mózg	WT (wild-type)	-1,30	-2,12	-1,22	0,89	0,19	-0,98	0,23
36	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,72	-1,98	-0,89	0,73	0,00	-0,64	0,16
37	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,99	-1,75	-0,72	0,54	-0,16	-0,39	0,25
38	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,53	-1,64	-0,79	0,61	0,11	-0,48	0,27
39	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,58	-1,84	-0,96	0,62	-0,09	-0,69	0,30
40	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	-2,35	-2,24	-0,83	0,69	-0,83	0,12	0,04
41	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	-2,73	-2,76	-1,25	0,78	-0,86	-0,36	0,07
42	mózg	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,67	-2,35	-1,15	0,89	-0,08	-0,76	0,06
43	jelita	WT (wild-type)	1,22	0,08	0,86	0,18	-0,32	0,04	-0,22
44	jelita	WT (wild-type)	1,26	0,08	0,92	0,12	-0,55	1,00	-0,19
45	jelita	WT (wild-type)	1,45	0,02	0,74	0,21	-0,26	-0,17	-0,19
46	jelita	WT (wild-type)	1,24	-0,07	0,68	0,28	-0,64	-0,48	-0,05
47	jelita	WT (wild-type)	1,55	0,17	0,65	0,28	-0,17	-0,36	-0,02
48	jelita	WT (wild-type)	1,51	-0,17	0,43	0,32	-0,21	-0,30	-0,15
49	jelita	WT (wild-type)	1,39	0,08	0,90	0,19	-0,74	-0,43	-0,12
50	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	1,08	0,40	1,24	-0,02	-0,81	-0,14	0,03
51	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	1,34	0,40	1,27	0,03	-0,63	-0,22	-0,12
52	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	1,11	0,38	1,22	0,04	-0,58	-0,25	-0,04
53	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	1,27	0,40	1,21	0,08	-0,43	-0,21	-0,09
54	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	0,94	0,54	1,35	0,01	-0,71	-0,37	0,04
55	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	0,89	0,27	1,05	0,17	-0,52	-0,09	-0,02
56	jelita	KO (mdr1a/b (-/-))	1,32	0,29	1,11	0,13	-0,50	-0,38	-0,13
57	nerki	WT (wild-type)	0,92	0,36	0,64	0,33	0,91	-0,13	0,07
58	nerki	WT (wild-type)	0,23	0,17	0,39	-0,41	0,75	-0,06	0,13
59	nerki	WT (wild-type)	0,56	-0,23	-0,39	-0,27	1,80	-0,18	-0,04
60	nerki	WT (wild-type)	0,32	-0,08	0,18	0,21	0,83	-0,36	-0,06
61	nerki	WT (wild-type)	0,55	-0,04	0,11	-0,06	1,48	-0,01	-0,13
62	nerki	WT (wild-type)	-0,07	0,23	0,70	0,36	1,08	0,02	-0,01
63	nerki	WT (wild-type)	1,01	0,33	0,94	0,35	1,08	-0,27	-0,35
64	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	0,53	1,48	0,03	-1,48	1,91	0,75	1,14
65	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	0,60	0,16	0,74	0,37	1,15	-0,11	-0,20
66	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	0,14	0,14	0,76	-0,05	0,42	-0,27	-0,06
67	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	0,44	0,26	0,67	0,16	0,77	-0,27	0,09
68	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	0,87	0,10	0,43	0,30	1,01	-0,27	-0,07
69	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	1,05	0,42	0,57	0,38	1,31	-0,20	-0,05
70	nerki	KO (mdr1a/b (-/-))	1,03	0,16	0,25	0,23	1,72	-0,19	-0,13
71	wątroba	WT (wild-type)	-2,24	-0,26	1,01	0,31	0,00	0,70	-0,02
72	wątroba	WT (wild-type)	-1,79	0,22	1,18	0,27	0,32	0,65	0,17
73	wątroba	WT (wild-type)	-2,34	-0,16	1,05	0,32	0,03	0,73	0,07
74	wątroba	WT (wild-type)	-1,78	-0,08	0,93	0,48	0,65	0,57	-0,06
75	wątroba	WT (wild-type)	-1,54	0,17	0,98	0,50	1,05	0,61	0,05
76	wątroba	WT (wild-type)	-2,13	-0,23	0,96	0,49	0,60	0,73	-0,22
77	wątroba	WT (wild-type)	-1,48	0,00	0,99	0,46	0,66	0,54	-0,09
78	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	-3,41	-0,58	1,07	0,22	-0,71	0,97	-0,01
79	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,98	-0,16	0,97	0,38	0,24	0,68	0,02
80	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	-2,35	-0,19	0,98	0,29	-0,30	0,80	0,19
81	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,91	0,00	0,98	0,36	0,29	0,71	0,17
82	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	-2,95	-0,39	1,06	0,34	-0,10	0,89	-0,07
83	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	-3,79	-0,89	0,96	0,35	-0,64	1,00	-0,16
84	wątroba	KO (mdr1a/b (-/-))	-2,19	-0,32	0,91	0,51	0,63	0,72	-0,25
85	mocz 0-12 h	WT (wild-type)	-1,48	4,46	-2,02	0,85	0,05	-0,15	-0,49
86	mocz 0-12 h	WT (wild-type)	-1,39	3,59	-2,13	0,37	-0,46	-0,44	-0,78
87	mocz 0-12 h	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,20	4,48	-2,06	0,93	0,67	-0,02	-0,49
88	mocz 0-12 h	KO (mdr1a/b (-/-))	-1,12	4,57	-1,89	0,75	0,95	0,04	-0,03
89	mocz 12-24 h	WT (wild-type)	-1,96	4,30	-1,91	0,42	-1,42	-0,21	-0,44
90	mocz 12-24 h	WT (wild-type)	-2,04	4,67	-1,79	0,54	-0,88	-0,13	-0,21
91	mocz 12-24 h	KO (mdr1a/b (-/-))	-0,43	3,13	-1,52	0,25	-0,23	0,32	0,45
92	mocz 12-24 h	KO (mdr1a/b (-/-))	-0,80	3,49	-1,39	0,12	-0,48	-0,14	1,59
93	kał 0-12 h	WT (wild-type)	2,62	-1,28	-1,56	0,34	-0,05	0,54	-0,23
94	kał 0-12 h	WT (wild-type)	2,44	-1,66	-1,83	0,57	0,59	0,08	-0,35
95	kał 0-12 h	KO (mdr1a/b (-/-))	2,72	-1,02	-1,71	0,33	-2,25	1,49	0,51
96	kał 0-12 h	KO (mdr1a/b (-/-))	2,61	-1,15	-1,60	0,42	-0,29	0,63	0,06
97	kał 12-24 h	WT (wild-type)	2,21	-1,73	-2,45	-0,95	0,51	0,56	-0,37
98	kał 12-24 h	WT (wild-type)	1,36	-1,62	-1,80	-0,18	0,66	-0,45	-0,08
99	kał 12-24 h	KO (mdr1a/b (-/-))	2,54	-1,34	-1,90	0,31	-0,02	0,78	-0,04
100	kał 12-24 h	KO (mdr1a/b (-/-))	2,50	-1,21	-1,72	0,21	-0,04	0,66	-0,03
101	roztwór olejowy PCB	per os mixture	2,93	-1,00	-1,51	0,39	-0,04	1,06	-0,08
102	roztwór olejowy PCB	per os mixture	2,88	-1,22	-1,38	0,38	0,07	0,84	-0,46
103	roztwór olejowy PCB	per os mixture	2,92	-1,25	-1,42	0,39	-0,02	0,93	-0,48

Wyniki obliczeń PCA zestawiono w tabeli 26. Podano w niej wymiary macierzy badanych zależności oraz wartości własne i procent całkowitej wariancji, wyjaśnionej przez pierwsze trzy główne składowe (PC).

Tabela 26. Wymiary macierzy i wyniki obliczeń PCA dla analizowanych poziomów PCB.

Poziomy PCB	Wymiary macierzy $n \times p$	Wartość własne			Wariancja [%]			Skumulowana wariancja [%]	
		PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3	PC1 i PC2	PC1, PC2 i PC3
znormalizowane na sumę stężeń PCB [ng/g m.m.]	103 x 8	2,78	2,21	1,26	34,75	27,64	15,26	62,38	71,65
znormalizowane na sumę stężeń PCB [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]	92 x 8	4,07	1,70	1,01	50,91	21,22	12,61	72,15	84,75
[%TD]	100 x 8	7,47	0,37	0,12	93,38	4,61	1,51	98,00	99,50
EF	78 x 5	4,38	0,43	0,15	87,59	8,63	2,98	96,22	99,20

Z analizy danych zestawionych w tabeli 26 wynika, że za pomocą PC1 można opisać największą część rozpatrywanej zmienności w oznaczonych poziomach PCB, wyrażonych jako %TD i EF (>87% całkowitej wariancji), nieco mniejszą w przypadku poziomów analitów znormalizowanych na sumę stężeń PCB wyrażonych w $\mu\text{g/g}$ tłuszczu (50,91% wariancji), a najmniejszą w przypadku poziomów analitów znormalizowanych na sumę stężeń PCB wyrażonych w ng/g m.m. (34,75% wariancji). W wyjaśnieniu zmienności dwóch ostatnich znaczny udział bierze druga składowa (PC2), wynosząca odpowiednio: 21,22% i 27,64% wariancji. Ponadto dla każdego z nich trzecia składowa wyjaśnia ponad 12% zmienności. PC1 i PC2 opisują łącznie > 62% badanej zmienności dla wszystkich typów poziomów PCB.

Zastosowanie PCA umożliwiło redukcję liczby zmiennych doświadczalnych definiując nowe zmienne objaśniające, tzw. główne składowe (PC) oraz pozwoliło na przedstawienie trudnych do wyobrażenia zjawisk zachodzących w wielowymiarowej macierzy danych doświadczalnych na przejrzystych dwuwymiarowych wykresach (ryciny 20-27). W ramach niniejszej pracy przedstawiono rozmieszczenie analizowanych próbek badanego materiału biologicznego w układzie dwuwymiarowym (PC1 vs PC2, ryciny 20, 22, 24 i 26), podobnie jak wykresy prezentujące wpływ zmiennych oryginalnych na dwie pierwsze główne składowe (wykresy ładunków głównych, ryciny 21, 23, 25 i 27).

Kolejnym etapem analizy wielowymiarowej było zastosowanie testu T^2 Hotelling'a (opartego o rozkład F , $\alpha=0,05$) w celu weryfikacji prawidłowości i powiązań, wykrytych

techniką PCA dla poszczególnych zmiennych. Wykonano porównanie poziomów poszczególnych PCB oznaczonych we wszystkich tkankach i organach między grupami badanych myszy WT i KO. Wyniki analizy porównawczej zestawiono w tabelach 27-33.

2.4.7.2. Analiza statystyczna

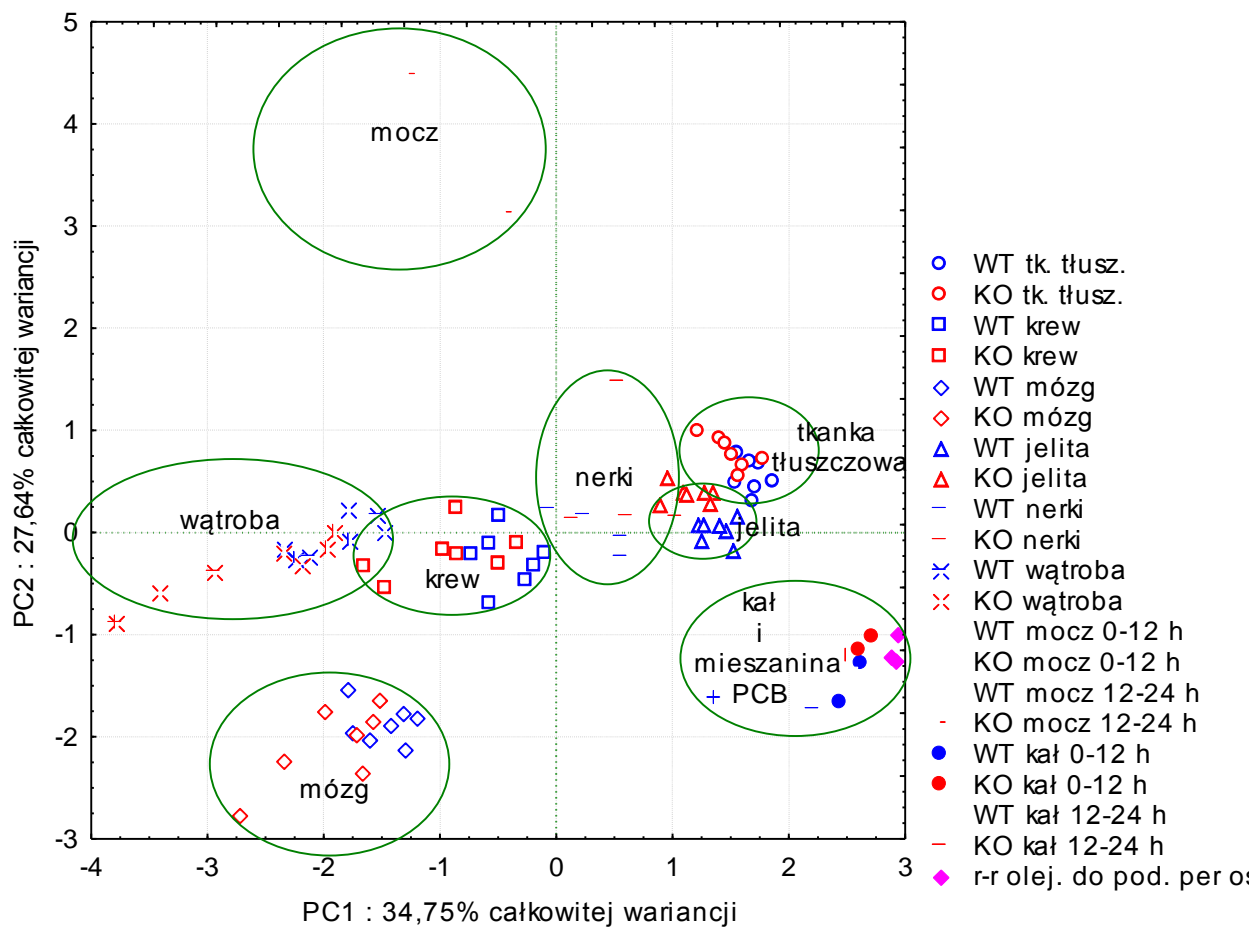
W kolejnym etapie dokonano oceny statystycznej różnic między średnimi poziomami poszczególnych analitów wyrażonych w ng/g m.m. lub $\mu\text{g/g}$ tłuszczu lub %TD lub EF:

- w poszczególnych tkankach i organach grup badanych myszy WT i KO (różnice międzygrupowe w obrębie danej matrycy) - test *t*-Studenta dla zmiennych niepowiązanych,
- w obrębie tkanek i organów zwierząt z grupy WT lub grupy KO (różnice międzytkankowe w obrębie danej grupy) - analiza wariacji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów z oceną różnic między średnimi za pomocą testu wielokrotnych porównań (*post-hoc*) Tukey'a,

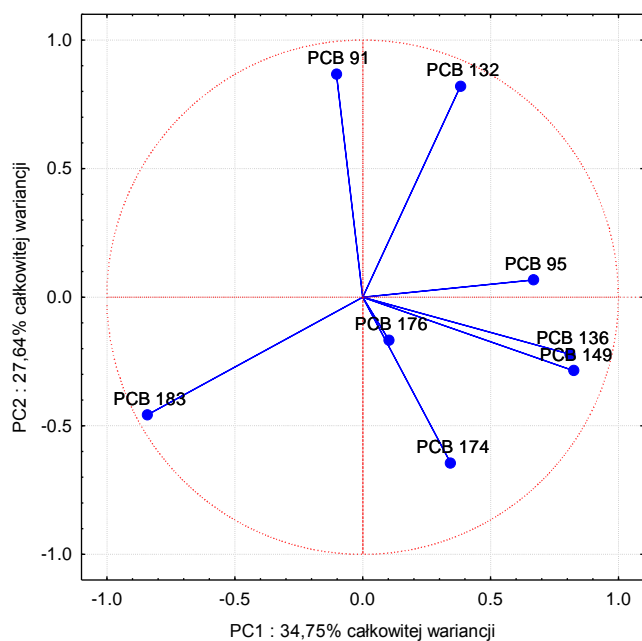
Ponadto testem *t*-Studenta dla pojedynczej próby porównano średnie wartości EF wyznaczone dla poszczególnych par atropoizomerów PCB w matrycach biologicznych z wartością EF równomolowej zawartości odpowiedniej pary enancjomerów w mieszaninie racemicznej (EF=0,5).

We wszystkich zastosowanych testach hipoteza zerowa (H_0) zakładała brak istotnych różnic między wartościami średnimi w porównywanych grupach (testów statystycznych nie stosowano do oceny wyników uzyskanych dla wydaliny zebranych w interwałach dwunastogodzinnych, ponieważ w każdej grupie badanych myszy liczba zebranych próbek wynosiła $n=2$). Jako istotny statystycznie przyjęto poziom prawdopodobieństwa $p \leq 0,05$ przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. Wyniki oceny statystycznej dla uzyskanych danych przedstawiono w rozdziale VI, w tabelach 27-47 oraz na ryc. 29-30.

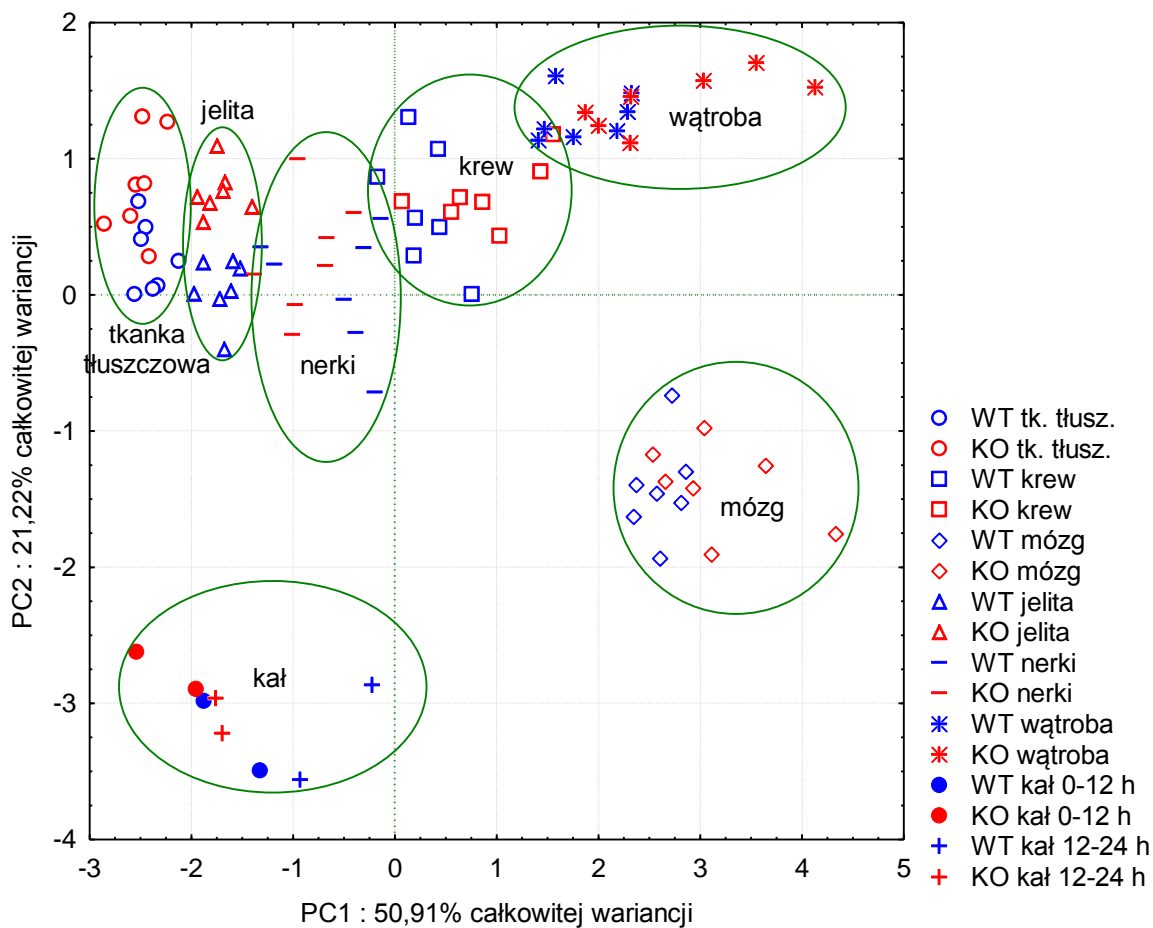
VI. WYNIKI



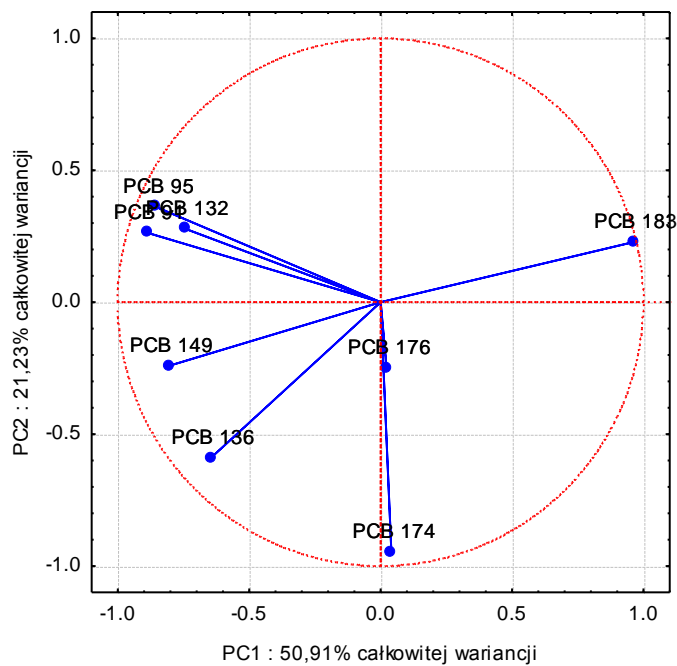
Rycina 20. Wykres PC1 względem PC2 dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych w [ng/g m.m.].



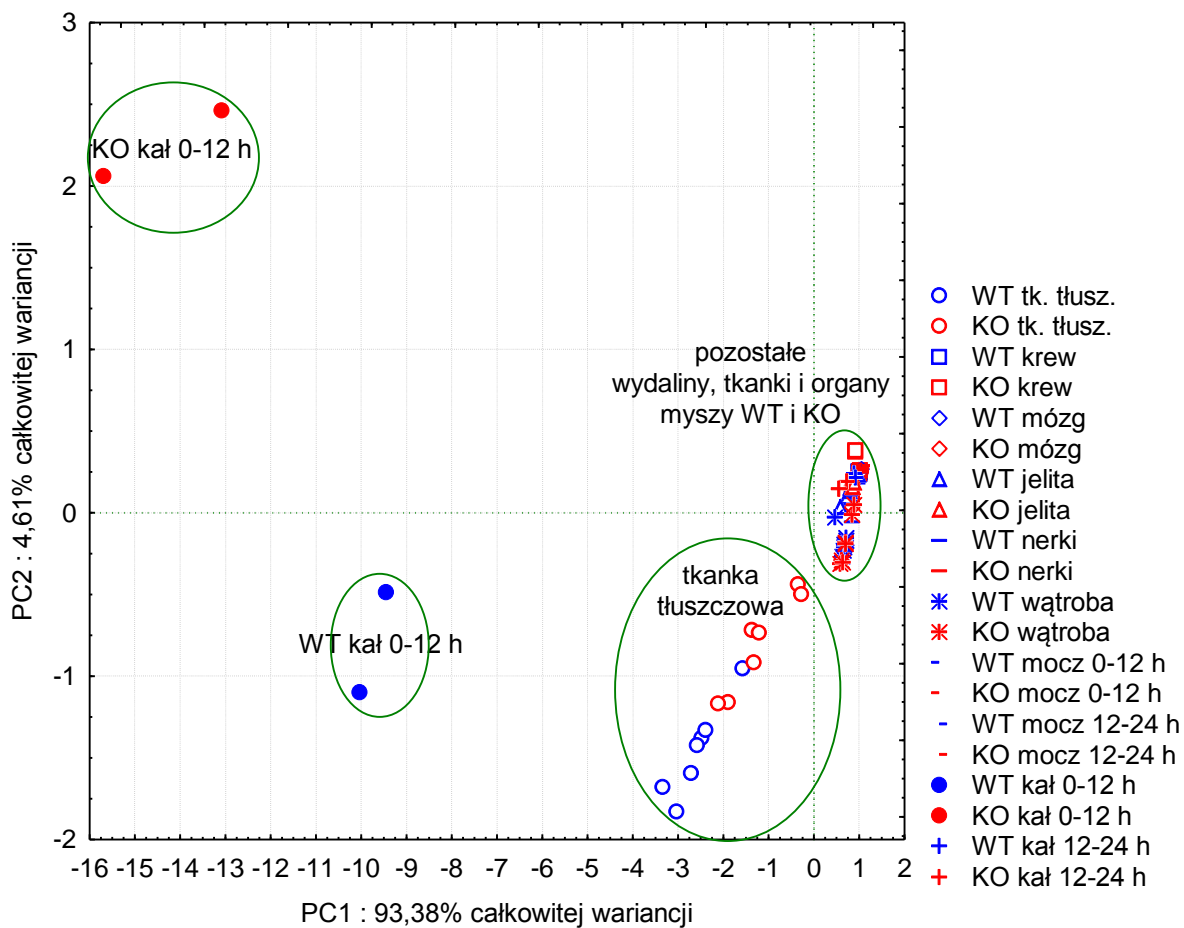
Rycina 21. Wykres ładunków głównych dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych w [ng/g m.m.].



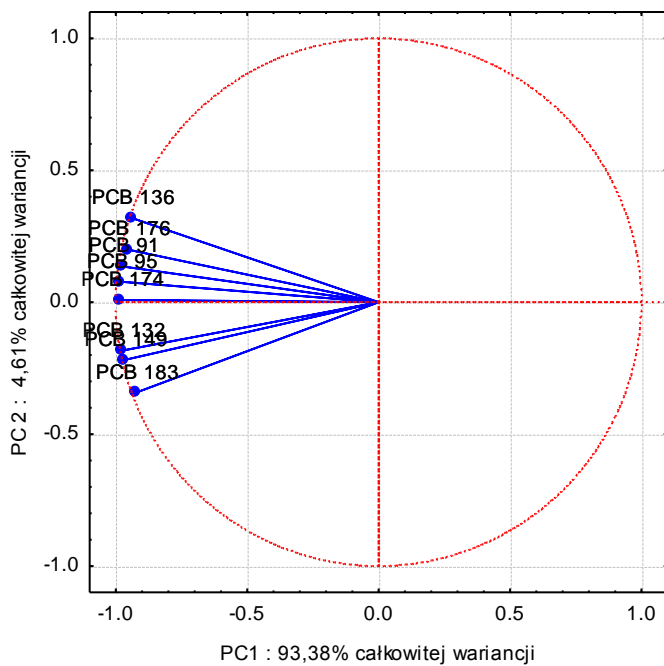
Rycina 22. Wykres PC1 względem PC2 dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych w [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu].



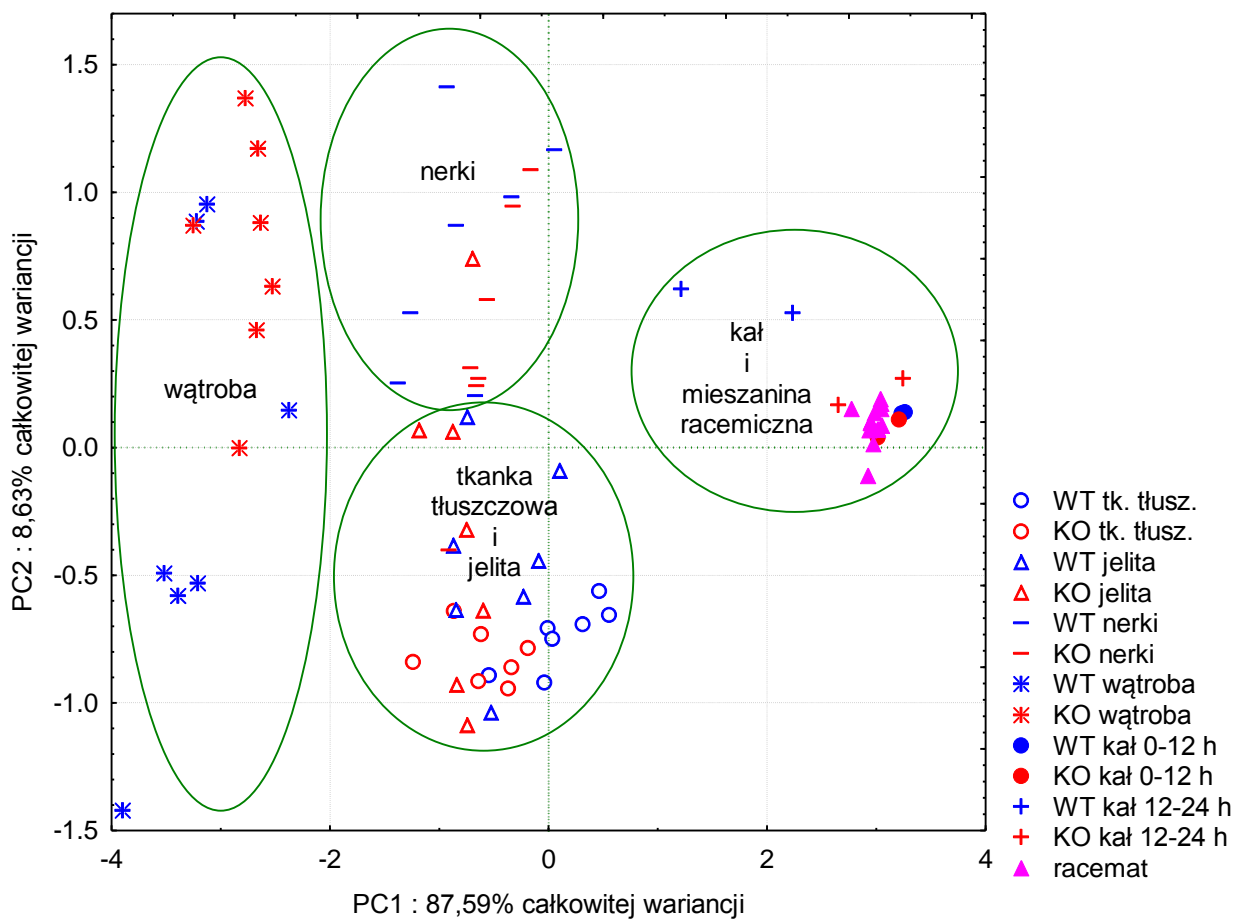
Rycina 23. Wykres ładunków głównych dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych w [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu].



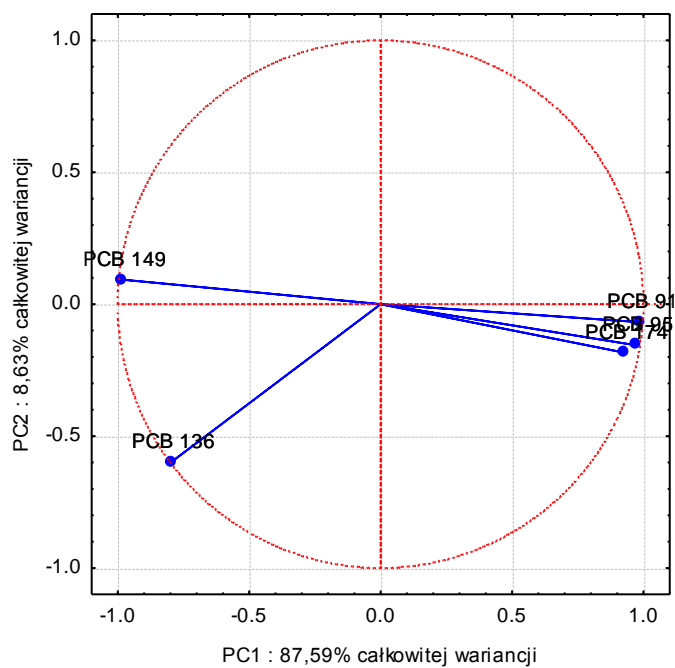
Rycina 24. Wykres PC1 względem PC2 dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 wyrażonych jako % ułamek całkowitej dawki *per os* poszczególnego kongeneru [%TD].



Rycina 25. Wykres ładunków głównych dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 wyrażonych jako % ułamek całkowitej dawki *per os* poszczególnego kongeneru [%TD].



Rycina 26. Wykres PC1 względem PC2 dla frakcji enancjomerycznych (EF) PCB 91, 95, 136, 149, i 176.



Rycina 27. Wykres ładunków głównych dla frakcji enancjomerycznych (EF) PCB 91, 95, 136, 149, i 176.

Tabela 27. Poziomy [ng/g m.m.] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 91, 95, 132 i 136 w tkankach, organach, krwi, moczu i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).

Matryca	PCB 91 [ng/g m.m.]		PCB 95 [ng/g m.m.]		PCB 132 [ng/g m.m.]		PCB 136 [ng/g m.m.]	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Tk. tłuszczowa	2450±301*	1740±587	7420±1000**	5080±1500	3650±531**	2310±711	694±132*	448±195
Krew	21,8±3,0	18,6±2,8 [#]	74,2±12,2	61,2±12,2	35,8±6,8	33,9±7,6	2,8±1,1 [#]	2,8±0,04 [#]
Mózg	28,4±9,9	25,0±8,9	91,3±29,9	81,0±28,6	73,4±28,1	65,7±24,0	6,7±1,7 [#]	6,8±1,4 [#]
Jelita	145±64,9	104±34,1	491±209	367±126	220±92,3	155±53,5	43,6±16,5*	26,5±9,7
Nerki	79,9±23,7	84,7±32,6	259±84,1	277±97,6	180±47,3	190±73,1	16,9±6,0	17,7±7,7
Wątroba	92,0±11,6	78,7±35,2	285±34,5	247±115	227±27,7	190±91,1	10,6±1,9	10,2±6,2
Wartość poziomu prawdopodobieństwa p testu wielowymiarowego T^2 Hotelling'a ($\alpha=0,05$) ^a	0,19		0,03		0,09		0,12	
Mocz ^b (0-12 h)	21,8 (22,2; 21,3)	47,6 (52,7; 42,5)	4,3 (3,8; 4,8)	7,4 (7,4; 7,4)	7,1 (7,4; 6,7)	18,1 (19,0; 17,2)	0,3 [#] (0,2; 0,3)	0,5 [#] (0,6; 0,4)
Mocz ^b (12-24 h)	13,9 (13,6; 14,2)	13,1 (13,2; 12,9)	3,4 (3,5; 3,3)	6,8 (6,0; 7,6)	4,1 (3,9; 4,4)	6,6 (6,4; 6,9)	0,2 [#] (0,2; 0,1)	0,7 [#] (0,8; 0,5)
Kał ^b (0-12 h)	7800 (10700; 4800)	18200 (16100; 20300)	22100 (30300; 14000)	48600 (40700; 56600)	14900 (19200; 10500)	26900 (18600; 35100)	6080 (8240; 3920)	13900 (12300; 15500)
Kał ^b (12-24 h)	124 (164; 83,7)	490 (440; 541)	377 (484; 269)	1330 (1180; 1490)	294 (386; 201)	914 (831; 996)	103 (156; 50,5)	399 (373; 425)

^a pogrubioną czcionką zaznaczono $p < 0,05$.

^b zbiorcze próbki moczu i kału (interwał 12 h) pobrane od zwierząt z grup badanych: WT (dwie klatki po 4 myszy na klatkę) i KO (jedna klatka z trzema, druga z czterema myszami). Liczby w nawiasach prezentują stężenia poszczególnych PCB oznaczone w próbkach wydaliny pobranych z odpowiednich klatek.

* statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t -Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,05$).

** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t -Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,01$).

[#] w analizie statystycznej uwzględniono również poziomy PCB < LOD tła laboratoryjnego.

Tabela 28. Poziomy [ng/g m.m.] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 149, 174, 176 i 183 w tkankach, organach, krwi, moczu i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).

Matryca	PCB 149 [ng/g m.m.]		PCB 174 [ng/g m.m.]		PCB 176 [ng/g m.m.]		PCB 183 [ng/g m.m.]	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Tk. tłuszczowa	6940±1090**	4190±1340	2390±483**	1320±489	313±67**	170±68.4	1900±315**	1270±355
Krew	69,9±10,1	59,4±22,6	18,9±5,1 [#]	16,3±5,7 [#]	17,1±13,5	15,9±5,5 [#]	65±6,4	74±18,9
Mózg	145±60,6	126±44,1	114±48,3	101±29,7	13±4,9	12,7±4,1	227±70,4	241±62,5
Jelita	462±189	310±114	162±76,2*	86,3±30,7	20,8±8,4*	11,5±4,2	166±53,9	131±35
Nerki	361±104	376,3±169	118±34,6	118±59,0	26,5±14,6	23,6±9,6	226±33,9	215±62,5
Wątroba	383±61,5	305,4±159	84,9±17,7	69,5±38,6	7,9±1,2	6,8±3,7	700±80,8	700±229
Wartość poziomu prawdopodobieństwa <i>p</i> testu wielowymiarowego T ² Hotelling'a ($\alpha=0,05$) ^a	0,09		0,02		0,04		0,14	
Mocz ^b (0-12 h)	7,0 (6,9; 7,2)	18,1 (19,6; 16,6)	2,4 [#] (2,0; 2,7)	5,0 [#] (5,4; 4,6)	0,8 [#] (0,5; 1,1)	1,4 [#] (1,4; 1,4)	2,3 [#] (2,3; 2,2)	5,7 [#] (5,4; 5,9)
Mocz ^b (12-24 h)	2,8 (2,7; 3,0)	5,4 (6,3; 4,4)	0,8 [#] (0,9; 0,8)	2,8 [#] (2,5; 3,1)	0,4 [#] (0,4; 0,3)	0,9 [#] (0,9; 0,8)	1,9 [#] (1,7; 2,1)	3,5 [#] (3,2; 3,8)
Kał ^b (0-12 h)	36300 (45800; 26800)	56100 (34300; 77900)	19900 (24400; 15500)	33400 (22700; 44200)	4280 (5490; 3060)	7110 (4950; 9270)	6920 (8310; 5540)	11500 (7790; 15200)
Kał ^b (12-24 h)	701 (936; 466)	2060 (1880; 2240)	403 (513; 292)	1150 (1070; 1240)	150 (219; 80)	281 (256; 305)	232 (266; 197)	479 (449; 509)

^a pogrubioną czcionką zaznaczono $p < 0,05$.

^b zbiorcze próbki moczu i kału (interwał 12 h) pobrane od zwierząt z grup badanych: WT (dwie klatki po 4 myszy na klatkę) i KO (jedna klatka z trzema, druga z czterema myszami). Liczby w nawiasach prezentują stężenia poszczególnych PCB oznaczone w próbkach wydaliny pobranych z odpowiednich klatek.

* statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,05$).

** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,01$).

[#] w analizie statystycznej uwzględniono również poziomy PCB < LOD tła laboratoryjnego.

Tabela 29. Poziomy [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 91, 95, 132 i 136 w tkankach, organach, krwi i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).

Matryca	PCB 91 [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]		PCB 95 [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]		PCB 132 [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]		PCB 136 [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Tk. tłuszczowa	2,9±0,5**	1,9±0,7	8,7±1,5**	5,5±1,7	4,3±0,8**	2,5±0,8	0,8±0,2**	0,5±0,2
Krew	1,9±0,5	1,7±0,7	6,4±1,5	5,6±2,6	3,2±1,0	3,2±1,8	0,2±0,1	0,2±0,1
Mózg	0,3±0,1	0,3±0,1	1,1±0,3	1,0±0,3	0,9±0,3	0,8±0,3	0,1±0,02	0,1±0,02
Jelita	1,9±1,2	1,2±0,3	6,3±3,9	4,2±1,2	2,8±1,7	1,8±0,5	0,6±0,3	0,3±0,1
Nerki	1,1±0,3	1,3±0,5	3,4±1,0	4,1±1,5	2,4±0,6	2,8±1,2	0,2±0,1	0,3±0,1
Wątroba	1,6±0,3	1,2±0,5	5,0±0,7	3,9±1,7	4,0±0,7	3,0±1,3	0,2±0,04	0,2±0,1
Wartość poziomu prawdopodobieństwa p testu wielowymiarowego T^2 Hotelling'a ($\alpha=0,05$) ^a	0,09		0,03		0,009		0,04	
Kał ^b (0-12 h)	147 (180; 113)	241 (241; 242)	418 (509; 326)	642 (610; 675)	285 (323; 246)	349 (279; 419)	115 (139; 91)	184 (184; 185)
Kał ^b (12-24 h)	6,5 (6,0; 7,0)	16,7 (15,3; 18,0)	20,2 (17,8; 22,6)	45,4 (41,0; 49,7)	15,6 (14,2; 16,9)	31,1 (28,9; 33,2)	5,0 (5,7; 4,2)	13,6 (13,0; 14,2)

^a pogrubioną czcionką zaznaczono $p < 0,05$.

^b zbiorcze próbki kału (interwał 12 h) pobrane od zwierząt z grup badanych: WT (dwie klatki po 4 myszy na klatkę) i KO (jedna klatka z trzema, druga z czterema myszami). Liczby w nawiasach prezentują stężenia poszczególnych PCB oznaczone w próbkach wydaliny pobranych z odpowiednich klatek.

** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t -Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,01$).

Tabela 30. Poziomy [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 149, 174, 176 i 183 w tkankach, organach, krwi i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).

Matryca	PCB 149 [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]		PCB 174 [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]		PCB 176 [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]		PCB 183 [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu]	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Tk. tłuszczowa	8,1±1,5***	4,5±1,5	2,8±0,7**	1,4±0,6	0,4±0,1**	0,2±0,1	2,2±0,4**	1,4±0,4
Krew	6,2±1,9	5,7±3,8	1,7±0,9	1,6±1,0	1,4±1,0	0,9±0,03	5,9±2,4	7,5±3,8
Mózg	1,7±0,7	1,5±0,5	1,3±0,5	1,2±0,3	0,2±0,1	0,2±0,05	2,6±0,7	2,9±0,7
Jelita	5,9±3,5	3,6±1,1	2,1±1,4	1,0±0,3	0,3±0,2	0,1±0,04	2,1±1,2	1,5±0,4
Nerki	4,8±1,3	5,6±2,7	1,6±0,5	1,8±0,9	0,4±0,2	0,4±0,2	3,0±0,4	3,2±1,0
Wątroba	6,8±1,5	4,8±2,2	1,5±0,4	1,1±0,5	0,1±0,03	0,1±0,05	12,3±2,0	11,1±3,1
Wartość poziomu prawdopodobieństwa p testu wielowymiarowego T^2 Hotelling'a ($\alpha=0,05$) ^a	0,009		0,03		0,20		0,14	
Kał ^b (0-12 h)	698 (770; 625)	722 (515; 629)	386 (410; 361)	433 (340; 526)	81,8 (92,2; 71,5)	92,4 (74,2; 111)	135 (140; 129)	149 (117; 181)
Kał ^b (12-24 h)	36,8 (34,4; 39,2)	70,1 (65,6; 74,7)	21,7 (18,9; 24,6)	39,3 (37,3; 41,2)	7,4 (6,7; 8,1)	9,6 (8,9; 10,2)	13,2 (9,8; 16,6)	16,3 (15,6; 17,0)

^a pogrubioną czcionką zaznaczono $p < 0,05$.

^b zbiorcze próbki kału (interwał 12 h) pobrane od zwierząt z grup badanych: WT (dwie klatki po 4 myszy na klatkę) i KO (jedna klatka z trzema, druga z czterema myszami). Liczby w nawiasach prezentują stężenia poszczególnych PCB oznaczone w próbkach wydaliny pobranych z odpowiednich klatek.

** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t -Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,01$).

*** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t -Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,001$).

Tabela 31. Poziomy [%TD] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 91, 95, 132 i 136 w tkankach, organach, krwi i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).^a

Matryca	PCB 91		PCB 95		PCB 132		PCB 136	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Tk. tłuszczowa	4,61±0,57**	3,20±1,06	3,68±0,50**	2,47±0,71	3,41±0,50**	2,12±0,64	1,69±0,32*	1,07±0,46
Krew	0,04±0,01*	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,01±0,003	0,01±0,001
Mózg	0,02±0,01	0,01±0,005	0,01±0,005	0,01±0,004	0,02±0,01	0,02±0,006	0,005±0,002	0,004±0,001
Jelita	0,28±0,16	0,18±0,06	0,25±0,13	0,17±0,06	0,22±0,12	0,13±0,05	0,11±0,06*	0,06±0,02
Nerki	0,03±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,01±0,003	0,01±0,003
Wątroba	0,16±0,02	0,13±0,05	0,13±0,014	0,11±0,05	0,21±0,05	0,16±0,07	0,03±0,007	0,02±0,01
Wartość poziomu prawdopodobieństwa <i>p</i> testu wielowymiarowego T ² Hotelling'a ($\alpha=0,05$) ^b	0,21		0,01		0,04		0,18	
Mocz ^c (0-12 h)	0,0151 (0,0160; 0,0141)	0,0242 (0,0257; 0,0228)	0,0008 (0,0007; 0,0008)	0,0010 (0,0010; 0,0011)	0,0024 (0,0026; 0,0022)	0,0046 (0,0046; 0,0046)	0,0002 (0,0002; 0,0003)	0,0003 (0,0004; 0,0003)
Mocz ^c (12-24 h)	0,0095 (0,0086; 0,0103)	0,0046 (0,0050; 0,0043)	0,0006 (0,0006; 0,0006)	0,0006 (0,0006; 0,0007)	0,0014 (0,0012; 0,0016)	0,0012 (0,0012; 0,0011)	0,0001 (0,0002; 0,0001)	0,0003 (0,0004; 0,0002)
Kał ^c (0-12 h)	10,4 (12,8; 8,13)	21,4 (21,3; 21,4)	7,83 (9,49; 6,16)	15,0 (14,2; 15,7)	10,1 (11,4; 8,76)	15,3 (12,2; 18,4)	10,6 (12,7; 8,48)	21,0 (21,0; 21,1)
Kał ^c (12-24 h)	0,09 (0,10; 0,08)	0,34 (0,27; 0,42)	0,07 (0,08; 0,07)	0,25 (0,19; 0,30)	0,11 (0,12; 0,10)	0,32 (0,25; 0,38)	0,09 (0,12; 0,06)	0,36 (0,30; 0,43)
$\Sigma\%TD_{\text{tkanki/organy}}$	5,16±0,80	3,59±1,19	4,15±0,69	2,81±0,83	3,92±0,69	2,48±0,77	1,84±0,39	1,17±0,50
$\Sigma\%TD_{\text{mocz}}$	0,0245	0,0289	0,0014	0,0016	0,0038	0,0058	0,0004	0,0006
$\Sigma\%TD_{\text{kał}}$	10,5	21,7	7,90	15,3	10,2	15,6	10,7	21,4

^a dla obydwu badanych grup zwierząt przyjęto, że % udział:

- krwi w całkowitej masie myszy wynosi 5,85% (nieopublikowane dane, wg Dr. Larry G. Hansen'a, University of Illinois, informacja własna),
- tkanki tłuszczowej w całkowitej masie myszy wynosi 5,9% (wg Browna i wsp. [302]).

Udział % pozostałych organów został wyliczony na podstawie m.m. poszczególnego organu i całkowitej masy myszy.

^b pogrubiczną czcionką zaznaczono $p < 0,05$.

^c zbiorcze próbki moczu i kału (interwał 12 h) pobrane od zwierząt z grup badanych: WT (dwie klatki po 4 myszy na klatkę) i KO (jedna klatka z trzema, druga z czterema myszami). Liczby w nawiasach prezentują stężenia poszczególnych PCB oznaczone w próbkach wydaliny pobranych z odpowiednich klatek.

* statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,05$).

** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,01$).

Tabela 32. Poziomy [%TD] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 149, 174, 176 i 183 w tkankach, organach, krwi i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).^a

Matryca	PCB 149		PCB 174		PCB 176		PCB 183	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Tk. tłuszczowa	2,71±0,42***	1,61±0,05	2,03±0,41**	1,09±0,40	2,27±0,49**	1,20±0,48	3,20±0,53**	2,10±0,58
Krew	0,03±0,004	0,02±0,01	0,02±0,004	0,01±0,005	0,12±0,09	0,11±0,04	0,11±0,01	0,12±0,03
Mózg	0,02±0,01	0,01±0,005	0,03±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,008	0,12±0,04	0,11±0,03
Jelita	0,19±0,10	0,11±0,04	0,14±0,08	0,09±0,003	0,16±0,09*	0,08±0,03	0,29±0,13	0,20±0,06
Nerki	0,03±0,01	0,03±0,01	0,02±0,005	0,02±0,01	0,04±0,02	0,03±0,01	0,07±0,005	0,06±0,02
Wątroba	0,15±0,03	0,11±0,05	0,07±0,01	0,05±0,03	0,15±0,03	0,11±0,05	0,07±0,01	0,05±0,03
Wartość poziomu prawdopodobieństwa <i>p</i> testu wielowymiarowego T ² Hotelling'a ($\alpha=0,05$) ^b	0,05		0,06		0,02		0,07	
Mocz ^c (0-12 h)	0,0010 (0,0010; 0,0010)	0,0019 (0,0020; 0,0018)	0,0007 (0,0007; 0,0008)	0,0011 (0,0012; 0,0011)	0,0021 (0,0015; 0,0027)	0,0027 (0,0026; 0,0029)	0,0014 (0,0015; 0,0013)	0,0026 (0,0024; 0,0028)
Mocz ^c (12-24 h)	0,0004 (0,0004; 0,0004)	0,0004 (0,0005; 0,0003)	0,0003 (0,0003; 0,0003)	0,0004 (0,0004; 0,0005)	0,0010 (0,0010; 0,0010)	0,0012 (0,0013; 0,0011)	0,0012 (0,0010; 0,0014)	0,0011 (0,0011; 0,0011)
Kał ^c (0-12 h)	10,3 (11,3; 9,32)	13,3 (9,45; 17,1)	12,4 (13,1; 11,7)	17,2 (13,5; 20,9)	22,4 (25,1; 19,7)	31,4 (25,2; 37,6)	8,61 (8,88; 8,34)	11,8 (9,27; 14,4)
Kał ^c (12-24 h)	0,11 (0,12; 0,09)	0,30 (0,24; 0,36)	0,13 (0,14; 0,13)	0,36 (0,30; 0,43)	0,40 (0,51; 0,30)	0,76 (0,61; 0,91)	0,16 (0,14; 0,17)	0,30 (0,25; 0,35)
$\Sigma\%TD_{\text{tkanki/organy}}$	3,12±0,58	1,88±0,61	2,30±0,53	1,27±0,47	2,77±0,73	1,55±0,62	3,86±0,73	2,64±0,75
$\Sigma\%TD_{\text{mocz}}$	0,0014	0,0023	0,0010	0,0016	0,0031	0,0039	0,0026	0,0037
$\Sigma\%TD_{\text{kał}}$	10,4	13,6	12,5	17,6	22,8	32,2	8,77	12,1

^a dla obydwu badanych grup zwierząt przyjęto, że % udział:

- krwi w całkowitej masie myszy wynosi 5,85% (nieopublikowane dane, wg Dr. Larry G. Hansen'a, University of Illinois, informacja własna),
- tkanki tłuszczowej w całkowitej masie myszy wynosi 5,9% (wg Browna i wsp. [302]).

Udział % pozostałych organów został wyliczony na podstawie m.m. poszczególnego organu i całkowitej masy myszy.

^b pogrubioną czcionką zaznaczono $p < 0,05$.

^c zbiorcze próbki moczu i kału (interwał 12 h) pobrane od zwierząt z grup badanych: WT (dwie klatki po 4 myszy na klatkę) i KO (jedna klatka z trzema, druga z czterema myszami).

Liczby w nawiasach prezentują stężenia poszczególnych PCB oznaczone w próbkach wydaliny pobranych z odpowiednich klatek.

* statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,05$); ** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,01$); *** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p < 0,001$).

Tabela 33. Wyniki i ocena statystyczna oznaczeń frakcji enancjomerycznych (EF) wybranych atropoizomerów PCB w tkankach, organach, krwi, moczu i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).

Materiał biologiczny	PCB 91		PCB 95		PCB 136		PCB 149		PCB 174	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Tk. tłuszczowa	0,31±0,02**	0,25±0,02	0,35±0,02**	0,32±0,02	0,66±0,02*	0,69±0,01	0,68±0,01**	0,71±0,02	0,46±0,01*	0,44±0,01
Krew	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	0,81±0,01	0,81±0,03	0,39±0,04	0,37±0,02
Mózg	0,16±0,02	0,17±0,02	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	0,78±0,02	0,79±0,01	0,37±0,04	0,39±0,03
Jelita	0,25±0,02*	0,23±0,02	0,29±0,03	0,27±0,04	0,65±0,03	0,66±0,05	0,69±0,02*	0,72±0,02	0,45±0,01	0,44±0,01
Nerki	0,22±0,04*	0,21±0,01	0,24±0,04	0,28±0,01	0,57±0,05	0,59±0,05	0,75±0,02	0,75±0,01	0,43±0,01*	0,45±0,01
Wątroba	0,11±0,02	0,12±0,01	0,18±0,03	0,19±0,03	0,73±0,08*	0,64±0,04	0,85±0,01	0,85±0,02	0,35±0,02	0,35±0,01
Wartość poziomu prawdopodobieństwa p testu wielowymiarowego T^2 Hotelling'a ($\alpha=0,05$) ^a	0,03		0,06		0,01		0,09		0,14	
Mocz ^b	0,37	0,33	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	0,65	0,68	0,42	0,39
0-12 h	(0,34; 0,39)	(0,37; 0,30)	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	(0,68; 0,62)	(0,65; 0,71)	(0,41; 0,42)	(0,41; 0,37)
Mocz ^b	0,28	0,27	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	0,67	0,59	n.o.	n.o.
12-24 h	(0,33; 0,23)	(0,32; 0,21)	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	(0,64; 0,70)	(0,57; 0,61)	n.o.	n.o.
Kał ^b	0,51	0,50	0,50	0,49	0,49	0,50	0,51	0,50	0,50	0,50
0-12 h	(0,51; 0,51)	(0,51; 0,50)	(0,50; 0,50)	(0,50; 0,49)	(0,49; 0,49)	(0,50; 0,51)	(0,51; 0,51)	(0,50; 0,51)	(0,50; 0,51)	(0,50; 0,50)
Kał ^b	0,39	0,50	0,36	0,47	0,51	0,50	0,57	0,52	0,48	0,50
12-24 h	(0,44; 0,33)	(0,48; 0,52)	(0,40; 0,33)	(0,46; 0,48)	(0,50; 0,52)	(0,51; 0,48)	(0,54; 0,59)	(0,62; 0,51)	(0,48; 0,47)	(0,49; 0,51)

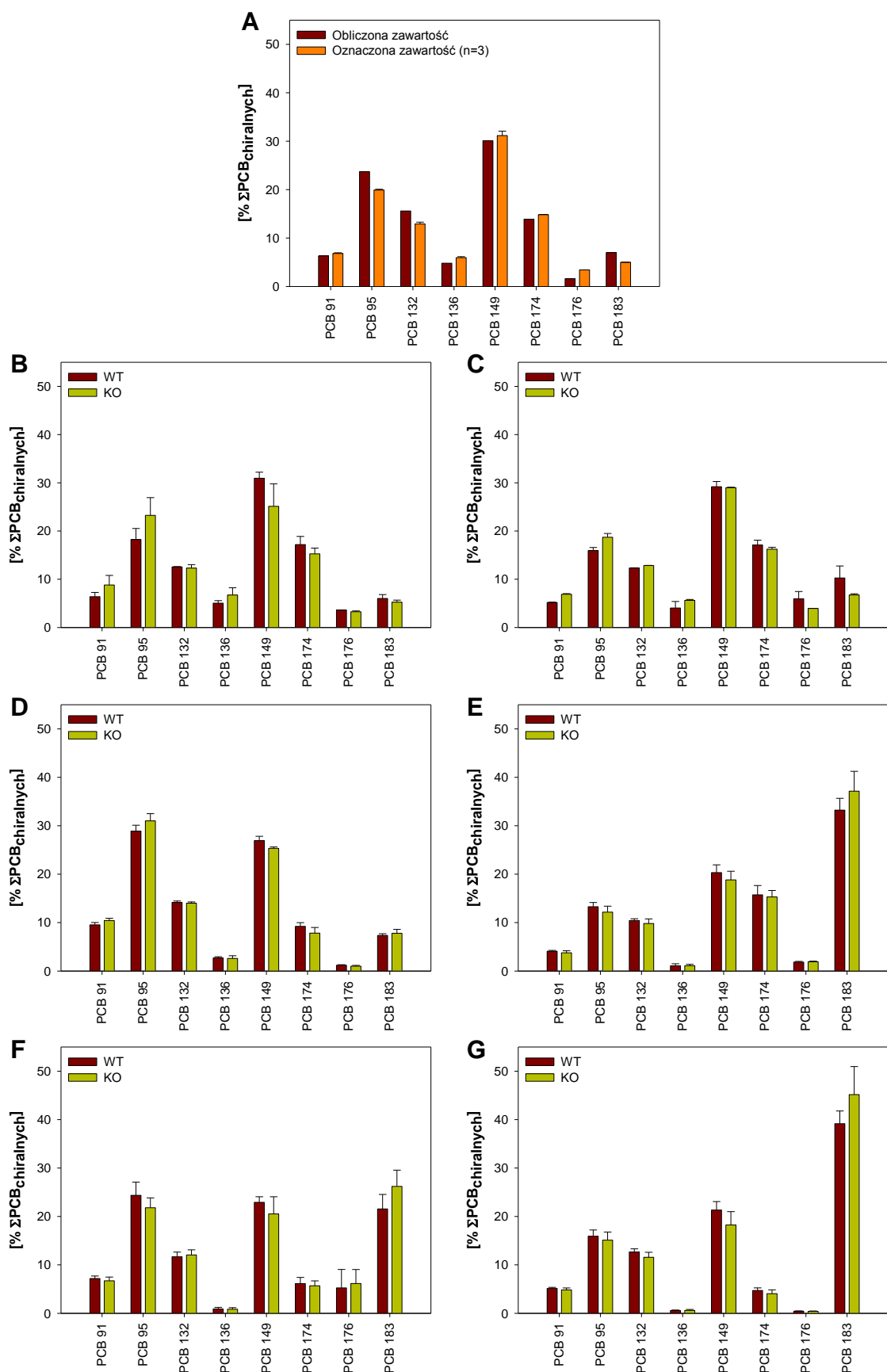
^a pogrubioną czcionką zaznaczono $p<0,05$.

^b próbki moczu i kału zebrano w interwałach dwunastogodzinnych od podania mieszaniny PCB chiralnych i przeniesienia do klatek metabolicznych zwierząt z grup badanych: WT (dwie klatki po 4 myszy na klatkę) i KO (jedna klatka z trzema, druga z czterema myszami). Liczby w nawiasach prezentują wartości EF poszczególnych PCB, oznaczone w próbkach wydalin pobranych z odpowiednich klatek.

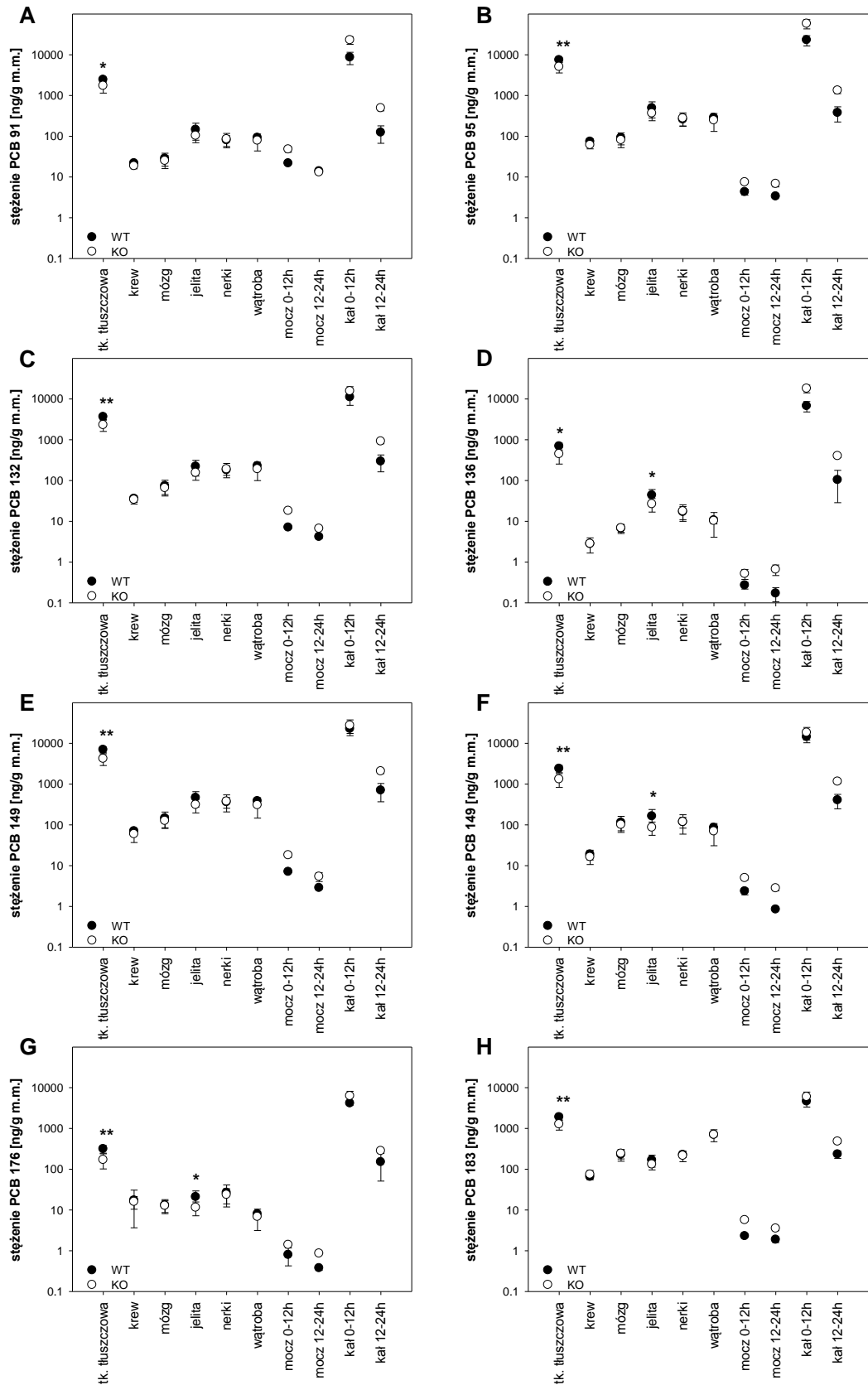
* statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t -Studenta, $\alpha=0,05$, $p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t -Studenta, $\alpha=0,05$, $p<0,01$).

n.o. – nie oznaczono.



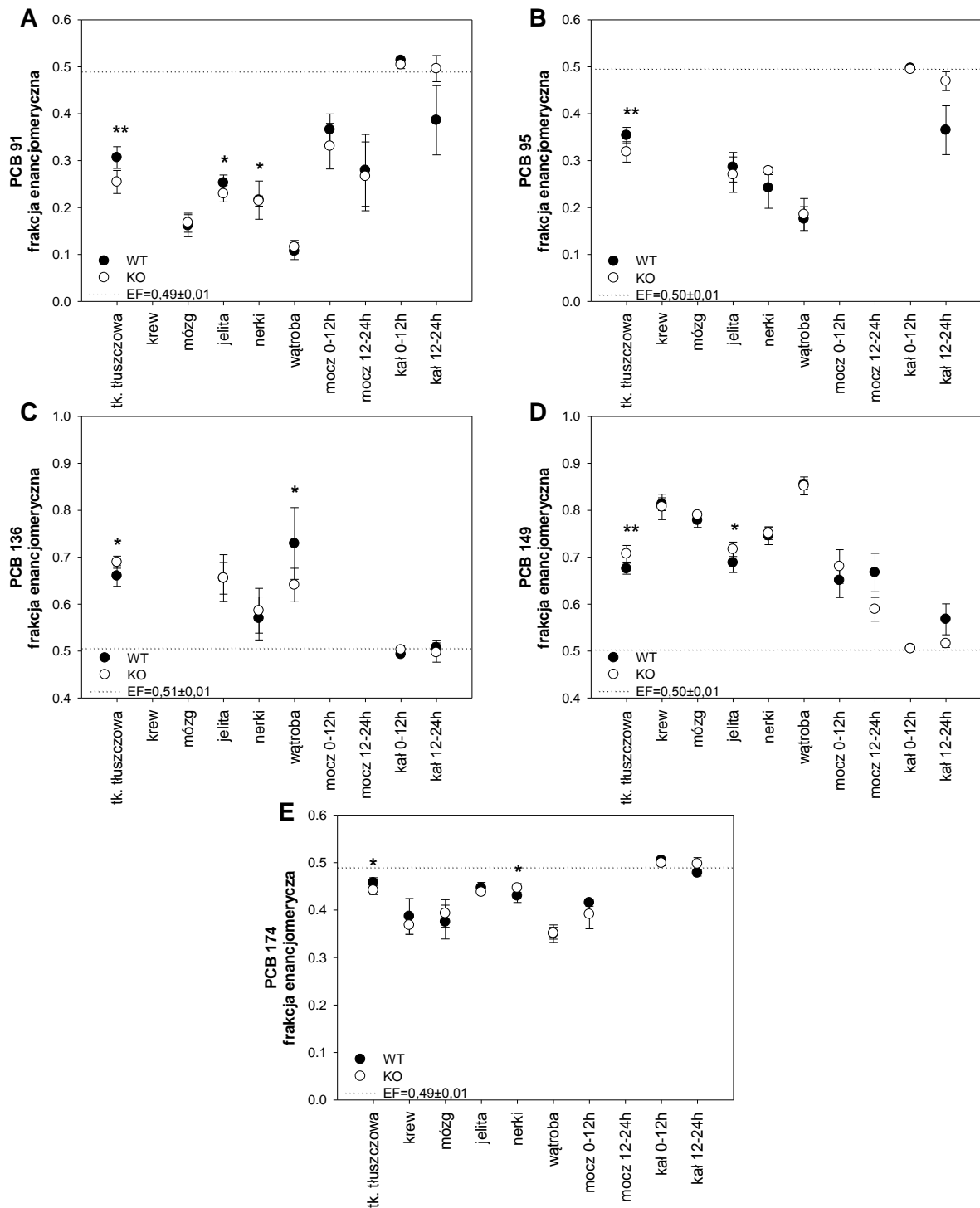
Rycina 28. Procentowy udział poszczególnych kongenerów PCB w Σ PCB_{chiralnych}, oznaczonych w próbkach: A) mieszaniny PCB przeznaczonej do podania *per os*, B) kału, zebranych pomiędzy 0-12 h, C) kału, zebranych pomiędzy 12-24 h, D) tkanki tłuszczowej, E) mózgu, F) krwi, i G) wątroby myszy WT (n=7) i KO (n=7) po podaniu jednorazowej dawki (50 μ g/g m.c.) mieszaniny wybranych chiralnych PCB *per os*.



Rycina 29. Porównanie średnich poziomów ($\bar{x} \pm SD$), wyrażonych w [ng/g m.m.]: A) PCB 91, B) PCB 95, C) PCB 132, D) PCB 136, E) PCB 149, F) PCB 174, G) PCB 176 i H) PCB 183, oznaczonych w tkankach, organach, krwi i wydalinach myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7) po podaniu *per os* jednorazowej dawki (50 $\mu\text{g/g m.c.}$) mieszaniny w/w PCB.

* statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test *t*-Studenta, $\alpha=0,05$, $p<0,01$).



Rycina 30. Porównanie średnich wartości ($\bar{x}_s \pm \text{SD}$) frakcji enancjomerycznych (EF) atropoizomerów: A) PCB 91, B) PCB 95, C) PCB 136, D) PCB 149, E) PCB 174, oznaczonych w tkankach, organach, krwi i wydalinach myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7) po podaniu *per os* jednorazowej dawki (50 $\mu\text{g/g}$ m.c.) mieszaniny wybranych chiralnych PCB.

* statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t-Studenta, $\alpha=0,05$, $p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica względem wartości średniej w grupie badanej KO (test t-Studenta, $\alpha=0,05$, $p<0,01$).

Przerwaną linią zaznaczono wartości EF obliczone dla poszczególnych par atropoizomerów PCB z wyników enancjoselektywnej analizy GC- μECD roztworów wzorcowych PCB (n=14). Wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami EF racemicznych par atropoizomerów poszczególnych PCB (przedstawione na rycinach linią przerywaną) a odpowiadającymi im średnimi wartościami EF ($\bar{x}_s \pm \text{SD}$) oznaczonymi w tkankach, organach i krwi ($p<0,001$).

Stężenie PCB 91, 95 i 136 < LOD w enancjoselektywnej analizie ekstraktów próbek mózgu i krwi na kolumnie Chirasil-Dex.

Tabela 34. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [ng/g m.m.].

PCB 91						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 95						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 132						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 136						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05, p<0,001$).

Tabela 35. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [ng/g m.m.].

PCB 149						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 174						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 176						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 183						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				***
Mózg	***		-			***
Jelita	***			-		***
Nerki	***				-	***
Wątroba	***	***	***	***	***	-

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 36. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [ng/g m.m.].

PCB 91						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 95						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 132						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 136						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 37. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [ng/g m.m.].

PCB 149						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 174						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 176						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 183						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				***
Mózg	***		-			***
Jelita	***			-		***
Nerki	***				-	***
Wątroba	***	***	***	***	***	-

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 38. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu].

PCB 91						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	*	***	*	***	**
Krew	*	-	***			
Mózg	***	***	-	***		**
Jelita	*		***	-		
Nerki	***				-	
Wątroba	**		**			-

PCB 95						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-		***		***	**
Krew		-	***		*	
Mózg	***	***	-	***		**
Jelita			***	-		
Nerki	***	*			-	
Wątroba	**		**			-

PCB 132						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-		***		**	
Krew		-	***			
Mózg	***	***	-	**	*	***
Jelita			**	-		
Nerki	**		*		-	*
Wątroba			***		*	-

PCB 136						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	*	***	***
Krew	***	-		**		
Mózg	***		-	***		
Jelita	*	**	***	-	**	**
Nerki	***			**	-	
Wątroba	***			**		-

* statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05, p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05, p<0,01$).

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05, p<0,001$).

Tabela 39. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu].

PCB 149						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-		***		*	
Krew		-	**			
Mózg	***	**	-	**	*	***
Jelita			**	-		
Nerki	*		*		-	
Wątroba			***			-

PCB 174						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-		*		*	*
Krew		-				
Mózg	*		-			
Jelita				-		
Nerki	*				-	
Wątroba	*					-

PCB 176						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	**				
Krew	**	-	***	***	**	***
Mózg		***	-			
Jelita		***		-		
Nerki		**			-	
Wątroba		***				-

PCB 183						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***				***
Krew	***	-	**	***	**	***
Mózg		**	-			***
Jelita		***		-		***
Nerki		**			-	***
Wątroba	***	***	***	***	***	-

* statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,01$).

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 40. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu].

PCB 91						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-		***			
Krew		-	***			
Mózg	***	***	-	**	**	**
Jelita			**	-		
Nerki			**		-	
Wątroba			**			-
PCB 95						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-		***			
Krew		-	***			
Mózg	***	***	-	**	**	**
Jelita			**	-		
Nerki			**		-	
Wątroba			**			-
PCB 132						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-		*			
Krew		-	***			
Mózg	*	***	-		**	**
Jelita				-		
Nerki			**		-	
Wątroba			**			-
PCB 136						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	**	***	*	**	***
Krew	**	-				
Mózg	***		-	**	*	
Jelita	*		**	-		
Nerki	**		*		-	
Wątroba	***					-

* statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,01$).

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 41. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu].

PCB 149						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-					
Krew		-	**			
Mózg		**	-		**	*
Jelita				-		
Nerki			**		-	
Wątroba			*			-

PCB 174						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-					
Krew		-				
Mózg			-			
Jelita				-		
Nerki					-	
Wątroba						-

PCB 176						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***			*	
Krew	***	-	***	***	***	***
Mózg		***	-		**	
Jelita		***		-	**	
Nerki	*	***	**	**	-	**
Wątroba		***			**	-

PCB 183						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***				***
Krew	***	-	**	***	**	*
Mózg		**	-			***
Jelita		***		-		***
Nerki		**			-	***
Wątroba	***	*	***	***	***	-

* statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,01$).

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 42. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [%TD].

PCB 91						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 95						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 132						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 136						
Matryca	Adipose	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 43. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [%TD].

PCB 149						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-

PCB 174						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-

PCB 176						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-

PCB 183						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				***
Mózg	***		-			***
Jelita	***			-		***
Nerki	***				-	***
Wątroba	***	***	***	***	***	-

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 44. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [%TD].

PCB 91						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 95						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 132						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 45. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [%TD].

PCB 149						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 174						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 176						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				
Mózg	***		-			
Jelita	***			-		
Nerki	***				-	
Wątroba	***					-
PCB 183						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***	***	***	***
Krew	***	-				***
Mózg	***		-			***
Jelita	***			-		***
Nerki	***				-	***
Wątroba	***	***	***	***	***	-

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 46. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a frakcji enancjomerycznych (EF) wybranych atropoizomerów PCB, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7).

PCB 91						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba	
Tk. tłuszczowa	-	***	*	***	***	***
Mózg	***	-	***	*		*
Jelita	*	***	-			***
Nerki	***	*		-		***
Wątroba	***	*	***	***		-
PCB 95						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Jelita	Nerki	Wątroba		
Tk. tłuszczowa	-	*	***		***	
Jelita	*	-			***	
Nerki	***		-		*	
Wątroba	***	***	*		-	
PCB 136						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Jelita	Nerki	Wątroba		
Tk. tłuszczowa	-		*			
Jelita		-	*		*	
Nerki	*	*	-		***	
Wątroba		*	***		-	
PCB 149						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***		***	***
Krew	***	-	***	***	***	***
Mózg	***	***	-	***	*	***
Jelita		***	***	-	***	***
Nerki	***	***	*	***	-	***
Wątroba	***	***	***	***	***	-
PCB 174						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***			***
Krew	***	-		**	*	
Mózg	***		-	***	**	
Jelita		**	***	-		***
Nerki		*	**		-	***
Wątroba	***			***	***	-

* statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,01$).

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

Tabela 47. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem *post-hoc* Tukey'a frakcji enancjomerycznych (EF) wybranych atropoizomerów PCB, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7).

PCB 91						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba	
Tk. tłuszczowa	-	***		**	***	
Mózg	***	-	***	***	***	
Jelita		***	-		***	
Nerki	**	***		-	***	
Wątroba	***	***	***	***	-	
PCB 95						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Jelita	Nerki	Wątroba		
Tk. tłuszczowa	-	***	**	***		
Jelita	***	-			***	
Nerki	**		-		***	
Wątroba	***	***	***		-	
PCB 136						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Jelita	Nerki	Wątroba		
Tk. tłuszczowa	-		***			
Jelita		-	**			
Nerki	***	**	-		*	
Wątroba			*		-	
PCB 149						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***		*	***
Krew	***	-		***	***	
Mózg	***		-	***	*	***
Jelita		***	***	-		***
Nerki	*	***	*		-	***
Wątroba	***		***	***	***	-
PCB 174						
Matryca	Tk. tłuszczowa	Krew	Mózg	Jelita	Nerki	Wątroba
Tk. tłuszczowa	-	***	***			***
Krew	***	-	*	***	***	
Mózg	***	*	-	***	***	***
Jelita		***	***	-		***
Nerki		***	***		-	***
Wątroba	***		***	***	***	-

* statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,05$).

** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,01$).

*** statystycznie istotna różnica pomiędzy średnimi ($\alpha=0,05$, $p<0,001$).

VII. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Glikoproteina-P (P-gp) usuwa cząsteczki wielu leków i toksyn z wnętrza komórek, zapobiegając ich kumulacji i utrudniając osiągnięcie miejsc docelowych [62]. P-gp nie tylko zapobiega absorpcji ze światła jelita, czy przenikaniu przez barierę krew-mózg wielu ksenobiotyków [59, 172], ale również ułatwia ich eliminację z żółcią [58] oraz przez nerki [57]. Podczas gdy np. w mózgu P-gp chroni bezpośrednio ten organ, redukując przepuszczalność ksenobiotyków do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), P-gp występująca w wątrobie, nerkach i przewodzie pokarmowym chroni cały organizm, wpływając na absorpcję, dystrybucję, metabolizm i wydalanie ksenobiotyków. W ostatnich latach zaproponowano wiele systemów *in vitro* i *in vivo*, umożliwiających odpowiedź na pytanie czy dane ksenobiotyki są substratami (lub inhibitorami) tego ważnego transportera białkowego.

W wielu przypadkach do określenia, czy dany związek łączy się i/lub jest substratem (lub inhibitorem) dla P-gp stosowane są modele oparte o kultury komórkowe [57-59]. Jednak takie rozwiązanie nie wydało się być uzasadnione w przypadku jednoczesnego skринningu losów każdego z ośmiu chiralnych PCB (PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183), ważnych ze środowiskowego punktu widzenia, ze względu na dużą lipofilowość PCB. W konsekwencji badane kongenery mogłyby nie tylko adsorbować się na powierzchni szkła i plastiku lecz również pozostawać rozpuszczone w lipidach błon komórkowych. Utrudniłoby to znacznie detekcję poszczególnych analitów oraz potwierdzenie lub odrzucenie tezy o ich eliminacji z komórek przez P-gp.

Celem uniknięcia w/w problemów w prowadzonych *in vivo* badaniach porównane zostały poziomy PCB, oznaczone w wybranych tkankach, organach i wydalinach dwóch typów myszy: WT (dzikich) i KO (pozbawionych genów *mdr1a/b*), po podaniu zwierzętom olejowego roztworu „mieszaniny środowiskowej” 8 chiralnych kongenerów PCB. Wykorzystanie modelu myszy transgenicznych, pozbawionych właśnie genów *mdr1a* i *mdr1b*, wydało się być szczególnie uzasadnione ze względu na ich funkcje, zbliżone do funkcji ludzkiego genu MDR1 (tj. konstytutywne geny *mdr1a/b* u myszy kodują transportery białkowe homologiczne z ludzkimi, warunkowanymi obecnością genu MDR1) [59, 60, 172]. Zastosowanie w/w modelu badawczego nie tylko pozwoliło na uniknięcie problemów związanych z badaniami na hodowlach komórkowych, ale przede wszystkim dało możliwość

bezpośredniej ekspozycji zwierząt na kompleksową środowiskową mieszaninę PCB oraz monitorowania wszystkich możliwych miejsc ekspresji genów *mdr1a/b* (mózg, jelita, wątroba, nerki) czy wydaliny (kał, mocz), w których najwyraźniej można zaobserwować efekty działalności P-gp.

Zgodnie z założeniami pracy badaniami objęto ocenę wpływu P-gp na absorpcję, depozycję i eliminację indywidualnych kongenerów PCB z wykorzystaniem modelu myszy transgenicznych, pozbawionych genów *mdr1a/b* (*knockout mice* - KO). W tym celu po 24 godzinach od podania myszom KO i grupie kontrolnej (myszy WT) olejowego roztworu mieszaniny wybranych PCB, sukcesywnie wyznaczono profile stężeń badanych kongenerów w wyżej wspomnianych matrycach biologicznych.

Postawiona w pracy hipoteza zakładała, że te kongenery PCB, które zostaną oznaczone na poziomach niższych zarówno w:

- jelitach, nerkach, kale i moczu myszy KO (względem analogicznych matryc myszy WT), jak i w
- mózgu, wątrobie i krwi myszy WT (względem analogicznych matryc myszy KO)

mogą być substratami dla P-gp.

1. Poziomy chiralnych PCB w badanych organach, tkankach i wydalinach myszy

Zaproponowana metodyka pozwoliła na jednoczesne badanie przesiewowe ośmiu chiralnych kongenerów PCB (tj. PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183), uznanych jako potencjalne substraty dla transporterów kodowanych genami *mdr1a/b*, po jednorazowym podaniu *per os* ich olejowego roztworu myszom transgenicznym (KO) i dzikim (WT). Ocenie poddano różnice w rozmieszczeniu chiralnych kongenerów PCB w organizmach myszy KO i WT. W tym celu porównano poziomy analitów (ng/g m.m., µg/g tłuszczu, % udział poszczególnych kongenerów w $\Sigma\text{PCB}_{\text{chiralnych}}$, %TD, EF) oznaczone w wybranych tkankach (tłuszczowa, krew), organach (mózg, jelita, nerki i wątroba) oraz wydalinach (mocz i kał) badanych zwierząt doświadczalnych stosując m.in. chemometryczne techniki redukcji liczby zmiennych i analizy danych wielowymiarowych (PCA, test T^2 -Hotelling'a) [31, 40].

Niestety wadą zaproponowanego podejścia do badań *in vivo* był fakt, że ekspresja genów *mdr1a/b* nie jest jedyną cechą różnicującą oba typy myszy. Jak wynika z badań

przeprowadzonych przez różnych autorów u myszy pozbawionych genów *mdr* zaobserwowano wyraźne różnice w ekspresji niektórych enzymów cytochromu P-450 [303, 304] czy w ekspresji innych transporterów aktywnych [305, 306]. Z kolei badania własne wykazały, że samice myszy KO posiadają statystycznie istotnie wyższe masy ciała niż myszy WT ($\alpha=0,05$, $p=0,02$) oraz wydają około 50% więcej tłuszczu z kałem (tabela 20).

Mając na uwadze powyższe ograniczenia zastosowanego modelu zwierzęcego stwierdzono, że różnice w (enancjoselektywnej) dystrybucji PCB w tkankach, organach i wydalinach myszy WT i KO nie muszą być uwarunkowane jedynie aktywnością P-gp. Mimo to, zastosowana metodyka badań z użyciem mieszaniny chiralnych, środowiskowych PCB, w połączeniu z narzędziami redukcji i opracowania danych wielowymiarowych, pozwoliła na jednoczesne badanie przesiewowe tylko w jednym eksperymencie na zwierzętach dużej liczby potencjalnych substratów dla transporterów wielolekowej oporności (*mdr1a/b*).

1.1. Różnice międzygrupowe (WT vs KO) w obrębie danej matrycy

Interpretacja geometryczna wyników analizy głównych składowych (PCA) poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183, znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych (wyrażonych w ng danego kongeneru na gram masy mokrej próbki [ng/g m.m.] lub μg danego kongeneru na gram wyekstrahowanego z próbki tłuszczu [$\mu\text{g}/\text{g}$ tłuszczu], ryciny 20 i 22), wykazała brak wyraźnego zróżnicowania pomiędzy wynikami oznaczeń uzyskanymi dla poszczególnych grup myszy WT i KO. Pozwoliła ona jednak na pogrupowanie analizowanych próbek względem badanych matryc.

Jednakże dalsza wielowymiarowa analiza stężeń poszczególnych PCB we wszystkich matrycach (z wyjątkiem kału i moczu), z użyciem testu T^2 Hotelling'a, umożliwiła stwierdzenie znamienych statystycznie różnic pomiędzy wynikami oznaczeń poszczególnych PCB w grupie myszy WT i myszy KO (tabele 27-32). Szczególnie widoczne było to w przypadku stężeń PCB 95, oznaczonych w każdej z badanych grup myszy ($p<0,05$), niezależnie od sposobu przedstawienia wyników analiz (ng/g m.m., $\mu\text{g}/\text{g}$ tłuszczu, %TD, tabele 27-32).

Z kolei wyniki analizy jednowymiarowej (testem *t*-Studenta dla zmiennych niepowiązanych) stężeń PCB sugerują, że w/w różnice pomiędzy obu grupami zwierząt są efektem istotnie wyższych ($p<0,01$) stężeń PCB 95, oznaczonych w tkance tłuszczowej myszy

WT (ryc. 29B). Analiza jednowymiarowa wykazała również, że obok PCB 95 w tkance tłuszczowej myszy WT stwierdzone zostały również wyższe stężenia pozostałych siedmiu analitów (tabele 27-32, ryc. 29A-H).

Te różnice w stężeniach PCB w tkance tłuszczowej jednej i drugiej grupy myszy wynikają prawdopodobnie z dwóch przyczyn. Po pierwsze, myszy KO miały istotnie statystycznie większą masę ciała ($m.c._{KO}=23,1\pm 1,9g$ vs $m.c._{WT}=21,6\pm 1,4g$). Po drugie – wydalily z kałem od 1,3 do 2,1-krotnie większą część podanej dawki poszczególnych PCB niż myszy WT (tabele 31-32). Powyższe przyczyny spowodowały „rozcieńczenie” dawki PCB podanej *per os* myszom KO [307, 308], co skutkowało niższymi poziomami poszczególnych kongenerów, głównie w tkance tłuszczowej (magazynowej) tej grupy zwierząt.

W wyniku PCA próbki kału zostały pogrupowane w oddzieleniu od pozostałych matryc biologicznych (ryc. 20, 22). Ponadto przedstawiona na rycinie 24 analiza PCA poziomów poszczególnych PCB wyrażonych jako % ułamek ich całkowitej dawki *per os* wykazała wyraźne wyodrębnienie i rozdzielenie w przestrzeni PC1 vs PC2 próbek kału 0-12 h myszy KO od próbek kału 0-12h myszy WT. Wynikało ono z faktu, że znaczący procent całkowitej podanej dawki (%TD) każdego z kongenerów został wydalony w ciągu pierwszych 12 godzin eksperymentu (7,8-31,4%, tabele 31-32, ryc. 29). Mniejszy, lecz jeszcze zauważalny %TD podanych PCB był wydalony z kałem pomiędzy 12 a 24 godziną (0,07 do 0,76%TD). Uzyskane wyniki są w pewnej niezgodności z wynikami wcześniejszych badań, w których Kania-Korwel i wsp. [111, 148] wykazali, że tylko <2 %TD PCB 136 zostało wydalone przez myszy szczepu C57Bl/6 w czasie 72 godzin od momentu podania *per os* tego kongeneru. Przedstawione wyżej różnice w ilości wydalonych z kałem PCB mogą wynikać bądź z różnic międzyszczepowych zwierząt doświadczalnych (tzn. szczepy myszy FVB w badaniach własnych vs szczep myszy C57Bl/6 w badaniach Kani-Korwel i wsp.), bądź z różnego sposobu podawania PCB (tzn. podanie r-ru olejowego PCB *per os* sondą dożołądkową w badaniach własnych vs podanie PCB z pożywieniem o niskiej zawartości tłuszczu w badaniach Kani-Korwel i wsp.). Mając na uwadze fakt, że w badaniach własnych zawartość tłuszczu w kale zebrany w czasie 12-24h maleje 2,6-krotnie w porównaniu z jego zawartością w kale zebrany pomiędzy 0-12h eksperymentu (tabela 20), jest wysoce prawdopodobne, że niezaabsorbowany olej kukurydziany stanowił rezerwuuar PCB w przewodzie pokarmowym, którego niewchłonięta część, łącznie z PCB została wydalona w stanie niezmiennym.

Zaskakującym rezultatem przeprowadzonych badań był kierunek różnic w poziomach PCB oznaczonych w kale pomiędzy grupami myszy WT i KO (tabele 27-32, ryc. 24). Pomimo braku P-gp myszy KO wydalają większą ilość PCB z kałem niż myszy WT (ryc. 29). Na podstawie porównania poziomów %TD (tabele 31-32) stwierdzono, że myszy KO wydalają od 1,3- do 2,1-krotnie większą ilość poszczególnych kongenerów PCB w ciągu 0-12h od podania i od 1,9- do 4-krotnie więcej niż myszy WT w ciągu następných 12h (12-24h). Podobne tendencje zaobserwowano w analizie poziomów PCB wyrażonych w ng/g m.m. (od 1,5- do 4-krotnie wyższe poziomy poszczególnych kongenerów w kale myszy KO; tabele 27-28). Wyższe stężenia PCB w kale myszy KO w porównaniu z oznaczonymi w kale myszy WT, mogły być wynikiem 1,5-krotnie większej ilości tłuszczu, który jest istotnym czynnikiem wpływającym na zawartość PCB [130], wydalonego z kałem przez myszy KO (tabela 20). Nawet po znormalizowaniu poziomów PCB na zawartość tłuszczu w kale [$\mu\text{g/g}$ tłuszczu], było to nadal od 1- do 2,7-krotnie więcej w przypadku myszy KO (tabele 29-30), w związku z czym nie można w tym miejscu wykluczyć wpływu innego, nieznanego procesu *in vivo* (np. aktywnego transportu) na rozmieszczenie PCB u zwierząt transgenicznych.

1.2. Różnice międzykankowe w obrębie danej grupy (WT lub KO)

Mimo, że PCA nie doprowadziła do rozdzielania przestrzennego próbek względem badanych grup zwierząt WT lub KO (ryc. 20), to ujawniła wyraźne grupowanie tkanek, organów, krwi, moczu i kału w dwuwymiarowym układzie dwóch pierwszych głównych składowych (PC1 vs PC2), które opisują 62,38 % całkowitej zmienności analizowanego zbioru danych (tabela 26). Pierwsza główna składowa (PC1) rozdzieliła próbki mózgu i wątroby od próbek tkanki tłuszczowej, jelit, nerek i kału, podczas gdy druga główna składowa (PC2) rozdzieliła próbki moczu od próbek wszystkich pozostałych matryc (ryc. 20). Próbki roztworu olejowego do podania *per os* grupują się razem z próbkami kału.

Z analizy korelacji pomiędzy zmiennymi (poziomy PCB) a głównymi składowymi (PC1 i PC2) wynika, że wartości pierwszej głównej składowej (PC1) determinowane są głównie przez stężenie PCB 183, 149, 136 i w mniejszym stopniu przez PCB 95, przy czym poziomy pierwszego kongeneru korelują ujemnie z wartościami PC1 (ryc. 21). Natomiast druga główna składowa PC2 jest determinowana przede wszystkim przez poziomy PCB 91 i 132, w mniejszym stopniu przez poziomy PCB 174. Ponadto analiza profili PCB (ryc. 28) wykazała wyższy procentowy udział PCB 183 oraz niższe procentowe zawartości PCB 95, 136 i 149

względem sumy wszystkich oznaczonych PCB w próbkach krwi, mózgu i wątroby (ryc. 28E-G) w porównaniu z profilem PCB w roztworze olejowym do podania *per os* (ryc. 28A). Wspomniane różnice w profilach kongenerów wynikały ze znacząco wyższych stężeń PCB 183 w wątrobach zarówno myszy WT jak i KO w porównaniu do wszystkich pozostałych tkanek i organów (z wyjątkiem tkanki tłuszczowej; tabele 35, 37, 39, 41, 43 i 45 oraz ryc. 29H). Wynika to z faktu, że PCB 183 w odróżnieniu od pozostałych analitów (PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176) nie posiada dwóch sąsiednich, niepodstawionych atomów wodoru w pozycjach *meta-para* obu pierścieni fenylowych (tabele 2, 9), w związku z czym nie ulega szybkiemu metabolizmowi i wykazuje wyższą trwałość (zdolność biokumulacji) *in vivo* [309-311]. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że różnice w profilach PCB odzwierciedlają dłuższy okres biologicznego półtrwania PCB 183 w porównaniu do innych kongenerów użytych w badaniach.

Jak można było przewidzieć, najwyższe poziomy analitów spośród wszystkich tkanek i organów (niezależnie od sposobu przedstawiania wyników oznaczeń, tabele 34-45) odnotowano w tkance tłuszczowej obydwu grup myszy. Stanowi to kolejny dowód na zdolność PCB do kumulowania się w tkance tłuszczowej gryzoni [156]. Z kolei stężenia PCB oznaczone w moczu były najniższe spośród wszystkich analizowanych matryc (ryc. 29). Potwierdza to obserwacje innych autorów, że wydalanie z moczem stanowi drugorzędną drogę eliminacji macierzystych kongenerów PCB u szczurów [160, 312], psów i małp [313].

2. Dystrybucja atropoizomerów PCB w tkankach, organach i wydalinach myszy WT i KO

„*Chiral signatures*”, tzn. różnice w stopniu i kierunku wzbogacenia enancjomerycznego PCB znalazły zastosowanie w badaniach źródeł pochodzenia/narażenia oraz środowiskowego transportu tej ważnej grupy zanieczyszczeń pochodzenia antropogennego [29, 30, 36]. Podobnie jak w badaniach prowadzonych przez Kanię-Korwel i wsp. [148] w niniejszej pracy zaproponowano użycie „*chiral signatures*” do rozróżnienia procesów fizycznej i biologicznej depozycji PCB w warunkach *in vivo*. Wiadomo, że w odróżnieniu od procesów fizycznych (np. biernej dyfuzji) jedynie procesy biologiczne (takie jak aktywny transport) i/lub biotransformacja mogą zmienić „*chiral signatures*” na skutek enancjoselektywnych oddziaływań atropoizomerów PCB z chiralnymi makrocząsteczkami (np. proteinami).

Jak wynika z danych przedstawionych na rycinie 30, znaczące wzbogacenie enancjomeryczne w porównaniu z wartościami EF racemicznych kongenerów PCB podanych drogą *per os* wykazują wszystkie tkanki i organy badanych zwierząt doświadczalnych. Wyraźne wzbogacenie enancjomeryczne w PCB 91 ($0,1 \leq EF \leq 0,39$) i PCB 149 ($0,57 \leq EF \leq 0,71$) wykazały próbki moczu zebrane zarówno między 0-12h jak i 12-24h eksperymentu. Ponadto w próbkach moczu pobranych pomiędzy 0-12h stwierdzono również wzbogacenie enancjomeryczne PCB 174 ($0,37 \leq EF \leq 0,42$), natomiast jego zanik można było zauważyć w moczu zbieranym pomiędzy 12 a 24 godziną po podaniu mieszaniny olejowej PCB (brak pików na chromatogramach). Pewne wzbogacenie enancjomeryczne zaobserwowano również w odniesieniu do PCB 91, 95 i PCB 149 w próbkach kału pobranych pomiędzy 12 a 24h eksperymentu. Należy zwrócić uwagę, że w próbkach kału zebranego pomiędzy 0 a 12 godziną od podania mieszaniny PCB, zarówno w przypadku myszy dzikich (WT) jak i transgenicznych (KO), stwierdzono racemiczny charakter analizowanych par atropoizomerów PCB ($EF \approx 0,5$). Zaobserwowane zjawisko było prawdopodobnie efektem braku absorpcji poszczególnych kongenerów w przewodzie pokarmowym, stwierdzonym na podstawie stosunkowo wysokiej zawartości tłuszczu i poziomów PCB w kale zwierząt doświadczalnych po podaniu *per os* olejowego roztworu PCB (tabela 33). Uzyskane wyniki zgodne są z wynikami przedstawionymi przez innych autorów w badaniach prowadzonych na myszach [111, 148] i szczurach [257].

Kierunek wzbogacenia enancjomerycznego poszczególnymi parami atropoizomerów pięciu PCB, tj.: 91, 95, 136, 145 i 174 był identyczny we wszystkich analizowanych matrycach obu grup zwierząt doświadczalnych. Zarówno u myszy WT jak i u myszy KO zaobserwowano wzbogacenie enancjomeryczne atropoizomerem (+)-PCB 136, (+)-PCB 149 i atropoizomerem (-)-PCB 174 oraz drugim eluowanym atropoizomerem PCB 91 i PCB 95, (kolejność elucji pików atropoizomerów obu kongenerów na kolumnie CP-Chirasil-Dex CB nie jest znana, ryc. 19). Analogicznie jak w niniejszej pracy, Kania-Korwel i wsp. stwierdzili enancjomeryczne wzbogacenie kongenerów (+)-PCB 136 [31, 111], (+)-PCB 149, (-)-PCB 174 oraz drugiego eluowanego atropoizomeru PCB 91 i PCB 95 [42] w tkankach, organach, moczu i kale myszy C57Bl/6, którym podano *per os* lub dootrzewnowo mieszaninę racemiczną PCB.

Reasumując, przedstawione powyżej dane sugerują, że wzbogacenie enancjomeryczne PCB nie zależy od typu myszy. Interesujący jest natomiast fakt, że wzbogacenie enancjomeryczne jest zależne od rodzaju kongeneru. Najbardziej wyraźne

wzbogacenie enancjomeryczne wykazują kolejno PCB 91 > PCB 149 > PCB 95 > PCB 136, natomiast PCB 174 charakteryzuje się najniższym wzbogaceniem enancjomerycznym we wszystkich badanych matrycach biologicznych.

2.1. Różnice międzygrupowe (WT vs KO) w obrębie danej matrycy

Analiza głównych składowych (PCA) wartości EF kongenerów PCB 91, 95, 136 149 i 174 oznaczonych w tkance tłuszczowej, kale, jelitach, nerkach i wątrobie nie wykazała grupowania wyników wg poszczególnych typów myszy (ryc. 26), co koreluje z wynikami analizy PCA profili poszczególnych kongenerów przedstawionych na rycinie 20 i 22. Niemniej, wielowymiarowa analiza wartości EF poszczególnych par atropoizomerów we wszystkich tkankach i organach z wykorzystaniem testu T^2 Hotelling'a, pozwoliła na stwierdzenie statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) pomiędzy wynikami uzyskanymi w każdej z grup zwierząt doświadczalnych (tabela 33). Szczególnie widoczne były różnice pomiędzy wartościami EF kongenerów PCB 91 ($p = 0,03$) i PCB 136 ($p = 0,01$). Zauważalna również była tendencja do różnicowania wartości EF pary atropoizomerów PCB 95 ($p = 0,06$), natomiast nie zaobserwowano tego trendu dla PCB 149 ($p = 0,09$) oraz PCB 174 ($p = 0,14$). Dalsza jednowymiarowa analiza (testem *t*-Studenta dla zmiennych niepowiązanych) wartości współczynników EF wykazała, że statystycznie znamienne różnice wyników uzyskane w grupie myszy WT i myszy KO są prawdopodobnie w dużej części efektem istotnych różnic wartości EF kongenerów PCB 91, 95, 149 ($p < 0,01$) oraz PCB 136 i 174 ($p < 0,05$), oznaczonych w próbkach tkanki tłuszczowej (ryc. 30, tabela 33). Interesującym jest fakt, że bardziej widoczne wzbogacenie enancjomeryczne wszystkich pięciu analizowanych kongenerów stwierdzono w przypadku tkanki tłuszczowej myszy grupy KO.

Co najmniej z dwóch przyczyn, wzbogacenie enancjomeryczne PCB w tkankach tłuszczowych myszy KO nie wydaje się być efektem enancjoselektywnego transportu kongenerów przez P-gp. Po pierwsze tkanka tłuszczowa nie jest głównym miejscem ekspresji genów *mdr1a/b* [59] i stąd też nie można się było spodziewać zmian we wzbogaceniu enancjomerycznym tej tkanki w wyniku aktywności P-gp. Po drugie: jeśli P-gp miałaby być przyczyną enancjomerycznego wzbogacania PCB, to jej brak u myszy KO powinien skutkować mniej widocznym wzbogaceniem enancjomerycznym poszczególnych kongenerów w warunkach *in vivo*. Tak więc za niewielkie różnice w enancjomerycznym wzbogacaniu PCB pomiędzy grupami WT i KO muszą być odpowiedzialne inne czynniki.

Jak wcześniej wspomniano, w porównaniu z myszami WT myszy typu KO charakteryzowały się statystycznie znamiennej większą masą ciała oraz większą ilością PCB wydalonych z kałem, co skutkowało tzw. efektem „rozmycia dawki”. Efekt ten może z kolei wyjaśniać mniejsze ilości poszczególnych kongenerów w tkance tłuszczowej tych myszy (KO). Jak wynika z badań Kani-Korwel i wsp., enancjoselektywny proces dystrybucji PCB *in vivo* jest zależny od dawki, tzn. mniejszym stężeniom PCB w tkankach myszy C57Bl/6 towarzyszyło większe enancjomeryczne wzbogacenie atropoizomerów (+)-PCB 136 [31, 111]. Stąd też, bardziej widoczne wzbogacenie enancjomeryczne stwierdzone u myszy KO można wytłumaczyć z jednej strony mniejszymi stężeniami PCB w tkankach i organach, w porównaniu z myszami grupy WT, a z drugiej strony efektem „rozmycia dawki”, skutkującym „rozcieńczeniem” dystrybuowanych PCB w organizmie myszy KO. Inną przyczyną różnic poziomów PCB i współczynników EF w obu gatunkach myszy mogłyby być różnice w poziomach wątrobowych enzymów cytochromu P-450 pomiędzy myszy WT i KO. Badania innych autorów [303, 304] przeprowadzone na myszach pozbawionych genów *mdr1a/b* wykazały, że brak tych genów wpływa na zwiększoną ekspresję niektórych enzymów cytochromu P-450 w wątrobie, co z kolei może tłumaczyć wzrost enancjomerycznego wzbogacenia PCB u myszy KO na drodze biotransformacji [88, 90].

2.2. Różnice międzytkankowe w obrębie danej grupy (WT lub KO)

Interpretacja geometryczna wyników PCA przedstawionych na rycinie 26 (Wykres PC1 względem PC2 dla frakcji enancjomerycznych (EF) PCB 91, 95, 136, 149, i 176.) wskazuje na wyraźne grupowanie próbek tkanek, organów i kału w dwuwymiarowej przestrzeni pierwszych dwóch głównych składowych (PC1 i PC2), wyjaśniających 95% całkowitej zmienności danych (wartości EF). Pierwsza główna składowa (PC1) rozdzieliła wszystkie tkanki i organy od próbek kału. Ponadto PC1 rozdzieliła próbki wątroby od próbek tkanki tłuszczowej, jelit i nerek. Oddzielenie to wynikało z najwyższego enancjomerycznego wzbogacenia wszystkich pięciu kongenerów PCB w wątrobie ($0,11 \leq EF \leq 0,85$, ryc. 30, tabela 33). Jednocześnie, najmniejsze wzbogacenie enancjomeryczne stwierdzono w próbkach kału ($0,36 \leq EF \leq 0,57$), podczas gdy w innych matrycach (tkanka tłuszczowa, jelita, nerki) przyjmowało ono wartości pośrednie ($0,21 \leq EF \leq 0,75$). Z kolei druga główna składowa (PC2) oddzieliła próbki nerki od próbek tkanki tłuszczowej i jelit. Zróżnicowanie to, w pierwszym rzędzie było wynikiem stosunkowo niższego wzbogacenia enancjomerycznego (+)-PCB 136 w

nerkach (tabela 33). W odróżnieniu od wspomnianego wyżej kongeneru wszystkie inne PCB wykazywały podobne wartości EF w próbkach nerek, jelit i tkanki tłuszczowej.

Uzyskane dane na temat najbardziej znaczącego wzbogacenia enancjomerycznego pięciu badanych kongenerów w wątrobie obu grup zwierząt, są zgodne z wynikami wcześniejszych badań zespołu Lehmlera, przeprowadzonych na samcach i samicach myszy CB57Bl/6, które wykazały znaczące wzbogacenie enancjomeryczne (+)-PCB 84 [74] i (+)-PCB 136 [31, 111] w wątrobie tych zwierząt doświadczalnych. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem stosunkowo wysokiego wzbogacenia enancjomerycznego PCB w wątrobie jest enancjoselektywny metabolizm PCB przez izoenzymy CYP cytochromu P-450, postulowany w ostatnim czasie przez wielu autorów [27, 90, 307].

Innym czynnikiem wpływającym na wyniki grupowania PCA są niemal racemiczne wartości EF ($EF \approx 0,5$) kongenerów PCB oznaczonych w kale w obu przedziałach czasowych (0-12h i 12-24h). Wartości $EF \approx 0,5$ wskazują na to, że większość atropoizomerów PCB zostało wydalonych z kałem w ciągu 12 godzin od podania *per os* olejowego roztworu PCB jako niewchłonięta części podanej dawki PCB (na skutek ograniczonej absorpcji poszczególnych kongenerów ze światła jelita zostały one wydalone w stanie niezmienionym). Świadczy to o tym, że w przewodzie pokarmowym procesy transportu aktywnego z udziałem P-gp nie wpływają na preferencyjną absorpcję poszczególnych atropoizomerów PCB (enancjoselektywne wchłanianie jednego z danej pary atropoizomerów PCB).

2.3. Rozmieszczenie atropoizomerów PCB w organizmach myszy (wyniki badań własnych) i innych ssaków (dane z piśmiennictwa)

Oznaczone w ramach niniejszej pracy wartości EF pięciu par atropoizomerów (PCB 91, 95, 136, 149 i 174) w poszczególnych matrycach myszy WT i KO pozwalają na porównanie uzyskanych kierunków enancjoselektywnego wzbogacenia tych PCB z opublikowanymi wynikami oznaczeń „*chiral signatures*” u innych gatunków zwierząt a także ludzi.

Stosunkowo małe wzbogacenie enancjomeryczne stwierdzono w badaniach prowadzonych na szczurach, którym dootrzewnowo podano Aroclor 1254 [26, 75, 91]. Enancjomeryczne wzbogacenie drugiego eluowanego atropoizomeru PCB 95 oraz (+)-PCB 149 we krwi szczurów dobrze koreluje z kierunkiem wzbogacenia enancjomerycznego u myszy uzyskanego w badaniach własnych. Jednakże w przeciwieństwie do wyników badań

własnych, (-)-PCB 149 wzbogacony był w tkance tłuszczowej i wątrobie szczurów po podaniu w/w Arochloru 1254. Ponadto słabe wzbogacenie (-)-PCB-136 zaobserwowane zostało u samców i samic szczurów po dootrzewnowym podaniu dwóch dawek racemicznego PCB 136 [91], co też jest przeciwne do kierunku wzbogacenia enancjomerycznego atropoizomerów tego kongeneru wykazanego u myszy WT i KO. Z kolei prowadzone *in vivo* badanie metabolizmu PCB na szczurach z rekombinowanym cytochromem P-450 2B1 również wykazało enancjoselektywną eliminację (+)-PCB 136 [90].

“*Chiral signatures*” w mleku i tkankach ludzkich także sugerują pewne różnice czy rozbieżności w kierunku wzbogacenia enancjomerycznego w porównaniu ze stwierdzonymi u myszy. Podobnie do wyników uzyskanych w niniejszej pracy (ryc. 30), w mleku kobiecym ze Szwajcarii i Hiszpanii stwierdzono wzbogacenie drugiego eluowanego atropoizomeru PCB 91 i (-) PCB 174 [33]. Jednakże uzyskane w ramach cytowanej pracy wartości EF kongenerów PCB 95 i PCB 149 różnią się zarówno pomiędzy ludzkimi próbkami jak i miejscem ich pobrania, sugerując znaczące różnice w stopniu i kierunku wzbogacania pomiędzy poszczególnymi osobnikami (zmiennosc osobnicza). Potwierdzenie tego mogą stanowić wyniki badań przeprowadzonych w Anglii i w Belgii gdzie np. wartości EF kongenerów PCB 95 i PCB 149 wahają się od 0,42-0,50 w kale [27] do 0,51-0,75 w wątrobie ludzkiej [101]. Podobnie, wartości EF atropoizomerów PCB 149 wskazują, że (-)-PCB 149 jest wzbogacony w wątrobie (EF=0,42-0,50) [101], podczas gdy (+)-PCB 149 jest wzbogacony w niektórych próbkach mleka kobiecego (EF=0,50-0,66) [33]. W tych matrycach drugi eluowany atropoizomer PCB 95 (EF<0,5) i (+)-PCB 149 był wzbogacony enancjomerycznie w kierunku podobnym jak w badaniach własnych w tkankach i organach myszy WT i KO.

Przedstawione wyżej dane wskazują na różnice i rozbieżności w kierunku wzbogacenia enancjomerycznego u myszy i innych gatunków, takich jak szczury czy człowiek. U ludzi mogą one być m.in. efektem ekspozycji na enancjomerycznie wzbogaconą żywność (np. ryby [126]). Z drugiej strony proces odpowiedzialny za enancjomeryczne wzbogacenie może wykazywać różną selektywność w odniesieniu do poszczególnych atropoizomerów PCB [36, 88, 90, 314]. W końcu duża zmienność w enancjomerycznym wzbogaceniu ludzkich tkanek i organów może być również wynikiem polimorfizmu genetycznego enzymów/białek odpowiedzialnych za wzbogacenie enancjomeryczne PCB [36, 86].

VIII. WNIOSKI

1. Wyniki przeprowadzonych badań nie potwierdziły założonej w celu pracy tezy o tym, że chiralne kongenery PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 mogą być substratami glikoproteiny-P, kodowanej genami *mdr1a* i *mdr1b* u myszy.
2. Wykazane chemometrycznymi i statystycznymi metodami istotne różnice pomiędzy rozmieszczeniem poszczególnych kongenerów w organach, tkankach i wydalinach myszy niepozbawionych (WT) i pozbawionych genów *mdr1a/b* (KO) mogą wynikać z tzw. efektu rozmycia dawki, spowodowanego:
 - wyższą wyjściową masą ciała myszy KO, oraz
 - znacznie wyższą ilością niewchłoniętej dawki poszczególnych PCB wydaloną z kałem przez myszy KO w ciągu 24h od podania *per os*.
3. Wyniki badań własnych wykazały, że PCB 183 kumuluje się wybiórczo w wątrobie myszy WT i KO. Różnice w poziomach PCB oznaczone w wątrobach odzwierciedlają dłuższy okres biologicznego półtrwania PCB 183 w porównaniu do innych kongenerów użytych w badaniach
4. Zaproponowany model badań *in vivo*, z wykorzystaniem myszy transgenicznych (pozbawionych genów *mdr1a/b*) może stanowić narzędzie do oceny depozycji PCB i być może innych ksenobiotyków (w tym leków), które ulegają transportowi aktywnemu i/lub biotransformacji.
5. Podczas korzystania z zaproponowanego modelu, należy zwrócić uwagę na jego pewne ograniczenie, polegające na możliwym wpływie mutacji genów *mdr1a/1b* na zmiany w ekspresji wielu innych genów, co może zmieniać procesy fizjologiczne u zwierząt transgenicznych (a tym samym może wpływać na rozmieszczenie ksenobiotyków w sposób, który nie wynika z eliminacji poszczególnego genu).

IX. PIŚMIENICTWO

1. UNEP: *Persistent Organic Pollutants (POPs)*. <http://www.chem.unep.ch/Pops/default.htm>, data wejścia: 07.11.2011 r.
2. Erickson M.D., Kaley 2nd R.G.: *Applications of polychlorinated biphenyls*. Environ Sci Pollut Res Int. **18**: 135-151 (2011)
3. Crinnion W.J.: *Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences*. Altern Med Rev. **16**: 5-13 (2011)
4. Carpenter D.O.: *Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health*. Rev Environ Health. **21**: 1-23 (2006)
5. Meeker J.D.: *Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health*. Maturitas. **66**: 236-241 (2010)
6. Hansen L.G., Robertson L.W.: *PCBs: human and environmental disposition and toxicology* University of Illinois Press. 207 str., Urbana 2008
7. Szyrwinska K., Lulek J.: *Exposure to specific polychlorinated biphenyls and some chlorinated pesticides via breast milk in Poland*. Chemosphere. **66**: 1895-1903 (2007)
8. Jaraczewska K., Lulek J., Covaci A., Voorspoels S., Kaluba-Skotarczak A., Drews K., Schepens P.: *Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland*. Sci Total Environ. **372**: 20-31 (2006)
9. Lulek J.: *The study of human exposure to PCBs and OCPs in the Region III – Europe*, w Background document for the 2nd Technical Workshop of UNEP/GEF Project Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances - Region III - Europe. 2003: Brno. s. 1-20
10. Shields P.G.: *Understanding population and individual risk assessment: the case of polychlorinated biphenyls*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **15**: 830-839 (2006)
11. Jorissen J.: *Literature review. Outcomes associated with postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) via breast milk*. Adv Neonatal Care. **7**: 230-237 (2007)
12. Salay E., Garabrant D.: *Polychlorinated biphenyls and thyroid hormones in adults: a systematic review appraisal of epidemiological studies*. Chemosphere. **74**: 1413-1419 (2009)
13. Meeker J.D., Hauser R.: *Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction*. Syst Biol Reprod Med. **56**: 122-131 (2010)
14. Knerr S., Schrenk D.: *Carcinogenicity of "non-dioxinlike" polychlorinated biphenyls*. Crit Rev Toxicol. **36**: 663-694 (2006)
15. Suvorov A., Takser L.: *Facing the challenge of data transfer from animal models to humans: the case of persistent organohalogenes*. Environ Health. **7**: 58 (2008)
16. Birnbaum L.S., Staskal-Wikoff D.S.: *5th International PCB Workshop - summary and implications*. Environ Int. **36**: 814-818 (2010)
17. Ulbrich B., Stahlmann R.: *Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data*. Arch Toxicol. **78**: 252-268 (2004)
18. Hopf N.B., Ruder A.M., Succop P.: *Background levels of polychlorinated biphenyls in the U.S. population*. Sci Total Environ. **407**: 6109-6019 (2009)
19. Ritchie J.M., Vial S.L., Fuortes L.J., Robertson L.W., Guo H., Reedy V.E., Smith E.M.: *Comparison of proposed frameworks for grouping polychlorinated biphenyl congener data applied to a case-control pilot study of prostate cancer*. Environ Res. **98**: 105-113 (2005)
20. Lehmler H.-J., Robertson L.W.: *Atropisomers of PCBs*, w *PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects*. Eds: Robertson L.W., Hansen L.G.: The University Press of Kentucky. str. 61-65, Lexington, USA 2001

21. Muller T.A., Kohler H.-P.E.: *Chirality of pollutants - effects on metabolism and fate*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **64**: 300-316 (2004)
22. Smith S.W.: *Chiral toxicology: it's the same thing...only different*. Toxicol Sci. **110**: 4-30 (2009)
23. Chu S., Covaci A., Van de Vijver K., De Coen W., Blust R., Schepens P.: *Enantiomeric signatures of chiral polychlorinated biphenyl atropisomers in livers of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the southern North Sea*. J Environ Monit. **5**: 521-526 (2003)
24. Kodavanti P.R.S.: *Intracellular signaling and developmental neurotoxicity, w Molecular neurotoxicology: environmental agents and transcription-transduction coupling*. Ed. Zawia N.H.: CRC press. str. 151-182, Boca Raton, USA 2004
25. Lehmler H.J., Robertson L.W., Garrison A.W., Kodavanti P.R.: *Effects of PCB 84 enantiomers on [³H]-phorbol ester binding in rat cerebellar granule cells and 45Ca²⁺-uptake in rat cerebellum*. Toxicol Lett. **156**: 391-400 (2005)
26. Kania-Korwel I., Garrison A.W., Avants J.K., Hornbuckle K.C., Robertson L.W., Sulkowski W.W., Lehmler H.-J.: *Distribution of chiral PCBs in selected tissues in the laboratory rat*. Environ Sci Technol. **40**: 3704-3710 (2006)
27. Harrad S., Ren J., Hazrati S., Robson M.: *Chiral signatures of PCB#s 95 and 149 in indoor air, grass, duplicate diets and human faeces*. Chemosphere. **63**: 1368-1376 (2006)
28. Pessah I.N., Hansen L.G., Albertson T.E., Garner C.E., Ta T.A., Do Z., Kim K.H., Wong P.W.: *Structure-activity relationship for noncoplanar polychlorinated biphenyl congeners toward the ryanodine receptor-Ca²⁺ channel complex type 1 (RyR1)*. Chem Res Toxicol. **19**: 92-101 (2006)
29. Asher B.J., Wong C.S., Rodenburg L.A.: *Chiral source apportionment of polychlorinated biphenyls to the Hudson River estuary atmosphere and food web*. Environ Sci Technol. **41**: 6163-6169 (2007)
30. Jamshidi A., Hunter S., Hazrati S., Harrad S.: *Concentrations and chiral signatures of polychlorinated biphenyls in outdoor and indoor air and soil in a major U.K. conurbation*. Environ Sci Technol. **41**: 2153-2158 (2007)
31. Kania-Korwel I., Shaikh N.S., Hornbuckle K.C., Robertson L.W., Lehmler H.J.: *Enantioselective disposition of PCB 136 (2,2',3,3',6,6'-hexachlorobiphenyl) in C57BL/6 mice after oral and intraperitoneal administration*. Chirality. **19**: 56-66 (2007)
32. Bordajandi L.R., Gonzalez M.J.: *Enantiomeric fraction of selected chiral polychlorinated biphenyls in cow, goat, and ewe milk and dairy products by heart-cut multidimensional gas chromatography: first results*. J Dairy Sci. **91**: 483-489 (2008)
33. Bordajandi L.R., Abad E., González M.J.: *Occurrence of PCBs, PCDD/Fs, PBDEs and DDTs in Spanish breast milk: enantiomeric fraction of chiral PCBs*. Chemosphere. **70**: 567-575 (2008)
34. Pessah I.N., Lehmler H.J., Robertson L.W., Perez C.F., Cabrales E., Bose D.D., Feng W.: *Enantiomeric specificity of (-)-2,2',3,3',6,6'-hexachlorobiphenyl toward ryanodine receptor types 1 and 2*. Chem Res Toxicol. **22**: 201-207 (2009)
35. Yang D., Kim K.H., Phimister A., Bachstetter A.D., Ward T.R., Stackman R.W., Mervis R.F., Wisniewski A.B., Klein S.L., Kodavanti P.R., Anderson K.A., Wayman G., Pessah I.N., Lein P.J.: *Developmental exposure to polychlorinated biphenyls interferes with experience-dependent dendritic plasticity and ryanodine receptor expression in weanling rats*. Environ Health Perspect. **117**: 426-435 (2009)
36. Lehmler H.J., Harrad S.J., Huhnerfuss H., Kania-Korwel I., Lee C.M., Lu Z., Wong C.S.: *Chiral polychlorinated biphenyl transport, metabolism, and distribution: a review*. Environ Sci Technol. **44**: 2757-2766 (2010)
37. Kretschmer X.C., Baldwin W.S.: *CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters?* Chem Biol Interact. **155**: 111-128 (2005)
38. Schlummer M., Moser G.A., McLachlan M.S.: *Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs, and HCB in humans: mass balances and mechanistic considerations*. Toxicol Appl Pharmacol. **152**: 128-137 (1998)
39. Kelly B.C., Gobas F.A.P.C., McLachlan M.S.: *Intestinal absorption and biomagnification of organic contaminants in fish, wildlife and human*. Environ Toxicol Chem. **23**: 2324-2336 (2004)

40. Kania-Korwel I., Hornbuckle K.C., Peck A., Ludewig G., Robertson L.W., Sulkowski W.W., Espandiari P., Gairola C.G., Lehmler H.-J.: *Congener specific tissue distribution of Aroclor 1254 and a highly chlorinated environmental PCB mixture in rats*. Environ Sci Technol. **39**: 3513-3520 (2005)
41. Drouillard K.G., Fernie K.J., Letcher R.J., Shutt L.J., Whitehead M., Gebink W., Bird D.M.: *Bioaccumulation and biotransformation of 61 polychlorinated biphenyl and four polybrominated diphenyl ether congeners in juvenile american kestrels (Falco sparverius)*. Environ Toxicol Chem. **26**: 313-324 (2007)
42. Kania-Korwel I., El-Komy M.H., Veng-Pedersen P., Lehmler H.J.: *Clearance of polychlorinated biphenyl atropisomers is enantioselective in female C57Bl/6 mice*. Environ Sci Technol. **44**: 2828-2835 (2010)
43. Letcher R.J., Klasson-Wehler E., Bergman A.: *Methyl sulfone and hydroxylated metabolite of polychlorinated biphenyls*, w *The handbook of environmental chemistry - new types of persistent halogenated compounds*. Ed.: Passivirta J.: Springer-Verlag. str. 315-359, Berlin Heidelberg 2000
44. James M.O.: *Polychlorinated biphenyls: metabolism and metabolites*, w *PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects*. Eds: Robertson L.W., Hansen L.G.: The University Press of Kentucky. str. 35-46, Lexington, USA 2001
45. Hovander L., Linderholm L., Athanasiadou M., Athanassiadis I., Bignert A., Fangstrom B., Kocan A., Petrik J., Trnovec T., Bergman A.: *Levels of PCBs and their metabolites in the serum of residents of a highly contaminated area in eastern Slovakia*. Environ Sci Technol. **40**: 3696-3703 (2006)
46. Linderholm L., Park J.S., Kocan A., Trnovec T., Athanasiadou M., Bergman K., Hertz-Picciotto I.: *Maternal and cord serum exposure to PCB and DDE methyl sulfone metabolites in eastern Slovakia*. Chemosphere. **69**: 403-410 (2007)
47. Park J.S., Petreas M., Cohn B.A., Cirillo P.M., Factor-Litvak P.: *Hydroxylated PCB metabolites (OH-PCBs) in archived serum from 1950-60s California mothers: A pilot study*. Environ Int. **35**: 937-942 (2009)
48. Dirtu A.C., Jaspers V.L., Cernat R., Neels H., Covaci A.: *Distribution of PCBs, their hydroxylated metabolites, and other phenolic contaminants in human serum from two European countries*. Environ Sci Technol. **44**: 2876-2883 (2010)
49. Ellerichmann T., Bergman A., Franke S., Hühnerfuss H., Jakobsson E., König W.A., Larsson C.: *Gas chromatographic enantiomer separations of chiral PCB methyl sulfones and identification of selectively retained enantiomers in human liver*. Fresenius Environ Bull. **7**: 244-257 (1998)
50. Karasek L., Hajslova J., Rosmus J., Hühnerfuss H.: *Methylsulfonyl PCB and DDE metabolites and their enantioselective gas chromatographic separation in human adipose tissues, seal blubber and pelican muscle*. Chemosphere. **67**: S22-27 (2007)
51. Fernandez M.F., Kiviranta H., Molina-Molina J.M., Laine O., Lopez-Espinosa M.J., Vartiainen T., Olea N.: *Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxy-PCBs in adipose tissue of women in Southeast Spain*. Chemosphere. **71**: 1196-1205 (2008)
52. Larsson C., Ellerichmann T., Hühnerfuss H., Bergman A.: *Chiral PCB methyl sulfones in rat tissues after exposure to technical PCBs*. Environ Sci Technol. **36**: 2833-2838 (2002)
53. Larsson C., Norstrom K., Athanasiadis I., Bignert A., König W.A., Bergman A.: *Enantiomeric specificity of methylsulfonyl-PCBs and distribution of bis(4-chlorophenyl) sulfone, PCB, and DDE methyl sulfones in grey seal tissues*. Environ Sci Technol. **38**: 4950-4955 (2004)
54. Kawano M., Hasegawa J., Enomoto T., Onishi H., Nishio Y., Matsuda M., Wakimoto T.: *Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs): recent advances in wildlife contamination study*. Environ Sci. **12**: 315-324 (2005)
55. Kania-Korwel I., Zhao H., Norstrom K., Li X., Hornbuckle K.C., Lehmler H.-J.: *Simultaneous extraction and clean-up of polychlorinated biphenyls and their metabolites from small tissue samples using pressurized liquid extraction*. J Chromatogr A. **1214**: 37-46 (2008)
56. Berg V., Lyche J.L., Gutleb A.C., Lie E., Skaare J.U., Aleksandersen M., Ropstad E.: *Distribution of PCB 118 and PCB 153 and hydroxylated PCB metabolites (OH-CBs) in maternal, fetal and lamb tissues of sheep exposed during gestation and lactation*. Chemosphere. **80**: 1144-1150 (2010)

57. Lin J.H., Yamazaki M.: *Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications*. Clin Pharmacokinet. **42**: 59-98 (2003)
58. Annaert P.P., Turncliff R.Z., Booth C.L., Thakker D.R., Brouwer K.L.: *P-glycoprotein-mediated in vitro biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes*. Drug Metab Dispos. **29**: 1277-1283 (2001)
59. Abu-Qare A., Elmasry E., Abou-Donia M.: *A role for P-glycoprotein in environmental toxicology*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. **6**: 279-288 (2003)
60. Santoni-Rugiu E., Silverman J.A.: *Functional characterization of the rat mdr1b encoded P-glycoprotein: not all inducing agents are substrates*. Carcinogenesis. **18**: 2255-2263 (1997)
61. Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P.M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L., Chang G.: *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. Science. **323**: 1718-1722 (2009)
62. Klaassen C.D.: *Xenobiotic transporters: another protective mechanism for chemicals*. Int J Toxicol. **21**: 7-12 (2002)
63. Bain L.J., LeBlanc G.A.: *Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein*. Toxicol Appl Pharmacol. **141**: 288-298 (1996)
64. Bain L.J., McLachlan J.B., LeBlanc G.A.: *Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein*. Environ Health Perspect. **105**: 812-818 (1997)
65. Chawla A., Repa J.J., Evans R.M., Mangelsdorf D.J.: *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files*. Science. **294**: 1866-1870 (2001)
66. Hrycay E.G., Bandiera S.M.: *Spectral interactions of tetrachlorobiphenyls with hepatic microsomal cytochrome P450 enzymes*. Chem Biol Interact. **146**: 285-296 (2003)
67. Tampal N.M., Robertson L.W., Srinivasan C., Ludewig G.: *Polychlorinated biphenyls are not substrates for the multidrug resistance transporter-1*. Toxicol Appl Pharmacol. **187**: 168-177 (2003)
68. Milanowski B., Lulek J., Lehmler H.J., Kania-Korwel I.: *Assessment of the disposition of chiral polychlorinated biphenyls in female mdr 1a/b knockout versus wild-type mice using multivariate analyses*. Environ Int. **36**: 884-892 (2010)
69. Erickson M.D.: *Introduction: PCB Properties, Uses, Occurrence and Regulatory History, w PCBs recent advances in environmental toxicology and health effects*. Ed.: Robertson L.W., Hansen L.G.: The University Press of Kentucky. str. xi-xxx, Lexington 2001
70. Sułkowski W., Kania-Korwel I.: *Produkcja i przemysłowe zanieczyszczenie polichlorowanymi bifenyłami w Polsce, w Najnowsze osiągnięcia w ocenie zagrożenia toksykologicznego środowiska i zagrożenia zdrowia przez polichlorowane bifenyly*. pod redakcją: Sułkowski W., Lulek J., Sułkowska A.: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne TEZA. str. 11-20, Kraków 2007
71. Bringmann G., Price Mortimer A.J., Keller P.A., Gresser M.J., Garner J., Breuning M.: *Atroposelective synthesis of axially chiral biaryl compounds*. Angew Chem Int Ed Eng. **44**: 5384-5427 (2005)
72. Pham-Tuan H., Larsson C., Hoffmann F., Bergman A., Froba M., Hühnerfuss H.: *Enantioselective semipreparative HPLC separation of PCB metabolites and their absolute structure elucidation using electronic and vibrational circular dichroism*. Chirality. **17**: 266-280 (2005)
73. Döbler J., Peters N., Larsson C., Bergman Å., Geidel E., Hühnerfuss H.: *The absolute structures of separated PCB-methylsulfone enantiomers determined by vibrational circular dichroism and quantum chemical calculations*. J Mol Struct: THEOCHEM. **586**: 159-166 (2002)
74. Lehmler H.-J., Price D.J., Garrison A.W., Birge W.J., Robertson L.W.: *Distribution of PCB 84 enantiomers in C57Bl/6 mice*. Fresenius Environ Bull. **12**: 254-260 (2003)
75. Püttmann M., Mannschreck A., Oesch F., Robertson L.: *Chiral effects in the induction of drug-metabolizing enzymes using synthetic atropisomers of polychlorinated biphenyls (PCBs)*. Biochem Pharmacol. **38**: 1345-1352 (1989)
76. Hansen L.G.: *The ortho side of PCBs: occurrence and disposition* Kluwer Academic Publishers. 208 str., Norwell, USA 1999

77. Püttmann M., Oesch F., Robertson L.W., Mannschreck A.: *Characteristics of polychlorinated biphenyl (PCB) atropisomers*. Chemosphere. **15**: 2061-2064 (1986)
78. Kaiser K.L.E.: *On the optical activity of polychlorinated biphenyls*. Environ Pollut. **7**: 93-101 (1974)
79. Harju M.T., Haglund P.: *Determination of the rotational energy barriers of atropisomeric polychlorinated biphenyls*. Fresenius J Anal Chem. **364**: 219-223 (1999)
80. Schurig V., Glausch A., Fluck M.: *On the enantiomerization barrier of atropisomeric 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132)*. Tetrahedron - Asymmetry. **6**: 2161-2164 (1995)
81. Haglund P.: *Isolation and characterization of polychlorinated biphenyl (PCB) atropisomers*. Chemosphere. **32**: 2133-2140 (1996)
82. Haglund P.: *Enantioselective separation of polychlorinated biphenyl atropisomers using chiral high performance liquid chromatography*. J Chromatogr A. **724**: 219-228 (1996)
83. Haglund P., Wiberg K.: *Determination of the gas chromatographic elution sequences of the (+)- and (-)-enantiomers of stable atropisomeric PCBs on Chirasil-dex*. J High Resolut Chromatogr. **19**: 373-376 (1996)
84. Frame G.M., Wagner R.E., Carnahan J.C., Brown J.F., May R.J., Smullen L.A., Bedard D.L.: *Comprehensive, quantitative, congener-specific analyses of eight aroclors and complete PCB congener assignments on DB-1 capillary GC columns*. Chemosphere. **33**: 603-623 (1996)
85. Wiberg K., Letcher R., Sandau C.D., Duffe J., Norstrom R., Haglund P., Bidleman T.F.: *Enantioselective gas chromatography/mass spectrometry of methylsulfonyl PCBs with application of arctic marine mammals*. Anal Chem. **70**: 3845-3852 (1998)
86. Wong S.C.: *Chiral polychlorinated biphenyls and their metabolites, w PCBs: Human and Environmental Disposition and Toxicology*. Eds: Hansen L.G., Robertson L.W.: University of Illinois Press. str. 30-50, Urbana, Illinois, USA 2008
87. Maervoet J., Covaci A., Schepens P., Sandau C.D., Letcher R.: *A reassessment of the nomenclature of polychlorinated biphenyl (PCB) metabolites*. Environ Health Perspect. **112**: 291-294 (2004)
88. Wu X., Pramanik A., Duffel M.W., Hrycay E.G., Bandiera S.M., Lehmler H.J., Kania-Korwel I.: *2,2',3,3',6,6'-Hexachlorobiphenyl (PCB 136) Is Enantioselectively Oxidized to Hydroxylated Metabolites by Rat Liver Microsomes*. Chem Res Toxicol. **24**: 2249-2257 (2011)
89. Kania-Korwel I., Duffel M.W., Lehmler H.J.: *Gas chromatographic analysis with chiral cyclodextrin phases reveals the enantioselective formation of hydroxylated polychlorinated biphenyls by rat liver microsomes*. Environ Sci Technol. **45**: 9590-9596 (2011)
90. Warner N.A., Martin J.W., Wong C.S.: *Chiral polychlorinated biphenyls are biotransformed enantioselectively by mammalian cytochrome P-450 isozymes to form hydroxylated metabolites*. Environ Sci Technol. **43**: 114-121 (2009)
91. Kania-Korwel I., Vyas S.M., Song Y., Lehmler H.-J.: *Gas chromatographic separation of methoxylated polychlorinated biphenyl atropisomers*. J Chromatogr A. **1207**: 146-154 (2008)
92. Harner T., Wiberg K., Norstrom R.: *Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis*. Environ Sci Technol. **34**: 218-220 (1999)
93. Ulrich E.M., Helsel D.R., Foreman W.T.: *Complications with using ratios for environmental data: comparing enantiomeric ratios (ERs) and enantiomer fractions (EFs)*. Chemosphere. **53**: 531-538 (2003)
94. de Geus H.-J., Wester P.G., de Boer J., Brinkman U.A.T.: *Enantiomer fractions instead of enantiomer ratios*. Chemosphere. **41**: 725-727 (2000)
95. McNaught A.D., Wilkinson A.: *Compendium of chemical terminology: IUPAC recommendations*. 2nd ed Blackwell Science. 450 str., Oxford England ; Malden, Massachusetts, USA 1997
96. Wong C.S., Garrison A.W., Foreman W.T.: *Enantiomeric composition of chiral polychlorinated biphenyl atropisomers in aquatic bed sediment*. Environ Sci Technol. **35**: 33-39 (2001)
97. Wong C.S., Garrison A.W., Smith P.D., Foreman W.T.: *Enantiomeric composition of chiral polychlorinated biphenyl atropisomers in aquatic and riparian biota*. Environ Sci Technol. **35**: 2448-2454 (2001)

98. Wong C.S., Hoekstra P.F., Karlsson H., Backus S.M., Mabury S.A., Muir D.C.: *Enantiomer fractions of chiral organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in standard and certified reference materials*. *Chemosphere*. **49**: 1339-1347 (2002)
99. Hoekstra P.F., Wong C.S., O'Hara T.M., Solomon K.R., Mabury S.A., Muir D.C.: *Enantiomer-specific accumulation of PCB atropisomers in the bowhead whale (*Balaena mysticetus*)*. *Environ Sci Technol*. **36**: 1419-1425 (2002)
100. Chu S., Covaci A., Haraguchi K., Voorspoels S., Van de Vijver K., Das K., Bouquegneau J.M., De Coen W., Blust R., Schepens P.: *Levels and enantiomeric signatures of methyl sulfonyl PCB and DDE metabolites in livers of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Southern North Sea*. *Environ Sci Technol*. **37**: 4573-4578 (2003)
101. Chu S., Covaci A., Schepens P.: *Levels and chiral signatures of persistent organochlorine pollutants in human tissues from Belgium*. *Environ Res*. **93**: 167-176 (2003)
102. Harju M., Bergman A., Olsson M., Roos A., Haglund P.: *Determination of atropisomeric and planar polychlorinated biphenyls, their enantiomeric fractions and tissue distribution in grey seals using comprehensive 2D gas chromatography*. *J Chromatogr A*. **1019**: 127-142 (2003)
103. Pakdeesusuk U., Jones W.J., Lee C.M., Garrison A.W., O'Niell W.L., Freedman D.L., Coates J.T., Wong C.S.: *Changes in enantiomeric fractions during microbial reductive dechlorination of PCB132, PCB149, and Aroclor 1254 in Lake Hartwell sediment microcosms*. *Environ Sci Technol*. **37**: 1100-1107 (2003)
104. Robson M., Harrad S.: *Chiral PCB signatures in air and soil: implications for atmospheric source apportionment*. *Environ Sci Technol*. **38**: 1662-1666 (2004)
105. Bordajandi L.R., Korytar P., de Boer J., Gonzalez M.J.: *Enantiomeric separation of chiral polychlorinated biphenyls on beta-cyclodextrin capillary columns by means of heart-cut multidimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography. Application to food samples*. *J Sep Sci*. **28**: 163-171 (2005)
106. Warner N.A., Norstrom R.J., Wong C.S., Fisk A.T.: *Enantiomeric fractions of chiral polychlorinated biphenyls provide insights on biotransformation capacity of arctic biota*. *Environ Toxicol Chem*. **24**: 2763-2767 (2005)
107. Gómara B., González M.J.: *Enantiomeric fractions and congener specific determination of polychlorinated biphenyls in eggs of predatory birds from Donana National Park (Spain)*. *Chemosphere*. **63**: 662-669 (2006)
108. Jorundsdottir H., Norstrom K., Olsson M., Pham-Tuan H., Hühnerfuss H., Bignert A., Bergman A.: *Temporal trend of bis(4-chlorophenyl) sulfone, methylsulfonyl-DDE and -PCBs in Baltic guillemot (*Uria aalge*) egg 1971-2001--a comparison to 4,4'-DDE and PCB trends*. *Environ Pollut*. **141**: 226-237 (2006)
109. Konwick B.J., Garrison A.W., Black M.C., Avants J.K., Fisk A.T.: *Bioaccumulation, biotransformation, and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout*. *Environ Sci Technol*. **40**: 2930-2936 (2006)
110. Kania-Korwel I., Xie W., Hornbuckle K.C., Robertson L.W., Lehmler H.J.: *Enantiomeric enrichment of 2,2',3,3',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 136) in mice after induction of CYP enzymes*. *Arch Environ Contam Toxicol*. **55**: 510-517 (2008)
111. Kania-Korwel I., Hornbuckle K.C., Robertson L.W., Lehmler H.J.: *Dose-dependent enantiomeric enrichment of 2,2',3,3',6,6'-hexachlorobiphenyl in female mice*. *Environ Toxicol Chem*. **27**: 299-305 (2008)
112. Koblickova M., Ducek L., Jarkovsky J., Hofman J., Bucheli T.D., Klanova J.: *Can physicochemical and microbial soil properties explain enantiomeric shifts of chiral organochlorines?* *Environ Sci Technol*. **42**: 5978-5984 (2008)
113. Liu Y., Lehmler H.J., Robertson L.W., Duffel M.W.: *Physicochemical properties of hydroxylated polychlorinated biphenyls aid in predicting their interactions with rat sulfotransferase 1A1 (rSULT1A1)*. *Chem Biol Interact*. **189**: 153-160 (2011)
114. Hu X., Adamcakova-Dodd A., Lehmler H.J., Hu D., Kania-Korwel I., Hornbuckle K.C., Thorne P.S.: *Time course of congener uptake and elimination in rats after short-term inhalation exposure to an airborne polychlorinated biphenyl (PCB) mixture*. *Environ Sci Technol*. **44**: 6893-6900 (2010)

115. Aries E., Anderson D.R., Fisher R.: *Exposure assessment of workers to airborne PCDD/Fs, PCBs and PAHs at an electric arc furnace steelmaking plant in the UK*. *Ann Occup Hyg.* **52**: 213-225 (2008)
116. Hu D., Lehmler H.J., Martinez A., Wang K., Hornbuckle K.C.: *Atmospheric PCB congeners across Chicago*. *Atmos Environ.* **44**: 1550-1557 (2010)
117. Cleemann M., Riget F., Paulsen G.B., de Boer J., Klungsoyr J., Aastrup P.: *Organochlorines in Greenland lake sediments and landlocked Arctic char (*Salvelinus alpinus*)*. *Sci Total Environ.* **245**: 173-185 (2000)
118. Rawn D.F., Lockhart W.L., Wilkinson P., Savoie D.A., Rosenberg G.B., Muir D.C.: *Historical contamination of Yukon Lake sediments by PCBs and organochlorine pesticides: influence of local sources and watershed characteristics*. *Sci Total Environ.* **280**: 17-37 (2001)
119. Singer A.C., Wong C.S., Crowley D.E.: *Differential enantioselective transformation of atropisomeric polychlorinated biphenyls by multiple bacterial strains with different inducing compounds*. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 5756-5759 (2002)
120. Palmer P., Wilson L., Casey A., Wagner R.: *Occurrence of PCBs in raw and finished drinking water at seven public water systems along the Hudson River*. *Environ Monit Assess.* **175**: 487-499 (2011)
121. Weber R., Watson A., Forter M., Oliaei F.: *Review Article: Persistent organic pollutants and landfills - a review of past experiences and future challenges*. *Waste Manag Res.* **29**: 107-121 (2011)
122. Breivik K., Sweetman A., Pacyna J.M., Jones K.C.: *Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners--a mass balance approach 3. An update*. *Sci Total Environ.* **377**: 296-307 (2007)
123. Ross M.S., Pulster E.L., Ejsmont M.B., Chow E.A., Hessel C.M., Maruya K.A., Wong C.S.: *Enantioselectivity of polychlorinated biphenyl atropisomers in sediment and biota from the Turtle/Brunswick River estuary, Georgia, USA*. *Mar Pollut Bull.* **63**: 548-555 (2011)
124. Wong F., Robson M., Diamond M.L., Harrad S., Truong J.: *Concentrations and chiral signatures of POPs in soils and sediments: a comparative urban versus rural study in Canada and UK*. *Chemosphere.* **74**: 404-411 (2009)
125. Wong C.S., Pakdeesusuk U., Morrissey J.A., Lee C.M., Coates J.T., Garrison A.W., Mabury S.A., Marvin C.H., Muir D.C.: *Enantiomeric composition of chiral polychlorinated biphenyl atropisomers in dated sediment cores*. *Environ Toxicol Chem.* **26**: 254-263 (2007)
126. Wong C.S., Mabury S.A., Whittle D.M., Backus S.M., Teixeira C., DeVault D.S., Bronte C.R., Muir D.C.: *Organochlorine compounds in Lake Superior: chiral polychlorinated biphenyls and biotransformation in the aquatic food web*. *Environ Sci Technol.* **38**: 84-92 (2004)
127. Drouillard K.G., Fernie K.J., Smits J.E., Bortolotti G.R., Bird D.M., Norstrom R.J.: *Bioaccumulation and toxicokinetics of 42 polychlorinated biphenyl congeners in american kestrels (*Falco sparverius*)*. *Environ Toxicol Chem.* **20**: 2514-2522 (2001)
128. Weisbrod A.V., Shea D., Moore M.J., Stegeman J.J.: *Bioaccumulation patterns of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in Northwest Atlantic pilot whales*. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 667-677 (2000)
129. Letcher R.J., Norstrom R.J., Muir D.C.G.: *Biotransformation versus bioaccumulation: sources of methyl sulfone PCB and 4,4'-DDE metabolites in the polar bear food chain*. *Environ Sci Technol.* **32**: 1656-1661 (1998)
130. Gobas F.A.P.C., McCorquodale J.R., Haffner G.D.: *Intestinal absorption and biomagnification of organochlorines*. *Environ Toxicol Chem.* **12**: 567-576 (1993)
131. Ross M.S., Verreault J., Letcher R.J., Gabrielsen G.W., Wong C.S.: *Chiral organochlorine contaminants in blood and eggs of glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) from the Norwegian Arctic*. *Environ Sci Technol.* **42**: 7181-7186 (2008)
132. Gebbink W.A., Sonne C., Dietz R., Kirkegaard M., Born E.W., Muir D.C., Letcher R.J.: *Target tissue selectivity and burdens of diverse classes of brominated and chlorinated contaminants in polar bears (*Ursus maritimus*) from East Greenland*. *Environ Sci Technol.* **42**: 752-759 (2008)
133. Houde M.P., Grazina; Wells, Randall S.; Fair, Patricia A.; Letcher, Robert J.; Alaei, Mehran; Bossart, Gregory D.; Hohn, Aleta A.; Sweeney, Jay; Solomon, Keith R.; Muir, Derek C. G.: *Polychlorinated biphenyls and hydroxylated polychlorinated biphenyls in plasma of bottlenose dolphins (*Tursiops**

- truncatus*) from the Western Atlantic and the Gulf of Mexico. Environ. Sci. Technol. **40**: 5860-5866 (2006)
134. Sandala G.M., Sonne H., C., Dietz R., Muir D.C.G., Valters K., Bennett E.R., Born E.W., Letcher R.J.: *Hydroxylated and methyl sulfone PCB metabolites in adipose and whole blood of polar bear (Ursus maritimus) from East Greenland*. Sci. Total Environ. **331**: 125-141 (2004)
135. Jorgensen E.H., Vijayan M.M., Killie J.E., Aluru N., Aas-Hansen O., Maule A.: *Toxicokinetics and effects of PCBs in Arctic fish: a review of studies on Arctic charr*. J Toxicol Environ Health A. **69**: 37-52 (2006)
136. Jorgensen E.H., Foshaug H., Andersson P., Burkow I.C., Jobling M.: *Polychlorinated biphenyl toxicokinetics and P4501A responses in anadromous Arctic charr during winter emaciation*. Environ Toxicol Chem. **21**: 1745-1752 (2002)
137. Kunisue T., Watanabe M.X., Iwata H., Tsubota T., Yamada F., Yasuda M., Tanabe S.: *PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in wild terrestrial mammals from Japan: congener specific accumulation and hepatic sequestration*. Environ Pollut. **140**: 525-535 (2006)
138. Iwata H., Watanabe M., Okajima Y., Tanabe S., Amano M., Miyazaki N., Petrov E.A.: *Toxicokinetics of PCDD, PCDF, and coplanar PCB congeners in Baikal seals, Pusa sibirica: age-related accumulation, maternal transfer, and hepatic sequestration*. Environ Sci Technol. **38**: 3505-3513 (2004)
139. Buckman A.H., Wong C.S., Chow E.A., Brown S.B., Solomon K.R., Fisk A.T.: *Biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and bioformation of hydroxylated PCBs in fish*. Aquat Toxicol. **78**: 176-185 (2006)
140. Buckman A.H., Brown S.B., Hoekstra P.F., Solomon K.R., Fisk A.T.: *Toxicokinetics of three polychlorinated biphenyl technical mixtures in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Environ Toxicol Chem. **23**: 1725-1736 (2004)
141. Lipscomb J.C., Ohanian E.V.: *Toxicokinetics and risk assessment* Informa Healthcare. 361 str., New York, USA 2007
142. Krüse J., Verhaar H.J.M., de Raat W.K.: *The practical applicability of toxicokinetic models in the risk assessment of chemicals* Kluwer Academic Publishers. 194 str., Dordrecht; Boston, USA 2002
143. Lotti M.: *Pharmacokinetics and blood levels of polychlorinated biphenyls*. Toxicol Rev. **22**: 203-215 (2003)
144. Drouillard K.G., Paterson G., Haffner G.D.: *A combined food web toxicokinetic and species bioenergetic model for predicting seasonal PCB elimination by yellow perch (Perca flavescens)*. Environ Sci Technol. **43**: 2858-2864 (2009)
145. Kubota A., Iwata H., Tanabe S., Yoneda K., Tobata S.: *Congener-specific toxicokinetics of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in black-eared kites (Milvus migrans): cytochrome P4501A-dependent hepatic sequestration*. Environ Toxicol Chem. **25**: 1007-1016 (2006)
146. Tanabe S., Nakagawa Y., Tatsukawa R.: *Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products*. Agric Biol Chem. **45**: 717-726 (1981)
147. Bergman Å., Larsen G.L., Bakke J.E.: *Biliary secretion, retention and excretion of five ¹⁴C-labelled polychlorinated biphenyls in the rat*. Chemosphere. **11**: 249-253 (1982)
148. Kania-Korwel I., Hornbuckle K.C., Robertson L.W., Lehmler H.J.: *Influence of dietary fat on the enantioselective disposition of 2,2',3,3',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 136) in female mice*. Food Chem Toxicol. **46**: 637-644 (2008)
149. Hornbuckle K.C., Carlson D.L., Swackhamer D.L., Baker J.E., Eisenreich S.J.: *Polychlorinated biphenyls in the Great Lakes*, w *Handbook of environmental chemistry*. Ed.: Hites R.: Springer Verlag. str. 13-70, Berlin Heidelberg 2006
150. Garner C.E., Matthews H.B.: *The effect of chlorine substitution on the dermal absorption of polychlorinated biphenyls*. Toxicol Appl Pharmacol. **149**: 150-158 (1998)
151. Wester R.C., Bucks D.A., Maibach H.I., Anderson J.: *Polychlorinated biphenyls (PCBs): dermal absorption, systemic elimination, and dermal wash efficiency*. J Toxicol Environ Health. **12**: 511-519 (1983)

152. Jackson J.A., Diliberto J.J., Birnbaum L.S.: *Estimation of octanol-water partition coefficients and correlation with dermal absorption for several polyhalogenated aromatic hydrocarbons*. *Fundam Appl Toxicol.* **21**: 334-344 (1993)
153. Noren K., Weistrand C., Karpe F.: *Distribution of PCB congeners, DDE, hexachlorobenzene, and methylsulfonyl metabolites of PCB and DDE among various fractions of human blood plasma*. *Arch Environ Contam Toxicol.* **37**: 408-414 (1999)
154. DeCaprio A.P., Johnson G.W., Tarbell A.M., Carpenter D.O., Chiarenzelli J.R., Morse G.S., Santiago-Rivera A.L., Schymura M.J.: *Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure assessment by multivariate statistical analysis of serum congener profiles in an adult Native American population*. *Environ Res.* **98**: 284-302 (2005)
155. Muhlebach S., Wyss P.A., Bickel M.H.: *The use of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl (6-CB) as an unmetabolizable lipophilic model compound*. *Pharmacol Toxicol.* **69**: 410-415 (1991)
156. Matthews H.B., Dedrick R.L.: *Pharmacokinetics of PCBs*. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* **24**: 85-103 (1984)
157. Anderson M.W., Eling T.E., Lutz R.J., Dederick R.L., Matthews H.B.: *The construction of pharmacokinetic model for the disposition of polychlorinated biphenyls in the rat*. *Clin Pharmacol Ther.* **22**: 765-773 (1977)
158. Parham F.M., Kohn M.C., Matthews H.B., Derosa C., Portier C.J.: *Using structural information to create physiologically based pharmacokinetic models for all polychlorinated biphenyls: I. Tissue:blood partition coefficients*. *Toxicol Appl Pharmacol.* **144**: 340-347 (1997)
159. Matthews H.B., Anderson M.W.: *Effect of chlorination on the distribution and excretion of polychlorinated biphenyls*. *Drug Metab Dispos.* **3**: 371-380 (1975)
160. Matthews H.B., Tuey D.B.: *The effect of chlorine position on the distribution and excretion of four hexachlorobiphenyl isomers*. *Toxicol Appl Pharmacol.* **53**: 377-388 (1980)
161. Tanabe S. N.Y., Tatsukawa R.: *Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products*. *Agric Biol Chem.* **45**: 717-716 (1981)
162. Borlakoglu J.T., Drew M.G.B., Wilkins J.P.G., Dils R.R.: *Effects of molecular substitution patterns on the cytochrome P-450 dependent metabolism of 2,2',3,5,5',6- and 2,2',3,4,4',6-hexachlorobiphenyl by rat liver microsomal monooxygenases*. *Biochem Biophys Acta.* **1036**: 167-175 (1990)
163. Borlakoglu J.T., Wilkins J.P.G., Dils R.R.: *Metabolism by rat hepatic microsomes of individual isomers and congeners in Aroclor 1016*. *Bull Environ Contam Toxicol.* **46**: 436-441 (1991)
164. Sandau C.D., Ayotte P., Dewailly D., Duffe J., Norstrom R.J.: *Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit*. *Environ Health Persp.* **108**: 611-616 (2000)
165. Faroon O., Jones D., de Rosa C.: *Effects of polychlorinated biphenyls on the nervous system*. *Toxicol Ind Health.* **16**: 305-333 (2001)
166. Skrbic B., Szyrwinska K., Durisic-Mladenovic N., Nowicki P., Lulek J.: *Principal component analysis of indicator PCB profiles in breast milk from Poland*. *Environ Int.* **36**: 862-872 (2010)
167. Park H.Y., Hertz-Picciotto I., Sovcikova E., Kocan A., Drobna B., Trnovec T.: *Neurodevelopmental toxicity of prenatal polychlorinated biphenyls (PCBs) by chemical structure and activity: a birth cohort study*. *Environ Health.* **9**: 51 (2010)
168. Schantz S.L., Widholm J.J., Rice D.C.: *Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children*. *Environ Health Perspect.* **111**: 357-376 (2003)
169. Kimura Y., Morita S.-Y., Matsuo M., Ueda K.: *Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1*. *Cancer Sci.* **98**: 1303-1310 (2007)
170. Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R.: *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. *Genome Res.* **11**: 1156-1166 (2001)
171. Klaassen C.D., Lu H.: *Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies*. *Toxicol Sci.* **101**: 186-196 (2008)

172. Schinkel A.H.: *Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice*. Int J Clin Pharmacol Ther. **36**: 9-13 (1998)
173. Cui Y., Cheng X., Miao Weaver Y., Klaassen C.D.: *Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (mdr1a, mdr1b, mdr2) in mice*. Drug Metab Dispos. **37**:203-209 (2008)
174. Ward A., Reyes C.L., Yu J., Roth C.B., Chang G.: *Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist*. Proc Natl Acad Sci U S A. **104**: 19005-19010 (2007)
175. Tateishi T., Miura M., Suzuki T., Uno T.: *The different effects of itraconazole on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers*. Br J Clin Pharmacol. **65**: 693-700 (2008)
176. Crettol S., Digon P., Powell Golay K., Brawand M., Eap C.B.: *In vitro P-glycoprotein-mediated transport of (R)-, (S)-, (R,S)-methadone, LAAM and their main metabolites*. Pharmacology. **80**: 304-311 (2007)
177. de Lagerie S.B., Comets E., Gautrand C., Fernandez C., Auchere D., Singlas E., Mentre F., Gimenez F.: *Cerebral uptake of mefloquine enantiomers with and without the P-gp inhibitor elacridar (GF1210918) in mice*. Br J Pharmacol. **141**: 1214-1222 (2004)
178. Li H., Boon J.P., Lewis W.E., van den Berg M., Nyman M., Letcher R.J.: *Hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme activity in relation to in vitro metabolism/inhibition of polychlorinated biphenyls and testosterone in Baltic grey seal (Halichoerus grypus)*. Environ Toxicol Chem. **22**: 636-644 (2003)
179. McGraw J.E.S., Waller D.P.: *Specific human CYP 450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC# 101)*. Biochem Biophys Res Commun. **344**: 129-133 (2006)
180. Robertson L.W., Gupta R.C.: *Metabolism of polychlorinated biphenyls (PCBs) generates electrophiles and reactive oxygen species that damage DNA*, w *Molecular Drug Metabolism and Toxicology*. Eds: Williams G.M., Aruoma O.I.: OICA International. str. 16-32, Londyn 2000
181. Spencer W.A., Lehmler H.-J., Robertson L.W., Gupta R.C.: *Oxidative DNA adducts after Cu²⁺-mediated activation of dihydroxy PCBs: role of reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med. **46**: 1346-1352 (2009)
182. Koga N., Kikuichi-Nishimura N., Hara T., Harada N., Ishii Y., Yamada H., Oguri K., Yoshimura H.: *Purification and characterization of a newly identified isoform of cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver*. Arch Biochem Biophys. **317**: 464-470 (1995)
183. Preston B.D., Allen J.R.: *2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl: isolation and identification of metabolites generated by rat liver microsomes*. Drug Metab Dispos. **8**: 197-204 (1980)
184. Bakke J.E., Bergman A.L., Larsen G.L.: *Metabolism of 2,4',5-trichlorobiphenyl by the mercapturic acid pathway*. Science. **217**: 645-647 (1982)
185. Bakke J., Gustafsson J.-Å.: *Mercapturic acid pathway metabolites of xenobiotics: generation of potentially toxic metabolites during enterohepatic circulation*. Trends Pharmacol Sci. **5**: 517-521 (1984)
186. Haraguchi K., Kuroki H., Masuda Y.: *Determination of hydroxy methylsulfone metabolites of PCB in Yusho patients*. Chemosphere. **16**: 2033-2038 (1987)
187. Tampal N., Lehmler H.J., Espandiari P., Malmberg T., Robertson L.W.: *Glucuronidation of hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs)*. Chem Res Toxicol. **15**: 1259-1266 (2002)
188. Morck A., Larsen G., Wehler E.K.: *Covalent binding of PCB metabolites to lipids: route of formation and characterization*. Xenobiotica. **32**: 625-640 (2002)
189. Ritter R., Scheringer M., MacLeod M., Moeckel C., Jones K.C., Hungerbuhler K.: *Intrinsic human elimination half-lives of polychlorinated biphenyls derived from the temporal evolution of cross-sectional biomonitoring data from the United Kingdom*. Environ Health Perspect. **119**: 225-231 (2011)
190. Noren K., Meironyte D.: *Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years*. Chemosphere. **40**: 1111-1123 (2000)
191. Aoki Y.: *Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters - what we have learned from Yusho disease*. Environ Res. **86**: 2-11 (2001)

192. Masuda Y.: *Fate of PCDF/PCB congeners and change of clinical symptoms in patients with Yusho PCB poisoning for 30 years*. Chemosphere. **43**: 925-930 (2001)
193. Toborek M.: *Ekspozycja na PCB a zagrożenie chorobami nowotworowymi i naczyniowymi, w Najnowsze osiągnięcia w ocenie zagrożenia toksykologicznego środowiska i zagrożenia zdrowia przez polichlorowane bifenyly*. pod redakcją: Sułkowski W., Lulek J., Sułkowska A.: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne TEZA. str. 71-82, Kraków 2007
194. Everett C.J., Frithsen I., Player M.: *Relationship of polychlorinated biphenyls with type 2 diabetes and hypertension*. J Environ Monit. **13**: 241-251 (2011)
195. Hagmar L.: *Polychlorinated biphenyls and thyroid status in humans: a review*. Thyroid. **13**: 1021-1028 (2003)
196. Pliskova M., Vondracek J., Canton R.F., Nera J., Kocan A., Petrik J., Trnovec T., Sanderson T., van den Berg M., Machala M.: *Impact of polychlorinated biphenyls contamination on estrogenic activity in human male serum*. Environ Health Perspect. **113**: 1277-1284 (2005)
197. DeCastro B.R., Korrick S.A., Spengler J.D., Soto A.M.: *Estrogenic activity of polychlorinated biphenyls present in human tissue and the environment*. Environ Sci Technol. **40**: 2819-2825 (2006)
198. Martin L., Klaassen C.D.: *Differential effects of polychlorinated biphenyl congeners on serum thyroid hormone levels in rats*. Toxicol Sci. **117**: 36-44 (2010)
199. Bandiera S.: *Cytochrome P450 enzymes as biomarkers of PCB exposure and modulators of toxicity, w PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects*. Ed.: Robertson L.W., Hansen L.G.: University Press of Kentucky. str. 185-192, Lexington, USA 2001
200. Ericksson P., Fredriksson A.: *Developmental neurotoxicity of four ortho-substituted polychlorinated biphenyls in the neonatal mouse*. Environ Toxicol Chem. **15**: 155-165 (1996)
201. Rayne S., Forest K.: *Quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies for predicting activation of the ryanodine receptor type 1 channel complex (RyR1) by polychlorinated biphenyl (PCB) congeners*. J Environ Sci Health, Part A. **45**: 355-362 (2010)
202. Londono M., Shimokawa N., Miyazaki W., Iwasaki T., Koibuchi N.: *Hydroxylated PCB induces Ca²⁺ oscillations and alterations of membrane potential in cultured cortical cells*. J Appl Toxicol. **30**: 334-342 (2010)
203. Wilhelm M., Wittsiepe J., Lemm F., Ranft U., Kramer U., Furst P., Roseler S.C., Greshake M., Imohl M., Eberwein G., Rauchfuss K., Kraft M., Winneke G.: *The Duisburg birth cohort study: influence of the prenatal exposure to PCDD/Fs and dioxin-like PCBs on thyroid hormone status in newborns and neurodevelopment of infants until the age of 24 months*. Mutat Res. **659**: 83-92 (2008)
204. Layton A.C., Sanseverino J., Gregory B.W., Easter J.P., Sayler G.S., Schultz T.W.: *In vitro estrogen receptor binding of PCBs: measured activity and detection of hydroxylated metabolites in a recombinant yeast assay*. Toxicol Appl Pharmacol. **180**: 157-163 (2002)
205. Ptak A., Ludewig G., Rak A., Nadolna W., Bochenek M., Gregoraszczyk E.L.: *Induction of cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast cancer cells by 4-chlorobiphenyl (PCB3) and the effects of its hydroxylated metabolites on cellular apoptosis*. Environ Int. **36**: 935-941 (2010)
206. Glynn A., Larsdotter M., Aune M., Darnerud P.O., Bjerselius R., Bergman A.: *Changes in serum concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs), hydroxylated PCB metabolites and pentachlorophenol during pregnancy*. Chemosphere. **83**: 144-151 (2011)
207. Park H.Y., Park J.S., Sovcikova E., Kocan A., Linderholm L., Bergman A., Trnovec T., Hertz-Picciotto I.: *Exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the prenatal period and subsequent neurodevelopment in eastern Slovakia*. Environ Health Perspect. **117**: 1600-1606 (2009)
208. Park J.S., Bergman A., Linderholm L., Athanasiadou M., Kocan A., Petrik J., Drobna B., Trnovec T., Charles M.J., Hertz-Picciotto I.: *Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia*. Chemosphere. **70**: 1676-1684 (2008)

209. Park J.S., Linderholm L., Charles M.J., Athanasiadou M., Petrik J., Kocan A., Drobna B., Trnovec T., Bergman A., Hertz-Picciotto I.: *Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBS) in pregnant women from eastern Slovakia*. Environ Health Perspect. **115**: 20-27 (2007)
210. Herman D.P., Effler J.I., Boyd D.T., Krahn M.M.: *An efficient clean-up method for the GC-MS determination of methylsulfonyl-PCBs/DDEs extracted from various marine mammal tissues*. Mar Environ Res. **52**: 127-150 (2001)
211. Noren K., Lunden A., Pettersson E., Bergman A.: *Methylsulfonyl Metabolites of PCBs and DDE in Human Milk in Sweden, 1972-1992* Environ Health Persp. **104**: 766-772 (1996)
212. Kato Y., Haraguchi K., Tomiyasu K., Hiroyuki S., Isogai M., Masuda Y., Kimura R.: *Structure-dependent induction of CYP2B1/2 by 3-methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats*. Environ Toxicol Pharmacol. **3**: 137-144 (1997)
213. Kato Y., Haraguchi K., Shibahara T., Yumoto S., Masuda Y., Kimura R.: *Reduction of serum thyroxine concentrations by methylsulfonyl metabolites of tetra-, penta and hexachlorinated biphenyls in male Sprague-Dawley rats*. Chemosphere. **40**: 1233-1240 (2000)
214. Troisi G.M., Haraguchi K., Simmonds M.P., Mason C.F.: *Methyl sulphone metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs) in cetaceans from the Irish and the Aegean Seas*. Arch Environ Contam Toxicol. **35**: 121-128 (1998)
215. Denomme M.A., Bandiera S., Lambert I., Copp L., Safe L., Safe S.: *Polychlorinated biphenyls as phenobarbitone-type inducers of microsomal enzymes: structure-activity relationship for a series of 2,4-dichloro-substituted congeners*. Biochem Pharmacol. **32**: 2955-2964 (1983)
216. Schuetz E.G., Brimer C., Schuetz J.D.: *Environmental xenobiotics and the antihormones cyproterone acetate and spironolactone use the nuclear hormone pregnenolone X receptor to activate the CYP3A23 hormone response element*. Mol Pharmacol. **54**: 1113-1117 (1998)
217. Pessah I.N., Wong P.W.: *Etiology of PCBs neurotoxicity: from molecules to cellular dysfunction, w PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects*. Eds: Robertson L.W., Hansen L.G.: The University Press of Kentucky. str. 179-184, Lexington, USA 2001
218. Parkinson A., Safe S.H., Robertson L.W., Thomas P.E., Ryan D.E., Reik L.M., Levin W.: *Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats. A study of structure-activity relationships*. J Biol Chem. **258**: 5967-5976 (1983)
219. Rodman L.E., Shedlofsky S.I., Mannschreck A., Puttmann M., Swim A.T., Robertson L.W.: *Differential potency of atropisomers of polychlorinated biphenyls on cytochrome P450 induction and uroporphyrin accumulation in the chick embryo hepatocyte culture*. Biochem Pharmacol. **41**: 915-922 (1991)
220. Püttmann M., Arand M., Oesch F., Mannschreck A., Robertson L.W.: *Chirality and the induction of xenobiotic-metabolizing enzymes: effects of the atropisomers of the polychlorinated biphenyl 2,2',3,4,4',6-hexachlorobiphenyl, w Chirality and biological activity*. Eds: Frank H., Holmstedt B., Testa B.: Alan R. Liss, Inc. str. 177-184, New York, USA 1990
221. Kania-Korwel I., Hrycay E.G., Bandiera S.M., Lehmler H.J.: *2,2',3,3',6,6'-Hexachlorobiphenyl (PCB 136) atropisomers interact enantioselectively with hepatic microsomal cytochrome P450 enzymes*. Chem Res Toxicol. **21**: 1295-1303 (2008)
222. Kimbrough R.D., Krouskas C.A.: *Human exposure to polychlorinated biphenyls and health effects: a critical synopsis*. Toxicol Rev. **22**: 217-233 (2003)
223. Faroon O.M., Keith S., Jones D., De Rosa C.: *Carcinogenic effects of polychlorinated biphenyls*. Toxicol Ind Health. **17**: 41-62 (2001)
224. Bosetti C., Negri E., Fattore E., La Vecchia C.: *Occupational exposure to polychlorinated biphenyls and cancer risk*. Eur J Cancer Prev. **12**: 251-255 (2003)
225. Negri E., Bosetti C., Fattore E., La Vecchia C.: *Environmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and breast cancer: a systematic review of the epidemiological evidence*. Eur J Cancer Prev. **12**: 509-516 (2003)

226. Franchini M., Rial M., Buiatti E., Bianchi F.: *Health effects of exposure to waste incinerator emissions: a review of epidemiological studies*. Ann Ist Super Sanita. **40**: 101-115 (2004)
227. PCB Workshop: *The sixth International PCB Workshop*. <http://www.pcbworkshop.org/index.php?box=sixth>, data wejścia: 18.12.2011 r.
228. Liu Y., Smart J.T., Song Y., Lehmler H.-J., Robertson L.W., Duffel M.W.: *Structure-activity relationships for hydroxylated polychlorinated biphenyls as substrates and inhibitors of rat sulfotransferases and modification of these relationships by changes in thiol status*. Drug Metab Dispos. **37**: 1065-1072 (2009)
229. Nomiyama K., Yonehara T., Yonemura S., Yamamoto M., Koriyama C., Akiba S., Shinohara R., Koga M.: *Determination and characterization of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in serum and adipose tissue of Japanese women diagnosed with breast cancer*. Environ Sci Technol. **44**: 2890-2896 (2010)
230. Amano I., Miyazaki W., Iwasaki T., Shimokawa N., Koibuchi N.: *The effect of hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB) on thyroid hormone receptor (TR)-mediated transcription through native-thyroid hormone response element (TRE)*. Industrial Health. **48**: 115-118 (2010)
231. Dirtu A.C., Covaci A.: *Estimation of daily intake of organohalogenated contaminants from food consumption and indoor dust ingestion in Romania*. Environ Sci Technol. **44**: 6297-6304 (2010)
232. Colles A., Koppen G., Hanot V., Nelen V., Dewolf M.C., Noel E., Malisch R., Kotz A., Kypke K., Biot P., Vinkx C., Schoeters G.: *Fourth WHO-coordinated survey of human milk for persistent organic pollutants (POPs): Belgian results*. Chemosphere. **73**: 907-914 (2008)
233. Pandelova M., Piccinelli R., Lopez W.L., Henkelmann B., Molina-Molina J.M., Arrebola J.P., Olea N., Leclercq C., Schramm K.W.: *Assessment of PCDD/F, PCB, OCP and BPA dietary exposure of non-breast-fed European infants*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. **28**: 1110-1122 (2011)
234. Domingo J.L., Bocio A.: *Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: a literature review*. Environ Int. **33**: 397-405 (2007)
235. Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson R.E.: *The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds*. Toxicol Sci. **93**: 223-241 (2006)
236. WHO: *2005 Re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors (TEFs)*. http://www.who.int/foodsafety/chem/tef_update/en/index.html, data wejścia: 13.12.2011 r.
237. Wittsiepe J., Furst P., Wilhelm M.: *The 2005 World Health Organization re-evaluation of TEFs for dioxins and dioxin-like compounds - what are the consequences for German human background levels?* Int J Hyg Environ Health. **210**: 335-339 (2007)
238. Simon T., Britt J.K., James R.C.: *Development of a neurotoxic equivalence scheme of relative potency for assessing the risk of PCB mixtures*. Regul Toxicol Pharmacol. **48**: 148-170 (2007)
239. Schettgen T., Gube M., Alt A., Fromme H., Kraus T.: *Pilot study on the exposure of the German general population to non-dioxin-like and dioxin-like PCBs*. Int J Hyg Environ Health. **214**: 319-325 (2011)
240. Kallenborn R.: *Persistent organic pollutants (POPs) as environmental risk factors in remote high-altitude ecosystems*. Ecotoxicol Environ Saf. **63**: 100-107 (2006)
241. Hovander L., Athanasiadu M., Asplund L., Jensen S., Klasson-Wehler E.: *Extraction and cleanup methods for analysis of phenolic and neutral organohalogenes in plasma*. J Anal Toxicol. **24**: 696-703 (2000)
242. Carabias-Martinez R., Rodriguez-Gonzalo E., Revilla-Ruiz P., Hernandez-Mendez J.: *Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples*. J Chromatogr A. **1089**: 1-17 (2005)
243. Jensen S., Haggberg L., Jorundsdottir H., Odham G.: *A quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents*. J Agric Food Chem. **51**: 5607-5611 (2003)

244. Bjorklund E., Bowadt S., Nilsson T., Mathiasson L.: *Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples*. J Chromatogr A. **836**: 285-293 (1999)
245. Bandh C., Bjorklund E., Mathiasson L., Naf C., Zebuhr Y.: *Comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet extraction for the determination of PCBs in Baltic sea sediments*. Environ Sci Technol. **34**: 4995-5000 (2000)
246. Bjorklund E., Muller A., van Holst C.: *Comparison of fat retainers in accelerated solvent extraction for the selective extraction of PCBs from fat-containing samples*. Anal Chem. **73**: 4050-4053 (2001)
247. Muller A., Bjorklund E., van Holst C.: *On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A. **925**: 197-205 (2001)
248. Gomez-Ariza J.L., Bujalance M., Giraldez I., Velasco A., Morales E.: *Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification*. J Chromatogr A. **946**: 209-219 (2002)
249. Saito K., Sjodin A., Sandau C.D., Davis M.D., Nakazawa H., Matsuki Y., Patterson Jr. D.G.: *Development of accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis*. Chemosphere. **57**: 373-381 (2004)
250. Sporning S., Bjorklund E.: *Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls from fat-containing food and feed samples. Influence of cell dimensions, solvent type, temperature and flush volume*. J Chromatogr A. **1040**: 155-161 (2004)
251. Suchan P., Pulkrabova J., Hajslova J., Kocourek V.: *Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples*. Anal Chim Acta. **520**: 193-200 (2004)
252. Sporning S., Bowadt S., Svensmark B., Bjorklund E.: *Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil*. J Chromatogr A. **1090**: 1-9 (2005)
253. von Holst C., Muller A., Serrano F., Sporning S., Bjorklund E.: *Optimization of pressurized liquid extraction for the determination of seven selected polychlorinated biphenyls in feed samples*. Chromatographia. **61**: 391-396 (2005)
254. Sporning S., van Holst C., Bjorklund E.: *Selective pressurized liquid extraction of PCB's from food and feed samples: effects of high lipid amounts and lipid type on fat retention*. Chromatographia. **64**: 533-557 (2006)
255. Garcia I., Ignacio M., Mouteira A., Cobas J., Carro N.: *Assisted solvent extraction and ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls in mussels. Comparison with other extraction techniques*. Anal Bioanal Chem. **390**: 729-737 (2008)
256. Covaci A., Jorens P., Jacquemyn Y., Schepens P.: *Distribution of PCBs and organochlorine pesticides in umbilical cord and maternal serum*. Sci Total Environ. **298**: 45-53 (2002)
257. Norstrom K., Eriksson J., Haglund J., Silvari V., Bergman A.: *Enantioselective formation of methyl sulfone metabolites of 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl in rat*. Environ Sci Technol. **40**: 7649-7655 (2006)
258. Jakubowska N., Zygmunt B., Polkowska Z., Zabiegala B., Namiesnik J.: *Sample preparation for gas chromatographic determination of halogenated volatile organic compounds in environmental and biological samples*. J Chromatogr A. **1216**: 422-441 (2009)
259. Hühnerfuss H., Shah M.R.: *Enantioselective chromatography-a powerful tool for the discrimination of biotic and abiotic transformation processes of chiral environmental pollutants*. J Chromatogr A. **1216**: 481-502 (2009)
260. Letcher R.J., Norstrom R.J., Bergman A.: *An integrated analytical method for determination of polychlorinated aryl methyl sulfone metabolites and polychlorinated hydrocarbon contaminants in biological matrixes*. Anal Chem. **67**: 4155-4163 (1995)

261. Stapleton H.M., Letcher R.J., Baker J.E.: *Metabolism of PCBs by the Deepwater Sculpin (Myoxocephalus thompsoni)*. Environ Sci Technol. **35**: 4747-4752 (2001)
262. Berger U., Herzke D., Sandanger T.M.: *Two trace analytical methods for determination of hydroxylated PCBs and other halogenated phenolic compounds in eggs from Norwegian birds of prey*. Anal Chem. **76**: 441-452 (2004)
263. Chu S., Covaci A., Haraguchi K., Schepens P.: *Optimized separation and determination of methyl sulfone metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs) and p,p'-DDE in biota samples*. Analyst. **127**: 1621-1626 (2002)
264. Sandanger T.M., Dumas P., Berger U., Burkow I.C.: *Analysis of HO-PCBs and PCP in blood plasma from individuals with high PCB exposure living on the Chukotka Peninsula in the Russian Arctic*. J Environ Monit. **6**: 758-765 (2004)
265. Saito K., Sjodin A., Sandau C.D., Davis M.D., Nakazawa H., Matsuki Y., Patterson D.G., Jr.: *Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis*. Chemosphere. **57**: 373-381 (2004)
266. Triska J., Kuncova G., Mackova M., Novakova H., Paasivirta J., Lahtipera M., Vrchotova N.: *Isolation and identification of intermediates from biodegradation of low chlorinated biphenyls (Delor-103)*. Chemosphere. **54**: 725-733 (2004)
267. Bjorklund E., Sporning S., Wiberg K., Haglund P., van Holst C.: *New strategies for extraction and clean-up of persistent organic pollutants from food and feed samples using selective pressurized liquid extraction*. Trends Anal Chem. **25**: 318-325 (2006)
268. Chu S., Covaci A., Jacobs W., Haraguchi K., Schepens P.: *Distribution of methyl sulfone metabolites of polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE in human tissues*. Environ Health Perspect. **111**: 1222-1227 (2003)
269. Haraguchi K., Kuroki H., Masuda Y.: *Analytical method for minute amounts of polychlorinated biphenyl methylsulfones from fatty tissue*. J Anal Toxicol. **8**: 177-181 (1984)
270. Hoekstra P.F., Letcher R.J., O'Hara T.M., Backus S.M., Solomon K.R., Muir D.C.G.: *Hydroxylated and methylsulfone-containing metabolites of polychlorinated biphenyls in the plasma and blubber of bowhead whales (Balaena mysticetus)*. Environ Toxicol Chem. **22**: 2650-2658 (2003)
271. Fidalgo-Used N., Blanco-González E., Sanz-Medel A.: *Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples*. Anal Chim Acta. **590**: 1-16 (2007)
272. Karlson K., Ishaq R., Becker G., Berggren P., Broman D., Colmsjö A.: *PCBs, DDTs and methyl sulphone metabolites in various tissues of harbour porpoises from Swedish waters*. Environ Poll. **110**: 29-46 (2000)
273. Guvenius D.M., Hassanzadeh P., Bergman A., Noren K.: *Metabolites of polychlorinated biphenyls in human liver and adipose tissue*. Environ Toxicol Chem. **21**: 2264-2269 (2002)
274. Kallenborn R., Hühnerfuss H.: *Chiral environmental pollutants: trace analysis and ecotoxicology* Springer. 209 str., Berlin, Germany ; New York, USA 2001
275. Ali I., Aboul-Enein H.Y.: *Chiral pollutants: distribution, toxicity, and analysis by chromatography and capillary electrophoresis* J. Wiley. 344 str., Chichester, West Sussex, United Kingdom ; Hoboken, New Jersey, USA 2004
276. Frame G.M.: *The current state-of-the-art of comprehensive, quantitative, congener specific PCB analysis, and what we now know about the distribution of individual congeners in commercial Aroclor mixtures, w PCBs: Recent advances in environmental toxicology and health effects*. Eds: Robertson L.W., Hansen L.G.: The University Press of Kentucky. str. 3-9, Lexington, USA 2001
277. Rogers E., Petreas M., Park J.S., Zhao G., Charles M.J.: *Evaluation of four capillary columns for the analysis of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in human serum for epidemiologic studies*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **813**: 269-285 (2004)

278. Wong C.S., Garrison A.W.: *Enantiomer separation of polychlorinated biphenyl atropisomers and polychlorinated biphenyl retention behavior on modified cyclodextrin capillary gas chromatography columns*. J Chromatogr A. **866**: 213-220 (2000)
279. Cochran J.W., Frame G.M.: *Recent developments in the high-resolution gas chromatography of polychlorinated biphenyls*. J Chromatogr A. **843**: 323-368 (1999)
280. Frame G.M.: *A collaborative study of 209 PCB congeners and 6 Aroclors on 20 different HRGC columns. 2. Semi-quantitative Aroclor congener distributions*. Fresenius J Anal Chem. **357**: 714-722 (1997)
281. Frame G.M., Cochran J.W., Bowadt S.S.: *Complete PCB congener distribution for 17 Aroclor mixtures determined by 3 HRGC systems optimized for comprehensive, quantitative, congener-specific analysis*. J High Resolut Chromatogr. **19**: 657-668 (1996)
282. Frame G.M.: *Improved procedure for single DB-XLB column GC-MS-SIM quantitation of PCB congener distributions and characterization of two different preparations sold as Aroclor 1254*. J High Resolut Chromatogr. **22**: 533-540 (1999)
283. Vetter W., Shurig V.: *Enantioselective determination of chiral organochlorine compounds in biota by gas chromatography on modified cyclodextrins. Review*. J Chromatogr A. **774**: 143-175 (1997)
284. van Hoof P., Hsieh J.-L.: *Analysis of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides by gas chromatography with electron capture detection - Standard Operating Procedure, w Lake Michigan Mass Balance Methods Compendium*. www.epa.gov/glnpo/lmmb/methods/index.html 1996
285. Brereton R.G.: *Applied chemometrics for scientists* John Wiley & Sons. 379 str., Chichester, England ; Hoboken, New Jersey, USA 2007
286. Varmuza K., Filzmoser P.: *Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics* CRC Press. 321 str., Boca Raton, USA 2009
287. Miller J.N., Miller J.C.: *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* Pearson Prentice Hall. 268 str., Harlow, United Kingdom; New York, USA 2005
288. Hanrahan G.: *Environmental chemometrics: principles and modern applications*. Analytical Chemistry CRC Press. 292 str., Boca Raton, USA 2009
289. Johnson R.A., Wichern D.W.: *Applied mutivariate statistical analysis* Prentice Hall. 767 str., Upper Saddle River, New York, USA 2002
290. Magar V.S., Johnson G.W., Brenner R.C., Quensen J.F., Foote E.A., Durell G., Ickes J.A., Peven-McCarthy C.: *Long-term recovery of PCB-contaminated sediments at the Lake Hartwell superfund site: PCB dechlorination, 1 end-member characterization*. Environ Sci Technol. **39**: 3538-3547 (2005)
291. Magar V.S., Brenner R.C., Johnson G.W., Quensen J.F.: *Long-term recovery of PCB-contaminated sediments at the Lake Hartwell superfund site: PCB dechlorination, 2 rates and extent*. Environ Sci Technol. **39**: 3548-3554 (2005)
292. Hope J.L., Sinha A.E., Prazen B.J., Synovec R.E.: *Evaluation of the DotMap algorithm for locating analytes of interest based on mass spectral similarity in data collected using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry*. J Chromatogr A. **1086**: 185-192 (2005)
293. Massart D.L., Kaufman L.: *The interpretation of analytical chemical data by the use of cluster analysis* John Wiley & Sons. 250 str., New York, USA 1983
294. Hamers T., Kamstra J.H., Cenijn P.H., Pencikova K., Palkova L., Simeckova P., Vondracek J., Andersson P.L., Stenberg M., Machala M.: *In vitro toxicity profiling of ultrapure non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners and their relative toxic contribution to PCB mixtures in humans*. Toxicol Sci. **121**: 88-100 (2011)
295. Shaikh N., Parkin S., Lehmler H.-J.: *The Ullmann coupling reaction: a new approach to tetraarylstannanes*. Organometallics. **25**: 4207-4214 (2006)
296. Bunaciu P.R., Tharappel J.C., Lehmler H.J., Kania-Korwel I., Robertson L.W., Srinivasan C., Spear B.T., Glauert H.P.: *The effect of dietary glycine on the hepatic tumor promoting activity of polychlorinated biphenyls (PCBs) in rats*. Toxicology. **239**: 147-155 (2007)

297. Konieczka P., Namiesnik J.: *Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory: a practical approach*. Analytical chemistry series CRC Press. 233 str., Boca Raton, USA 2009
298. Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E.: *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance*. TrAC, Trends Anal Chem. **23**: 535-552 (2004)
299. Dang V.D., Walters D.M., Lee C.M.: *Transformation of chiral polychlorinated biphenyls (PCBs) in a stream food web*. Environ Sci Technol. **44**: 2836-2841 (2010)
300. Bordajandi L.R., Ramos L., Gonzalez M.J.: *Chiral comprehensive two-dimensional gas chromatography with electron-capture detection applied to the analysis of chiral polychlorinated biphenyls in food samples*. J Chromatogr A. **1078**: 128-135 (2005)
301. Kostyniak P.J., Hansen L.G., Widholm J.J., Fitzpatrick R.D., Olson J.R., Helferich J.L., Kim K.H., Sable H.J., Seegal R.F., Pessah I.N., Schantz S.L.: *Formulation and characterization of an experimental PCB mixture designed to mimic human exposure from contaminated fish*. Toxicol Sci. **88**: 400-411 (2005)
302. Brown R.P., Delp M.D., Lindstedt S.L., Rhomberg L.R., Beliles R.P.: *Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models*. Toxicol Ind Health. **13**: 407-484 (1997)
303. Schuetz E.G., Umbenhauer D.R., Yasuda K., Brimer C., Nguen L., Relling M.V., Schuetz J.D., Schinkel A.H.: *Altered expression of hepatic cytochrome P-450 in mice deficient in one or more mdr1 genes*. Mol Pharmacol. **57**: 188-197 (2000)
304. Mankowski D.C., Lawton M.P., Ekins S.: *Characterization of transgenic mouse strains using six human hepatic cytochrome P450 probe substrates*. Xenobiotica. **30**: 745 - 754 (2000)
305. Doran A., Obach R.S., Smith B.J., Hosea N.A., Becker S., Callegari E., Chen C., Chen X., Choo E., Cianfrogna J., Cox L.M., Gibbs J.P., Gibbs M.A., Hatch H., Hop C.E., Kasman I.N., Laperle J., Liu J., Liu X., Logman M., Maclin D., Nedza F.M., Nelson F., Olson E., Rahematpura S., Raunig D., Rogers S., Schmidt K., Spracklin D.K., Szewc M., Troutman M., Tseng E., Tu M., Van Deusen J.W., Venkatakrishnan K., Walens G., Wang E.Q., Wong D., Yasgar A.S., Zhang C.: *The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the mdr1a/1b knockout mouse model*. Drug Metab Dispos. **33**: 165-174 (2005)
306. Cisternino S., Mercier C., Bourasset F., Roux F., Scherrmann J.M.: *Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier*. Cancer Research. **64**: 3296-3301 (2004)
307. Drouillard K.G.N., R. J.: *The influence of diet properties and feeding rates on PCB toxicokinetics in the ring dove*. Arch Environ Contam Toxicol. **44**: 97-106 (2003)
308. Hansen L.G., Welborn M.E., Borchard R.E., Teske R.H., Metcalf R.L.: *Tissue distribution of PCB components in swine and sheep fed three different rations containing Aroclors 1242 and 1254*. Arch Environ Contam Toxicol. **5**: 257-278 (1977)
309. Kaminski L.S., Kennedy M.W., Adams S.M., Guengerich F.P.: *Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P-450*. Biochemistry. **20**: 7379-7384 (1981)
310. Brown J.F.: *Determination of PCB metabolic, excretion, and accumulation rates for use as indicators of biological response and relative risk*. Environ Sci Technol. **28**: 2295-2305 (1994)
311. Kannan N., Reusch T.B.H., Schulz-Bull D.E., Patrick G., Duinker J.C.: *Chlorobiphenyls: model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept*. Environ Sci Technol. **29**: 1851-1859 (1995)
312. Birnbaum L.S.: *Distribution and excretion of 2,3,6,2',3',6'- and 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl in senescent rats*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **3**: 262-272 (1983)
313. Sipes I., Slocumb M., Perry D., Carter D.: *2,4,5,2',4',5'-Hexachlorobiphenyl: distribution, metabolism, and excretion in the dog and the monkey*. Toxicol Appl Pharmacol. **65**: 264-272 (1982)
314. Lu Z., Wong C.S.: *Factors affecting phase I stereoselective biotransformation of chiral polychlorinated biphenyls by rat cytochrome P-450 2B1 isozyme*. Environ Sci Technol. **45**: 8298-8305 (2011)

X. ANEKS

SOP_BM1_v2.0

Document Title: EXTRACTION, SEPARATION AND CLEAN-UP OF PCB AND ITS METABOLITES FROM TISSUE AND FECES SAMPLES BY MODIFIED "JENSEN METHOD"

Author: Milanowski, Bartlomiej

Owning Department: Department of Occupational and Environmental Health, University of Iowa, Iowa City, IA, US

Description: This SOP describes the correct procedure for the routine extraction, separation and clean-up of PCB and its metabolites from tissue and feces samples by modified "Jensen method" within Department of Occupational and Environmental Health laboratory, Iowa City, IA, US

Effective: 28 Jan 2008

Document Approval:

Signed By: Milanowski, Bartlomiej

Decision: Approved

Decision Date: 28 Jan 2008

Role: Author

Purpose: Revision

Meaning Of Signature: This document is suitable for issue.

Signed By: Kania-Korwel, Izabela

Decision: Approved

Decision Date: 28 Jan 2008

Role: Authoriser

Purpose: Revision

Meaning Of Signature: This document is suitable for issue.

1 Chemicals list:

- Potassium hydroxide pellets (Certified ACS, Fisher Scientific, cat no P-250-1)
- Ethanol absolute (Fisher Scientific, cat no AC615090020)
- Hydrochloric acid concentrated (12.5M)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO anhydrous, Spectrophotometric Grade 99.9%, Fisher Scientific, cat no AC167851000)
- Dichloromethane, (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no D142-4)
- Hexane (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no H300-4)
- Ethyl ether (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no E199-4)
- Methyl tert-butyl ether (HPLC, Fisher Scientific, cat no E127-4)
- Methanol (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no A450-4)
- Silica gel (70-230 mesh, Fisher Scientific, cat no S826-1)
- 2-propanol (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no A519-4)
- Tetrabutylammonium hydrogen sulfate (J.T. Baker, cat no V3560-7)
- Sodium sulfite (Fisher Scientific, cat no S430-500)
- Sulfuric acid (Certified ACS Plus, Fisher Scientific, cat no A300-212)
- Iso-Octane (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no O297-4)
- Acetone (pesticide grade, Fisher Scientific, cat no A40-4)
- Sodium chloride
- Phosphoric acid, concentrated 85%, (HPLC grade, Fisher Scientific, cat no A250-500)
- Drierite[®], with indicator, 10-20 mesh (Fisher Scientific, cat no 350010020)

2 Accessories:

- Glass tubes medium, size 16x125 mm (Biochem Stores, cat no 188950)
- Glass tubes small, size 16x100 mm (Fisher Scientific, cat no 14-959-35AA)
- Screw caps, thread 14-415 mm (Fisher Scientific, cat no 14-930-15E)
- Pasteur pipettes (Fisher Scientific, cat no 22-183632)
- Vials with caps (Fisher Scientific, cat no 03-339-25B)
- GC vials (Fisher Scientific, cat no 03-391-6)
- GC caps (Fisher Scientific, cat no 22-021861)
- GC vials inserts (Fisher Scientific, cat no 14-823-374)
- Shell vials (Fisher Scientific, cat no 03-339-30B)
- Yellow rubber caps (Fisher Scientific, cat no 02-707-15)
- 6ml Glass Reaction Tube[®] with 1 Teflon[®] frit (Supelco, cat no 504394)
- Polypropylen needle valves, (Waters, cat no WAT 200685)
- Glass Fiber Filters 13mm, Type A/E, (Pall Life Sciences, cat no 61628)
- Pipet-Lite[®] 2 to 20 μ l standard (Rainin, cat no SL-20)
- Pipet-Lite[®] 20 to 200 μ l standard (Rainin, cat no SL-200)
- Pipet-Lite[®] 100 to 1000 μ l standard (Rainin, cat no SL-1000)
- AutoRep Manual Pepeating Pipet 10 μ l-5ml (Rainin, cat no AR-M2)
- Encode Syringe 5ml (Rainin, cat no ENC-5ML)
- Encode Syringe 50ml (Rainin, cat no ENC-50ML)
- Kimberley-Clark Purple Nitrile Exam Gloves (Fisher Scientific, cat no S78945)

3 Instruments:

- IKA[®] Ultra-Turrax T25 Homogenizer System (Fisher Scientific, cat no 14-260-36)

- Desiccator
- Rotator for tubes - Fisher Scientific Roto-Rack® SN 1099
- S/P® Vortex Mixer (American Scientific Product, cat no S8223-1)
- Eppendorf centrifuge 5810 R
- The Meyer N-ENVAP Analytical Evaporator (Organomation, SN 2108)
- MILLI-Q® ACADEMIC A10 (Millipore, SN F4HN34348D)
- Furnace 30400 Bransted/Thermolyne
- Waters extraction manifold, 20-position (Waters, cat no WAT200606) with Vacuum Pump (Waters, car no WAT085114)

4 Preparation of additional reagents:

4.1 Activation of silica gel

Combust silica gel at 450°C overnight.

4.2 Silica gel / 90% aq. sulfuric acid (2:1, w/w)

Prepare this adsorbent for clean-up at least one week before MeSO₂-PCBs clean-up!!!

For 75g, weight 50 g of silica gel into Erlenmeyer's flask. Prepare 25g 90% aq. sulfuric acid in baker: take 1.54g of ultra-pure water and add 23.46 of concentrated sulfuric acid and mix well. Add prepared 25g of solution into Erlenmeyer's flask. Invert flask at least for 2 hours.

4.3 Silica gel / conc. sulfuric acid (2:1, w/w)

Prepare this adsorbent for clean-up at least one week before MeSO₂-PCBs clean-up!!!

For 75g, weight 50 g of silica gel into Erlenmeyer's flask. Add 25g concentrated sulfuric into Erlenmeyer's flask. Invert flask at least for 2 hours.

4.4 Potassium hydroxide 0.5 M solution in 50% ethanol

For 100 ml, weight out 2.8 g solid potassium hydroxide and dissolve in equal amounts by volume of ultra-pure water and ethanol.

4.5 Hydrochloric acid 2 M

For 100 ml, take 17 ml of concentrated hydrochloric acid and fill up the volumetric flask with ultra-pure water.

4.6 0.1 M phosphoric acid in 0.9% NaCl

Weight out 0.9 g of sodium chloride, put in 100 ml flask, add about 50 ml of pure water, weight out 0.98 g of phosphoric acid. Fill the flask with water to 100 ml mark.

4.7 TBA solution

To make TBA solution, take 3.39 g of tetrabutylammonium hydrogen sulfate and dissolve in 100 ml of ultra-pure water. Add to jar containing 25 g of sodium sulfite. Shake well.

5 Accessories and glassware cleaning:

5.1 Prepare SPE accessories:

5.1.1 Rinse all valves before and after each extraction 4 times with solvents in order: 1 acetone, 2 dichloromethane, 3 acetone, 4 hexane

5.1.2 Hold Glass Reaction Tubes® at a temperature of 450°C overnight.

6 Label 8 smaller, 6 medium screw-cap tubes for each sample:

Remember that for centrifugation, the number of samples needs to be even. If it is not, prepare additional blank. Cap the vials.

Prepare 3xE (first one small), 1xNE (medium), 4xO (last one medium size), 4xP (last one medium size), 2xM vials (first one small), set aside of each O,P,M.

Prepare also one storage vial for each sample (label ST) and one shell vial for lipids determination (label LP).

7 Denaturation and extraction:

7.1 Weight small tube labeled E1.

Place sample in the tube. Weight again. Note the sample mass.

PAUSE POINT – store sample in the fridge.

7.2 Spike the sample with surrogate standards (PCB 14, PCB 65 and PCB 166, about 1 µg/ml, 100 µl; 3-MeSO₂-PCB 87; 0.4 µg/ml, 250 µl; 3-OH-PCB 159; 1.37 µg/ml, 100 µl).

Standard mixture should be kept at room temperature for about 2 h before spiking!

Don't forget to prepare 3 GC vials with screw cap (reference vials) for each of PCB, MeSO₂ and OH-PCBs and spike them with appropriate standards at the same time. Note on GC vials what and how much you spiked.

7.3 Add 2.5 ml of 2-propanol, followed by 1.0 ml of ethyl ether to the tube.

7.4 Homogenize sample for 1 min at 24000 r/min.

7.5 Rinse homogenizer knife with small amount of 2-propanol-ethyl ether mixture (2.5:1, v/v) into a tube.

7.6 Before each use rinse homogenizer knife well with solvents in order: acetone, water, acetone and hexane.

7.7 Fill vials approximately to the same level with 2-propanol-ethyl ether mixture (2.5:1, v/v) (for centrifugation purposes).

7.8 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

7.9 Add 2.5 ml of 2-propanol, followed by 1.0 ml of ethyl ether to the tube.

7.10 Homogenize sample for 1 min at 24000 r/min.

7.11 Rinse homogenizer knife with small amount of 2-propanol-ethyl ether mixture (2.5:1, v/v) into a tube.

7.12 Before each use rinse homogenizer knife well with solvents in order: acetone, water, acetone and hexane.

7.13 Fill vials approximately to the same level with 2-propanol-ethyl ether mixture (2.5:1, v/v) (for centrifugation purposes).

7.14 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

7.15 Add 5 ml of phosphoric acid in sodium chloride aqueous solution to medium, second tube labeled E2.

7.16 Transfer sample to medium tube labeled E2.

7.17 Re-extract small tube labeled E1 with 1 ml of 2-propanol and 2.5 ml of hexane-ethyl ether (9:1, v/v).

Mix tissue well with spatula. After each use rinse spatula with solvents in order: acetone, dichloromethane, acetone and hexane. Vortex vials.

7.18 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

7.19 Transfer sample to medium tube labeled E2.

Discard content of first tube labeled E1.

7.20 Invert medium tube labeled E2 for 3 min.

7.21 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

7.22 Transfer organic phase to third tube labeled E3.

7.23 Re-extract second, medium tube labeled E2 with 1 ml of hexane-ethyl ether (9:1, v/v).

7.24 Invert medium tube labeled E2 for 3 min.

7.25 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

7.26 Transfer organic phase to third tube labeled E3.

Dispose the content of tube labeled E2.

PAUSE POINT – store sample in the fridge.

7.27 Concentrate extract in third tube labeled E3 under gentle stream of nitrogen to approximately 1 ml.

8 Lipid content determination:

8.1 Pre-weight shell vial with cap (labeled LP).

8.2 Place the extract from the tube into shell vial (do this under the hood).

Rinse the tube twice with about 1ml of hexane and transfer content to shell vial each time.

Do not throw away the tube labeled E3!

8.3 Evaporate the extract to dryness.

8.4 Store shell vials in the desiccator overnight.

PAUSE POINT

8.5 Weight the dried extract in closed shell vial. Note the lipid mass.

9 Reconstitution of sample:

9.1 Re-dissolve sample in shell vial in 1 ml of hexane.

9.2 Vortex the tube.

9.3 Transfer the extract back to the tube labeled E3.

9.4 Repeat points 9.1-9.3 three times.

9.5 Vortex vial labeled E3 quickly.

9.6 Weight out approximately half of the extract into storage vial.

PAUSE POINT – store sample in the fridge.

10 Separation of phenolic compounds:

10.1 Add 2 ml of KOH solution to tube labeled E3.

10.2 Invert tube for 3 min.

10.3 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

10.4 Transfer organic phase to tube labeled NE.

(tube labeled NE contains neutral fraction, will undergo further separation).

10.5 Re-extract alkaline solution in tube labeled E3 with 3 ml hexane.

10.6 Invert tube for 3 minutes.

10.7 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

10.8 Add organic phase to extract in tube labeled NE. Set aside tube labeled NE.

10.9 Acidify alkaline solution in tube labeled E3 with 0.5 ml 2M HCl solution.

Check if the solution is indeed acidic using an indicator stripe.

10.10 Vortex the tube labeled E3 quickly.

10.11 Extract tube labeled E3 with 4 ml of hexane-MTBE mixture 9:1 v/v.

10.12 Invert tube labeled E3 for 3 min.

10.13 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

10.14 Transfer organic phase to tube labeled O1 (OH-PCBs).

10.15 Re-extract tube labeled E3 with 3 ml of hexane-MTBE mixture (9:1 v/v).

- 10.16 Invert tube labeled E3 for 3 min.
10.17 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).
10.18 Add organic phase to tube labeled O1 (OH-PCBs).
Discard the content of the tube labeled E3.
PAUSE POINT – store sample in the fridge.

11 Derrivatization of OH-PCB:

- 11.1 Evaporate the samples in tube labeled O1 under gentle stream of nitrogen to almost dryness.
11.2 Fill samples up to 1 ml with hexane.
11.3 Mark the level in vials.
11.4 Add 5 drops of methanol.
11.5 Mix samples.
Don't forget to derrivatize standard and/or reference vial.
11.6 Add 0.5 ml of diazomethane (about 5 mmol).
11.7 Store in the fridge overnight.
PAUSE POINT
11.8 Evaporate slightly below the marked level to ensure all diazomethane is gone.
Evaporate vial with standard/reference vial to dryness to make sure all methanol is gone.

12 Separation of PCBs from MeSO₂-PCBs:

Further work on tube labeled NE (neutral compounds).

- 12.1 Add 0.5 ml DMSO to tube labeled NE.
12.2 Invert tube for 10 min.
12.3 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).
12.4 Transfer organic phase to tube labeled P1 (PCBs).
12.5 Re-extract DMSO in tube labeled NE with 3 ml hexane.
12.6 Invert tube labeled NE for 5 min.
12.7 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).
12.8 Add organic phase to tube labeled P1.
12.9 Concentrate the sample in tube labeled P1 under gentle stream of nitrogen to about 1 ml.

13 Isolation of MeSO₂-PCB:

- 13.1 Add 1 ml water to DMSO in tube labeled NE.
13.2 Extract DMSO in tube labeled NE with 3 ml hexane.
13.3 Invert tube for 3 min.
13.4 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).
13.5 Transfer organic phase to tube labeled M1 (MeSO₂-PCBs).
Be very careful on separating these phases!!! Take less of organic, but make sure you separated well.
13.6 Re-extract DMSO in tube labeled NE with 1 ml hexane.
13.7 Invert tube for 3 min.

13.8 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (Program 5).

13.9 Add organic phase to tube labeled M1.

Discard the content of the tube labeled NE.

PAUSE POINT – store sample in the fridge.

14 Clean-up of MeSO₂ fraction:

14.1 Evaporate extract in tube labeled M1 under gentle stream of nitrogen to dryness.

14.2 Re-dissolve sample in 0.5 ml of dichloromethane. Vortex the tube.

14.3 In Glass Reaction Tube® prepare column:

14.3.1 Put Glass Fiber Filter at the bottom.

14.3.2 Add 0.2 g of activated silica gel at the bottom.

14.3.3 Add 0.8 g of Silica gel / 90% aq. sulfuric acid (2:1, w/w).

14.3.4 Condition column with 5x2 ml of dichloromethane at 15 Hg vacuum at the rate 4ml/min. Do not allow the extraction column to run dry between and after the conditioning steps (leave 2-3 mm layer of solvent upon an adsorbent).

14.4 Apply extract to the solvent in the column.

14.5 Rinse the tube M1 twice with 0.5 ml of dichloromethane and combine extracts in the column.

14.6 Elute column into M2 tube 10 times with 2 ml of dichloromethane at atmospheric pressure at a rate of 2 ml/min (1 drops per second). Do not allow the extraction column to run dry between eluting steps.

14.7 Evaporate sample in dryness under gentle stream of nitrogen.

14.8 Re-dissolve sample in 0.15 ml of isooctane.

14.9 Add 100 µl of PCB Internal Standard (about 25 ng).

Vortex and invert the tube for 2 min.

Add internal Standard to reference vial as well!

14.10 Place the extract in low volume insert in GC vial.

15 Clean-up of MeO and PCB fractions with concentrated sulfuric acid:

15.1 Add 2 ml of 2-propanol and 2 ml of TBA solution.

15.2 Invert tube for 3 min.

15.3 Add 5 ml of ultra-pure water.

15.4 Invert tube for 3 min.

15.5 Remove the organic (top) layer and place in the tube labeled O2 or P2.

15.6 Rinse the tube O1 or P1 with small amount of hexane (1ml).

15.7 Invert tubes for 3 minutes and transfer top layer into the second tube labeled O2 or P2.

15.8 Repeat steps 15.6-15.7.

15.9 Add 2 ml of concentrated sulfuric acid into the tube labeled O2 or P2

15.10 Invert tube for 5 min.

15.11 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).

15.12 Transfer organic phase to tube labeled O3 or P3

15.13 Re-extract the acidic phase in tube O2 or P2 with 3 ml of hexane.

Discard the content of the tube labeled O2.

16 SPE clean-up of PCB fraction:

- 16.1 Concentrate the sample in tube labeled P3 under gentle stream of nitrogen to 0.5 ml.
 - 16.2 In Glass Reaction Tube® prepare column:
 - 16.2.1 Put Glass Fiber Filter at the bottom.
 - 16.2.2 Add 0.2 g of activated silica gel at the bottom.
 - 16.2.3 Add 1.0 g of Silica gel / conc. sulfuric acid (2:1, w/w).
 - 16.2.4 Condition column with 5x2 ml of hexane at 15 Hg vacuum at the rate 4ml/min. Do not allow the extraction column to run dry between and after the conditioning steps (leave 2-3 mm layer of solvent upon an adsorbent).
 - 16.3 Apply extract to the solvent in the column.
 - 16.4 Rinse the tube P3 twice with 0.5 ml of hexane and combine extracts in the SPE column.
 - 16.5 Elute column into P4 tube 5 times with 2 ml of hexane at atmospheric pressure at a rate of 2 ml/min (1 drops per second). Do not allow the extraction column to run dry between eluting steps.
- PAUSE POINT
- 16.6 Evaporate sample to dryness under gentle stream of nitrogen.
 - 16.7 Re-dissolve in 1 ml of isooctane.
 - 16.8 Add 100 µl of PCB Internal Standard (about 25 ng).
Vortex and invert the tube for 2 min.
Add Internal Standard to reference vial as well!
 - 17.9 Place sample in GC vial.
Consider concentrating all samples and placing them in 0.25 ml inserts.

17 SPE clean-up of MeO fraction:

- 17.1 Evaporate the sample in tube labeled O3 under gentle stream of nitrogen to dryness.
 - 17.2 Re-dissolve sample in 0.5 ml of dichloromethane. Vortex the tube.
 - 17.3 In Glass Reaction Tube® prepare column:
 - 17.3.1 Put Glass Fiber Filter at the bottom.
 - 17.3.2 Add 0.2 g of activated silica gel at the bottom.
 - 17.3.3 Add 1.0 g of Silica gel / conc. sulfuric acid (2:1, w/w).
 - 17.3.4 Condition column with 5x2 ml of dichloromethane at 15 Hg vacuum at the rate 4ml/min. Do not allow the extraction column to run dry between and after the conditioning steps (leave 2-3 mm layer of solvent upon an adsorbent).
 - 17.4 Apply extract to the solvent in the column.
 - 17.5 Rinse the tube O3 twice with 0.5 ml of dichloromethane and combine extracts in the column.
 - 17.6 Elute column into O4 tube 5 times with 2 ml of dichloromethane at atmospheric pressure at a rate of 2 ml/min (1 drops per second). Do not allow the extraction column to run dry between eluting steps.
- PAUSE POINT
- 17.7 Evaporate sample to dryness under gentle stream of nitrogen.
 - 17.8 Re-dissolve in 0.15 ml of isooctane.
 - 17.9 Add 100 µl of PCB Internal Standard (about 25 ng).
Vortex and invert the tube for 2 min.
Add Internal Standard to reference vial as well!
 - 17.10 Place the extract in low volume insert in GC vial.

18 Analysis sheet

SAMPLE INFORMATION					
Procedure name	EXTRACTION, SEPARATION AND CLEAN-UP OF PCB AND ITS METABOLITES FROM TISSUE AND FECES SAMPLES BY MODIFIED "JENSEN METHOD"			Procedure version	SOP_BM1_v2.0 (Version 2, 01/28/2008)
Sample name	Project	MDR PROJECT		Recovery standards:	
	Tissue		PCB	100	ng
	Animal		MeSO ₂	96	ng
Start date		Sig.	OH	137	ng
LIQUID/LIQUID EXTRACTION					
Sample mass [g]	Homogenization []			0.1 M H ₃ PO ₄ in 0.9% NaCl []	
	Conditions:				
2-Propanol []	DEE []	Hex []	MTBE []	1% KCl []	6M HCl []
Mass of empty storage vial	[g]	Mass of empty lipid vial	[g]	Lipid content [%]	
Mass of storage vial with extract	[g]	Mass of lipid vial with lipids	[g]	Mass for store [g]	
Mass of extract	[g]	Mass of lipids	[g]	Mass for analysis [g]	
CLEAN UP					
MeO and PCB fractions	H ₂ SO ₄ []	Silica gel/conc. sulfuric acid 2:1 (w/w) []	Adsorbent mass	[g]	
MeSO ₂ fraction	Silica gel/90% aq. sulfuric acid 2:1 (w/w) []		Adsorbent mass	[g]	
Internal standard	PCB 30	25 [ng]	PCB 204	25 [ng]	
GC ANALYSIS					
Mass of extract	[g]	Respective mass of sample	[g]	[% RS]	
Column	Detector	Program/Method	Analysis date	Recoveries [%]	Concentration [ng/g]
SLB-5MS	μECD	BARTPCB		PCB14	ΣPCB
				PCB66	
				PCB166	
		BARTMeOPCB		4-OH-PCB159	ΣMeo-PCB
		BARTMeSO ₂ PCB		3- MeSO ₂ -4-Me-PCB87	ΣMeSO ₂ PCB
CP-Chirasil-Dex CB	μECD	WONG & GARRISON		PCB14	ΣPCB
				PCB66	
				PCB166	
Date		Signature			

Any additional comments – on the other side of form

SOP_BM2_v2.0

Document Title: EXTRACTION, SEPARATION AND CLEAN-UP OF PCB AND ITS METABOLITES FROM BLOOD/SERUM/PLASMA/URINE SAMPLES

Author: Milanowski, Bartlomiej

Owning Department: Department of Occupational and Environmental Health, University of Iowa, Iowa City, IA, US

Description: This SOP describes the correct procedure for the routine extraction, separation and clean-up of PCB and its metabolites from blood/plasma/serum and urine samples within Department of Occupational and Environmental Health laboratory, Iowa City, IA, US

Effective: 28 Jan 2008

Document Approval:

Signed By: Milanowski, Bartlomiej

Decision: Approved

Decision Date: 28 Jan 2008

Role: Author

Purpose: Revision

Meaning Of Signature: This document is suitable for issue.

Signed By: Kania-Korwel, Izabela

Decision: Approved

Decision Date: 28 Jan 2008

Role: Authoriser

Purpose: Revision

Meaning Of Signature: This document is suitable for issue.

1 Chemicals list:

- Potassium hydroxide pellets (Certified ACS, Fisher Scientific, cat no P-250-1)
- Ethanol absolute (Fisher Scientific, cat no AC615090020)
- Hydrochloric acid concentrated (12.5M)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO anhydrous, Spectrophotometric Grade 99.9%, Fisher Scientific, cat no AC167851000)
- Dichloromethane, Pesticide grade (Fisher Scientific, cat no D142-4)
- Hexane (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no H300-4)
- Methyl tert-butyl ether (HPLC, Fisher Scientific, cat no E127-4)
- Methanol (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no A450-4)
- Potassium chloride (ACS, Fisher Scientific, cat no P217-500)
- Silica gel (70-230 mesh, Fisher Scientific, cat no S826-1)
- 2-propanol (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no A519-4)
- Tetrabutylammonium hydrogen sulfate (J.T. Baker, cat no V3560-7)
- Sodium sulfite (Fisher Scientific, cat no S430-500)
- Sulfuric acid (Certified ACS Plus, Fisher Scientific, cat no A300-212)
- Iso-Octane (Pesticide grade, Fisher Scientific, cat no O297-4)

2 Accessories:

- 2 100 ml volumetric flasks with stoppers
- 1 125ml Erlenmeyer flask with stopper
- Glass tubes medium, size 16x125 mm (Biochem Stores, cat no 188950)
- Glass tubes small, size 16x100 mm (Fisher Scientific, cat no 14-959-35AA)
- Screw caps, thread 14-415 mm (Fisher Scientific, cat no 14-930-15E)
- Pasteur pipettes (Fisher Scientific, cat no 22-183632)
- GC vials (Fisher Scientific, cat no 03-391-6)
- GC caps (Fisher Scientific, cat no 22-021861)
- GC vials inserts (Fisher Scientific, cat no 14-823-374)
- 6ml Glass Reaction Tube[®] with 1 Teflon[®] frit (Supelco, cat no 504394)
- Polypropylen needle valves, (Waters, cat no WAT 200685)
- Glass Fiber Filters 13mm, Type A/E, (Pall Life Sciences, cat no 61628)
- Pipet-Lite[®] 2 to 20 μ l standard (Rainin, cat no SL-20)
- Pipet-Lite[®] 20 to 200 μ l standard (Rainin, cat no SL-200)
- Pipet-Lite[®] 100 to 1000 μ l standard (Rainin, cat no SL-1000)
- AutoRep Manual Pepeating Pipet 10 μ l-5ml (Rainin, cat no AR-M2)
- Encode Syringe 5ml (Rainin, cat no ENC-5ML)
- Encode Syringe 50ml (Rainin, cat no ENC-50ML)
- Kimberley-Clark Purple Nitrile Exam Gloves (Fisher Scientific, cat no S78945)

3 Instruments:

- Desiccator
- Rotator for tubes - Fisher Scientific Roto-Rack[®] SN 1099
- S/P[®] Vortex Mixer (American Scientific Product, cat no S8223-1)
- Eppendorf centrifuge 5810 R
- The Meyer N-ENVAP Analytical Evaporator (Organomation, SN 2108)
- MILLI-Q[®] ACADEMIC A10 (Millipore, SN F4HN34348D)

- Furnace 30400 Bransted/Thermolyne
- Waters extraction manifold, 20-position (Waters, cat no WAT200606) with Vacuum Pump (Waters, cat no WAT085114)

4 Accessories and glassware cleaning:

4.1 Prepare SPE accessories:

4.1.1 Rinse all valves before and after each extraction 4 times with solvents in order: 1 acetone, 2 dichloromethane, 3 acetone, 4 hexane

4.1.2 Hold Glass Reaction Tubes® at a temperature of 450°C overnight.

5 Preparation of additional reagents:

5.1 Activation of silica gel

Combust silica gel at 450°C overnight.

5.2 Silica gel / 90% aq. sulfuric acid (2:1, w/w)

Prepare this adsorbent for clean-up at least one week before MeSO₂-PCBs clean-up!!!

For 75g, weight 50 g of silica gel into Erlenmeyer's flask. Prepare 25g 90% aq. Sulfuric acid in baker: take 1.54g of ultra-pure water and add 23.46 of concentrated sulfuric acid and mix well. Add prepared 25g of solution into Erlenmeyer's flask. Invert flask at least for 2 hours.

5.3 Potassium hydroxide 0.5 M solution in 50% ethanol

For 100 ml, weight out 2.8 g solid potassium hydroxide and dissolve in equal amounts by volume of ultra-pure water and ethanol.

5.4 Potassium chloride 1%

For 100 ml, take 1 g of potassium chloride and dissolve in 100 ml of ultra-pure water.

5.5 Hydrochloric acid 6 M

For 100 ml, take 50 ml of ultra-pure water and add 50 ml of concentrated hydrochloric acid.

5.6 Hydrochloric acid 2 M

For 100 ml, take 17 ml of concentrated hydrochloric acid and fill up the volumetric flask with ultra-pure water.

5.7 TBA solution

To make TBA solution, take 3.39 g of tetrabutylammonium hydrogen sulfate and dissolve in 100 ml of ultra-pure water. Add to jar containing 25 g of sodium sulfite. Shake well. Invert tube for 3 min

6 Label 10 screw-cap tubes for each sample:

Remember that for centrifugation, the number of samples needs to be even. If it is not, prepare additional blank. Cap the vials.

Prepare 3xE (medium), 1xNE (medium), 2xO (small), 2xP (small), 2xM (first one small, second – medium) vials, set aside of each O,P,M.

Prepare also one storage vial for each sample (label ST) and one shell vial for lipids determination (label LP).

7 Denaturation and extraction:

7.1 Weight the first tube labeled E1.

Place sample in the tube. Weight again. Note the sample mass.

PAUSE POINT – store samples in the fridge.

7.2 Add 2 ml of KCl solution to the first tube labeled E1 containing blank samples. Add to the remaining vials KCl to have similar volume in all tubes.

7.3 Spike each sample with surrogate standards (PCB 14, PCB 65 and PCB 166, about 1 µg/ml, 100 µl; 3-MeSO₂-PCB 87; 0.4 µg/ml, 250 µl; 3-OH-PCB 159; 1.37 µg/ml, 100 µl). Standard mixture should be kept at room temperature for about 2 h before spiking! Don't forget to prepare 3 GC vials with screw cap (reference vials) for each of PCB, MeSO₂ and OH-PCBs and spike them with appropriate standards at the same time. Note on GC vials what and how much you spiked.

7.4 Add 1 ml of 6M HCl.

7.5 Vortex the tube.

7.6 Add 5 ml of 2-propanol.

7.7 Vortex the tube.

7.8 Add 5 ml of hexane-MTBE mixture (1:1 v/v).

7.9 Invert tube for 5 min.

7.10 Centrifuge tube E1 at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 5 at 20°C (program 6).

7.11 Put 4 ml of KCl in tube labeled E2.

7.12 Transfer organic phase with extract in second tube labeled E2.

7.13 Re-extract first tube labeled E1 with 3 ml of hexane.

7.14 Vortex and invert tube labeled E1 for 5 min.

7.15 Centrifuge tube E1 at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 5 at 20°C (program 6).

7.16 Combine organic phase with extract in second tube labeled E2.

Discard content of first tube labeled E1.

7.17 Invert tube labeled E2 for 3 min.

7.18 Centrifuge tube no 2 at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 5 at 20°C (program 6).

7.19 Transfer organic phase to third tube labeled E3.

7.20 Re-extract aqueous phase in second tube (E2) with 3 ml of hexane.

7.21 Invert tube E2 for 3 min.

7.22 Centrifuge tube E2 at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 5 at 20°C (program 6).

7.23 Combine organic phase with extract in third tube labeled E3.

Dispose the content of tube labeled E2

PAUSE POINT – store samples in the fridge.

7.24 Concentrate extract in third tube labeled E3 under gentle stream of nitrogen to approximately 1 ml.

8 Lipid content determination:

8.1 Pre-weight shell vial with cap (labeled LP).

8.2 Place the extract from the tube into shell vial (do this under the hood).

Rinse the tube twice with about 1ml of hexane and transfer content to shell vial each time.

Do not throw away the tube labeled E3!

8.3 Evaporate the extract to dryness.

8.4 Store shell vials in the desiccator overnight.

PAUSE POINT

8.5 Weight the dried extract in closed shell vial. Note the lipid mass.

9 Reconstitution of sample:

9.1 Re-dissolve sample in shell vial in 1 ml of hexane.

- 9.2 Vortex the tube.
 - 9.3 Transfer the extract back to the tube labeled E3.
 - 9.4 Repeat s 9.1-9.3 three times.
 - 9.5 Vortex vial labeled E3 quickly.
 - 9.6 Weight out approximately half of the extract into storage vial.
- PAUSE POINT – store samples in the fridge.

10 Separation of phenolic compounds:

- 10.1 Add 2 ml of KOH solution to tube labeled E3.
 - 10.2 Invert tube for 3 min.
 - 10.3 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
 - 10.4 Transfer organic phase to tube labeled NE.
(tube NE contains neutral fraction, will undergo further separation).
 - 10.5 Re-extract alkaline solution in tube labeled E3 with 3 ml hexane.
 - 10.6 Invert tube for 3 minutes.
 - 10.7 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
 - 10.8 Add organic phase to extract in tube labeled NE.
 - 10.9 Set aside tube NE.
 - 10.10 Acidify alkaline solution in tube E3 with 0.5 ml 2M HCl solution.
Check if the solution is indeed acidic using an indicator stripe.
 - 10.11 Vortex the tube E3 quickly.
 - 10.12 Extract tube E3 with 4 ml of hexane-MTBE mixture (9:1 v/v).
 - 10.13 Invert tube for 3 min.
 - 10.14 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
 - 10.15 Transfer organic phase to tube labeled O1 (OH-PCBs).
 - 10.16 Re-extract OH-PCBs in tube E3 with 3 ml of hexane-MTBE mixture (9:1 v/v).
 - 10.17 Invert tube E3 for 3 min.
 - 10.18 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
 - 10.19 Add organic Phase to tube labeled O1 (OH-PCBs).
Discard the content of the tube labeled E3.
- PAUSE POINT – store samples in the fridge.

11 Derrivatization of OH-PCB:

- 11.1 Evaporate the samples in tube O1 under gentle stream of nitrogen to almost dryness.
 - 11.2 Fill samples up to 1 ml with hexane.
 - 11.3 Mark the level in vials.
 - 11.4 Add 5 drops of methanol.
 - 11.5 Mix samples.
- Don't forget to derrivatize standard and/or reference vial.
- 11.6 Add 0.5 ml of diazomethane (about 5mmol).
 - 11.7 Store in the fridge overnight.
- PAUSE POINT
- 11.8 Evaporate slightly below the marked level to ensure all diazomethane is gone.
Evaporate vial with standard/reference vial to dryness to make sure all methanol is gone.

12 Separation of PCBs from MeSO₂-PCBs:

Further work on tube NE (neutral compounds).

- 12.1 Add 0.5 ml DMSO to tube labeled NE.
- 12.2 Invert tube for 10 min.
- 12.3 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
- 12.4 Transfer organic phase to tube labeled P1 (PCBs).
- 12.5 Re-extract DMSO in tube labeled NE with 3 ml of hexane.
- 12.6 Invert tube NE for 5 min.
- 12.7 Centrifuge tube NE at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
- 12.8 Add organic phase to tube labeled P1 (PCBs).
- 12.9 Concentrate the sample in tube P1 under gentle stream of nitrogen to about 1ml.

13 Isolation of MeSO₂-PCB.

- 13.1 Add 1 ml of ultra-pure water to DMSO in tube labeled NE.
- 13.2 Extract DMSO in tube NE with 3 ml of hexane.
- 13.3 Invert tube for 3 min.
- 13.4 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
- 13.5 Transfer organic phase to tube labeled M1 (MeSO₂-PCBs).
Be very careful on separating these phases!!! Take less of organic, but make sure you separated well.
- 13.6 Re-extract DMSO in tube NE with 1 ml of hexane.
- 13.7 Invert tube for 3 min.
- 13.8 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
- 13.9 Add organic phase to tube labeled M1 (MeSO₂-PCBs).
Discard the content of the tube labeled NE.
PAUSE POINT – store samples in the fridge.

14 Clean-up of MeSO₂ fraction:

- 14.1 Evaporate sample to dryness under gentle stream of nitrogen.
- 14.2 Re-dissolve sample in 0.5 ml of dichloromethane. Vortex the tube.
- 14.3 In Glass Reaction Tube® prepare column:
 - 14.3.1 Put Glass Fiber Filters at the bottom.
 - 14.3.2 Add 0.2 g of activated silica gel at the bottom.
 - 14.3.3 Add 0.8 g of silica gel / 90% aq. sulfuric acid (2:1, w/w).
 - 14.3.4 Condition column with 5x2 ml of dichloromethane at 15 Hg vacuum at the rate 4ml/min. Do not allow the extraction column to run dry between and after the conditioning steps (leave 2-3 mm layer of solvent upon an adsorbent).
- 14.4 Apply extract to the solvent in the column.
- 14.5 Rinse the tube M1 twice with 0.5 ml of dichloromethane and combine extracts in the column.
- 14.6 Elute column 10 times with 2 ml of dichloromethane at atmospheric pressure at a rate of 2 ml/min (1 drops per second). Do not allow the extraction column to run dry between eluting steps.

- 14.7 Evaporate sample to dryness under gentle stream of nitrogen.
 - 14.8 Re-dissolve in 0.1 ml of iso-octane.
 - 14.9 Add 100 µl of PCB Internal Standard (about 25 ng).
- Add internal Standard to reference vial as well! Vortex and invert the tube for 2 min.
- 14.10 Place the extract in low volume insert in GC vial.

15 Clean-up of MeO and PCB fractions:

- 15.1 Add 100 µl of PCB Internal Standard (about 25 ng).
- Add Internal Standard to reference vial as well!
- 15.2 Add 2 ml of 2-propanol and 2 ml of TBA solution.
 - 15.3 Add 5 ml of ultra-pure water.
 - 15.4 Invert tube for 3 min.
 - 15.5 Remove the organic (top) layer and place in the new tube (second tubes labeled O2 and P2).
 - 15.6 Add 2 ml of concentrated sulfuric acid.
 - 15.7 Invert tube for 5 min.
 - 15.8 Centrifuge tube at 3000 rpm, 5 min with acceleration and brake set to 9 at 20°C (program 5).
 - 15.9 Place the organic layer in GC vial.
- Sample may need additional concentrating and placing in low volume insert.

SAMPLE INFORMATION						
Procedure name	EXTRACTION, SEPARATION AND CLEAN-UP OF PCB AND ITS METABOLITES FROM BLOOD/SERUM/PLASMA/URINE SAMPLES			Procedure version	SOP_BM2_v2.0 (Version 2, 01/28/2008)	
Sample name	Project	MDR PROJECT		Recovery standards:		
	Tissue			PCB	100	ng
	Animal			MeSO ₂	96	ng
Start date		Sig.		OH	137	ng
LIQUID/LIQUID EXTRACTION						
Sample mass [g]	Homogenization []			0.1 M H ₃ PO ₄ in 0.9% NaCl []		
	Conditions:					
2-Propanol []	DEE []	Hex []	MTBE []	1% KCl []	6M HCl []	
Mass of empty storage vial	[g]	Mass of empty lipid vial	[g]	Lipid content [%]		
Mass of storage vial with extract	[g]	Mass of lipid vial with lipids	[g]	Mass for store [g]		
Mass of extract	[g]	Mass of lipids	[g]	Mass for analysis [g]		
CLEAN UP						
MeO and PCB fractions	H ₂ SO ₄ []	Additional clean-up:				
MeSO ₂ fraction	Silica gel/90% aq. sulfuric acid 2:1 (w/w) []			Adsorbent mass	[g]	
Internal standard	PCB 30	25 [ng]	PCB 204	25 [ng]		
GC ANALYSIS						
Mass of extract	[g]	Respective mass of sample	[g]	[% RS]		
Column	Detector	Program/Method	Analysis date	Recoveries [%]		Concentration [ng/g]
SLB-5MS	μECD	BARTPCB		PCB14		ΣPCB
				PCB66		
				PCB166		
		BARTMeOPCB		4-OH-PCB159		ΣMeo-PCB
BARTMeSO ₂ PCB	3- MeSO ₂ -4-Me-PCB87		ΣMeSO ₂ .PCB			
CP-Chirasil-Dex CB	μECD	WONG & GARRISON		PCB14		ΣPCB
				PCB66		
				PCB166		
Date		Signature				

Any additional comments – on the other side of form

XI. WYKAZ TABEL

Tabela 1. System numeracji kongenerów PCB * wg IUPAC [2].	17
Tabela 2. Profil podstawienia atomami chloru 19 trwałych atropoizomerów PCB *.	22
Tabela 3. Trwałe, chiralne atropoizomery MeSO ₂ -PCB, najczęściej wykrywane w matrycach środowiskowych i biologicznych [49, 53, 85].	23
Tabela 4. Fizyczne właściwości grup homologicznych PCB ^a [69].	26
Tabela 5. Interakcje wybranych PCB z receptorami i enzymami.	44
Tabela 6. Poziomy PCB wskaźnikowych w żywności i tkankach ludzkich wg raportu UNEP [1].	52
Tabela 7. Wartości współczynników równoważnych toksyczności 2,3,7,8-TCDD (TEF) dla polichlorowanych: dibenzo-p-dioksyn (PCDD), dibenzofuranów (PCDF) oraz planarnych i monoortopodstawionych, dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) (wg WHO 1998 i 2005 r.) [235].	53
Tabela 8. Wybrane techniki chemometryczne służące do analizy danych wielowymiarowych [286].	67
Tabela 9. Stężenia chiralnych kongenerów PCB w roztworach wzorcowych.	74
Tabela 10. Parametry krzywych kalibracyjnych detektora μ ECD.	81
Tabela 11. Granice wykrywalności (IDL) układu GC- μ ECD dla wybranych PCB.	82
Tabela 12. Ocena statystyczna wyników oznaczania tłuszczu w próbkach materiału biologicznego metodami ekstrakcji rozpuszczalnikami (SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0).	86
Tabela 13. Granice wykrywalności (MDL) i oznaczalności (MQL) metod oznaczania PCB w próbkach materiału biologicznego.	88
Tabela 14. Ocena powtarzalności odzysków PCB ze wzbogaconych próbek wątroby i krwi (n=7).	89
Tabela 15. Ocena precyzji pośredniej oraz odzysku PCB ze wzbogaconych próbek wątroby (n=6) i krwi (n=5).	89
Tabela 16. Ocena liniowości metod SOP_BM1_v2.0 oraz SOP_BM2_v2.0 oznaczania wybranych chiralnych PCB w materiale biologicznym.	91
Tabela 17. Skład jakościowy i ilościowy roztworu olejowego chiralnych PCB do podania per os.	93
Tabela 18. Badany materiał biologiczny.	96
Tabela 19. Zmiany masy ciała myszy doświadczalnych oraz masy badanych organów (odniesione do masy ciała zwierząt) po podaniu mieszaniny racemicznej chiralnych PCB lub placebo.	96
Tabela 20. Wyniki oznaczeń wyekstrahowanych zawartości tłuszczu [%] z badanych matryc myszy grup WT i KO.	98
Tabela 21. Granice wykrywalności (LOD) oraz granice oznaczalności (LOQ) tła laboratoryjnego na podstawie analizy próbek ślepych oraz poziomy tła w matrycach zwierząt z grup kontrolnych WT i KO.	106
Tabela 22. Etapy i cel przeprowadzanych analiz statystycznych i chemometrycznych.	107
Tabela 23. Przykładowa macierz D do analizy PCA poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń [ng/g m.m.].	109
Tabela 24. Przykładowa macierz L ładunków głównych składowych, otrzymana w toku analizy PCA poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń [ng/g m.m.].	110
Tabela 25. Przykładowa macierz F wartości głównych składowych, obliczona w toku analizy PCA poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń [ng/g m.m.].	111
Tabela 26. Wymiary macierzy i wyniki obliczeń PCA dla analizowanych poziomów PCB.	112
Tabela 27. Poziomy [ng/g m.m.] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 91, 95, 132 i 136 w tkankach, organach, krwi, moczu i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).	118
Tabela 28. Poziomy [ng/g m.m.] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 149, 174, 176 i 183 w tkankach, organach, krwi, moczu i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).	119
Tabela 29. Poziomy [μ g/g tłuszczu] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 91, 95, 132 i 136 w tkankach, organach, krwi i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).	120
Tabela 30. Poziomy [μ g/g tłuszczu] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 149, 174, 176 i 183 w tkankach, organach, krwi i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).	121
Tabela 31. Poziomy [%TD] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 91, 95, 132 i 136 w tkankach, organach, krwi i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).	122
Tabela 32. Poziomy [%TD] i ocena statystyczna wyników oznaczeń PCB 149, 174, 176 i 183 w tkankach, organach, krwi i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).	123
Tabela 33. Wyniki i ocena statystyczna oznaczeń frakcji enancjomerycznych (EF) wybranych atropoizomerów PCB w tkankach, organach, krwi, moczu i kale myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7).	124
Tabela 34. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [ng/g m.m.].	128

<i>Tabela 35. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [ng/g m.m.]</i>	129
<i>Tabela 36. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [ng/g m.m.]</i>	130
<i>Tabela 37. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [ng/g m.m.]</i>	131
<i>Tabela 38. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [µg/g tłuszczu]</i>	132
<i>Tabela 39. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [µg/g tłuszczu]</i>	133
<i>Tabela 40. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [µg/g tłuszczu]</i>	134
<i>Tabela 41. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [µg/g tłuszczu]</i>	135
<i>Tabela 42. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [%TD]</i>	136
<i>Tabela 43. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [%TD]</i>	137
<i>Tabela 44. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 91, 95, 132 i 136, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [%TD]</i>	138
<i>Tabela 45. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a poziomów PCB 149, 174, 176 i 183, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7), z uwzględnieniem stężeń badanych kongenerów wyrażonych w [%TD]</i>	139
<i>Tabela 46. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a frakcji enancjomerycznych (EF) wybranych atropoizomerów PCB, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej WT (n=7)</i>	140
<i>Tabela 47. Wyniki analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a frakcji enancjomerycznych (EF) wybranych atropoizomerów PCB, oznaczonych w tkankach i organach myszy z grupy badanej KO (n=7)</i>	141

XII. WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Wzór cząsteczki bifenyłu.	16
Rycina 2. Konformacje podstawników wokół centralnego wiązania typu σ cząsteczki biarylu [71].	20
Rycina 3. Racemizacja cząsteczki PCB z dwoma atomami chloru podstawionymi w pozycji orto- wokół centralnego wiązania C-C [75] poprzez stan metastabilny transoid (a) i cisoid (b).	21
Rycina 4. Izomery optyczne 2,2',3,6 – tetrachlorobifenyłu (PCB 45) [81].	21
Rycina 5. Model dystrybucji polichlorowanych bifenyli w organizmach ssaków oparty na podstawach fizjologicznych [156].	34
Rycina 6. Wykresy ramka-wąsy wartości EF wybranych chiralnych kongenerów PCB oznaczonych w próbkach środowiskowych (zaadaptowano z [36]).	36
Rycina 7. Struktura P-gp wg [61].	39
Rycina 8. Schemat biontransformacji 2,2',4,5,5'-pentachlorobifenyłu, zaadaptowano z [43].	42
Rycina 9. Model strukturalny i przestrzenny cyklodekstryn [275].	63
Rycina 10. Porównanie precyzji pomiarów parametrów retencyjnych wybranych PCB metodą GC- μ ECD (kolumna SLB-5MS) wykorzystywanych do identyfikacji analitów w ekstraktach matryc biologicznych.	79
Rycina 11. Porównanie powtarzalności parametrów ilościowych pików chromatograficznych PCB, odczytanych przez ChemStation software.	80
Rycina 12. Schemat postępowania analitycznego oznaczania chiralnych PCB w próbkach materiału biologicznego wg procedur SOP_BM1_v2.0 i SOP_BM2_v2.0.	84
Rycina 13. Odzyski [%] badanych kongenerów PCB z kolumniek SPE wypełnionych Florisilem oraz Si(OH)/Si(OH) x H ₂ SO ₄ (2:1).	85
Rycina 14. Odzysk PCB ($x_{sr} \pm SD$) [%] z próbek materiału biologicznego wzbogaconych na różnych poziomach. ...	90
Rycina 15. Profile chiralnych PCB w roztworze olejowym do podania per os.	93
Rycina 16. Schemat podziału myszy doświadczalnych na grupy.	94
Rycina 17. Doświadczenie na modelu zwierzęcym:	95
Rycina 18. Przykładowe chromatogramy GC- μ ECD (kolumna SLB-5MS):	101
Rycina 19. Wpływ liczby nastrzyknięć na zdolność rozdzielczą kolumny CP-Chirasil-Dex CB:	104
Rycina 20. Wykres PC1 względem PC2 dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych w [ng/g m.m.].	114
Rycina 21. Wykres ładunków głównych dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych w [ng/g m.m.].	114
Rycina 22. Wykres PC1 względem PC2 dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych w [μ g/g tłuszczu].	115
Rycina 23. Wykres ładunków głównych dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 znormalizowanych na sumę ich stężeń oznaczonych w badanych matrycach biologicznych w [μ g/g tłuszczu].	115
Rycina 24. Wykres PC1 względem PC2 dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 wyrażonych jako % ułamek całkowitej dawki per os poszczególnego kongeneru [%TD].	116
Rycina 25. Wykres ładunków głównych dla poziomów PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183 wyrażonych jako % ułamek całkowitej dawki per os poszczególnego kongeneru [%TD].	116
Rycina 26. Wykres PC1 względem PC2 dla frakcji enancjomerycznych (EF) PCB 91, 95, 136, 149, i 176.	117
Rycina 27. Wykres ładunków głównych dla frakcji enancjomerycznych (EF) PCB 91, 95, 136, 149, i 176.	117
Rycina 28. Procentowy udział poszczególnych kongenerów PCB w Σ PCB _{chiralnych} oznaczonych w próbkach: A) mieszaniny PCB przeznaczonej do podania per os, B) kału, zebranych pomiędzy 0-12 h, C) kału, zebranych pomiędzy 12-24 h, D) tkanki tłuszczowej, E) mózgu, F) krwi, i G) wątroby myszy WT (n=7) i KO (n=7) po podaniu jednorazowej dawki (50 μ g/g m.c.) mieszaniny wybranych chiralnych PCB per os.	125
Rycina 29. Porównanie średnich poziomów ($x_{sr} \pm SD$), wyrażonych w [ng/g m.m.]: A) PCB 91, B) PCB 95, C) PCB 132, D) PCB 136, E) PCB 149, F) PCB 174, G) PCB 176 i H) PCB 183, oznaczonych w tkankach, organach, krwi i wydalinach myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7) po podaniu per os jednorazowej dawki (50 μ g/g m.c.) mieszaniny w/w PCB.	126
Rycina 30. Porównanie średnich wartości ($x_{sr} \pm SD$) frakcji enancjomerycznych (EF) atropoizomerów: A) PCB 91, B) PCB 95, C) PCB 136, D) PCB 149, E) PCB 174, oznaczonych w tkankach, organach, krwi i wydalinach myszy z grup badanych WT (n=7) i KO (n=7) po podaniu per os jednorazowej dawki (50 μ g/g m.c.) mieszaniny wybranych chiralnych PCB.	127

XIII. WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH DOKTORANTA

1. **MILANOWSKI B.**, *Forma organizacyjno-prawna oraz korzyści płynące z działalności Uniwersyteckiego Centrum Transferu Technologii Medycznych w Poznaniu*. Prowadzenie, zarządzanie i komercjalizacja badań naukowych. Zbiór esejów uczestników projektu p.t. "Warsztaty naukowo-praktyczne z zakresu prowadzenia, zarządzania i komercjalizacji badań naukowych". Katowice: Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa, s. 223-227(2011), (**MNiSW = 3**).
2. **MILANOWSKI B.**, *Geneza powstania i funkcje Uniwersyteckiego Centrum Transferu technologii Medycznych w Poznaniu*. Prowadzenie, zarządzanie i komercjalizacja badań naukowych. Zbiór esejów uczestników projektu p.t. "Warsztaty naukowo-praktyczne z zakresu prowadzenia, zarządzania i komercjalizacji badań naukowych". Katowice: Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa, s. 228-232(2011), (**MNiSW = 3**).
3. **MILANOWSKI B.**, Lulek J., Lehmler HJ., Kania-Korwel I., *Assessment of the disposition of chiral polychlorinated biphenyls in female mdr 1a/b knockout versus wild-type mice using multivariate analyses*. Environ Int., 36 (8), s. 884-892 (2010), (**IF₂₀₀₉ = 4,786**, **MNiSW = 32**).
4. **MILANOWSKI B.**, *Zastosowanie STATISTICA Profile Uwalniania w pracach badawczych i przemyśle farmaceutycznym*. II Konferencja Szkoleniowa „Praktyczna Analiza Danych dla Przemysłu Farmaceutycznego” StatSoft sp. z o.o., Kraków, Polska, 21 – 22 maj 2009. Materiały z seminariów, s. 39-52 (2009), (**MNiSW = 3**).
5. J. Lulek, M. Opielewicz, K. Szyrwińska, **B. MILANOWSKI**, *Application of the retention database to the identification of individual polychlorinated biphenyl congeners in Aroclors mixture using selected PCBs as a reference series*. Anal. Chim. Acta, 540 (1), s. 25-31 (2005), (**IF₂₀₀₅ = 2,76**, **MNiSW = 24**).
6. **B. MILANOWSKI**, K. Szyrwińska, K. Jaraczewska, J. Lulek, *Application of Chroma 2001 to identification and quantification of selected OCPs and PCBs in multicomponent food extracts*. Pol. J. Food Nutr. Sci. 12, s. 77-80 (2003), (**MNiSW = 6**).

XIV. STRESZCZENIE

Opierając się na dostępnych wynikach badań przyjęto hipotezę, że chiralne kongenery PCB, tj. PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183, mogą być substratem dla glikoproteiny-P (P-gp), tj. aktywnego, stereoselektywnego transportera białkowego, kodowanego genem wielolekowej oporności – MDR1 (*Multidrug Resistance 1*). Celem niniejszej pracy była weryfikacja założonej hipotezy poprzez wykonanie badań aktywnego transportu *in vivo* w modelu zwierzęcym: na myszach typu dzikiego (ang. *wild-type* - WT) oraz myszach pozbawionych genów *mdr1a/b* (ang. *knockout mice* - KO). W przeprowadzonych badaniach wykorzystano model myszy transgenicznym w połączeniu z metodologią wielowymiarowych analiz chemometrycznych i statystycznych, umożliwiającą określenie różnic w rozmieszczeniu wybranych, chiralnych kongenerów PCB w tkankach, organach i wydalinach myszy.

W pierwszym etapie badań opracowano i zwalidowano 2 procedury oznaczania w próbkach biologicznych ośmiu chiralnych kongenerów PCB, najczęściej spotykanych w matrycach środowiskowych i biologicznych, tj. PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 i 183. W kolejnym etapie samicom myszy FVB (WT) oraz myszom KO podano w jednorazowej dawce *per os* (50 mg/kg m.c.) racemiczną mieszaninę w/w kongenerów PCB. Ze względu na stosunkowo krótki okres biologicznego półtrwania kongenerów chiralnych u gryzoni, po 24 h od podania mieszaniny zwierzęta poddano eutanazji celem pobrania organów, tkanek i wydaliny do dalszych analiz. Próbkę uzyskanego materiału biologicznego, tj. krwi, brzusznej tkanki tłuszczowej, wątroby, jelit, nerek, mózgu a także mocz i kał, poddano ekstrakcji i oczyszczaniu według wcześniej zwalidowanych procedur. Otrzymane ekstrakty poddano analizie GC- μ ECD celem określenia profili stężeń oraz frakcji enancjomerycznych poszczególnych kongenerów PCB. Uzyskane wartości frakcji enancjomerycznych, obliczone dla poszczególnych par atropoizomerów PCB 91, 95, 136, 149 i 174 wskazują na wyraźne wzbogacenie enancjomeryczne tych pięciu kongenerów u myszy niepozbawionych i pozbawionych genów *mdr1a/b*.

Ostatni etap badań stanowiło opracowanie uzyskanych danych technikami wielowymiarowych analiz chemometrycznych oraz statystycznych. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) profili stężeń badanych związków oraz ich frakcji enancjomerycznych nie wykazały istotnych różnic w rozmieszczeniu atropoizomerów PCB w organach i tkankach

pomiędzy badanymi grupami zwierząt, co nie potwierdziło założonej na wstępie hipotezy. Jednakże wyniki testów T^2 -Hotelling'a ujawniły statystycznie istotne niższe stężenia chiralnych PCB i ich większe wzbogacenie enancjomeryczne w tkance tłuszczowej myszy pozbawionych genów *mdr1a/b*. Różnice te wynikają prawdopodobnie z większej masy ciała oraz wyższej zawartości tłuszczu w kale tych zwierząt.

Zastosowana procedura badawcza z użyciem mieszaniny chiralnych PCB środowiskowych oraz modelu myszy transgenicznych, w połączeniu z narzędziami redukcji i opracowania danych wielowymiarowych, pozwoliła na jednoznaczne wykluczenie w jednym tylko eksperymencie na zwierzętach pięciu chiralnych kongenerów PCB (tj. 91, 95, 136, 149, 174) jako substratów transporterów wielolekowej oporności kodowanych genami *mdr1a/b*. Opracowana procedura badawcza może znaleźć uniwersalne zastosowanie w badaniach nad depozycją ksenobiotyków (w tym leków) w organizmach żywych, wliczając w to również procesy aktywnego transportu czy biotransformacji. Podczas korzystania z zaproponowanego modelu, należy jednak zwrócić uwagę na jego pewne ograniczenie, polegające na wpływie mutacji genów *mdr1a/1b* na zmiany w ekspresji wielu innych genów, co może zmieniać procesy fizjologiczne u zwierząt transgenicznych (a tym samym może wpływać na rozmieszczenie ksenobiotyków w sposób, który nie wynika z eliminacji poszczególnego genu).

XV. SUMMARY

Evaluation of the impact of P-glycoprotein on the disposition of selected chiral polychlorinated biphenyl congeners in mice

This work employ a transgenic mouse model in combination with multivariate analyses to investigate if eight environmentally relevant chiral PCBs 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 and 183 are subject to active (enantioselective) transport by multidrug resistance (MDR) transporters. It herein investigate the disposition of a synthetic PCB mixture in female *mdr1a/b* knockout versus FVB wild-type mice and explore the potential role of MDR transporters in the (enantioselective) tissue distribution of individual PCB congeners. The synthetic PCB mixture contained these chiral PCB congeners (i.e., PCBs 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176 and 183) in the ratio of a synthetic mixture designed to approximate the PCB profile of fish from the Fox River in Wisconsin (USA) was administered orally to female FVB or *mdr1a/1b* knockout mice. Due to the short half-life of chiral PCB congeners, mice were euthanized after 24 hours and PCB concentrations and enantiomeric fractions were determined in selected tissues and excreta. PCB congener profiles and enantiomeric fractions were determined in abdominal adipose tissue, brain, liver, intestines and kidneys 24 hours after PCB administration. These tissues were selected because *mdr1*-type P-glycoproteins are expressed in these tissues in mice or because they are storage tissues for PCBs. Subsequently, the data were analyzed using multivariate data reduction tools to identify PCB congeners with different tissue concentrations and/or enantiomeric fractions among treatment groups or tissues.

Analysis of the enantiomeric fractions of PCBs 91, 95, 136, 149 and 174 showed a significant enantiomeric enrichment for all five congeners in wild-type and *mdr1a/b* knockout mice. Principal component analysis did not reveal differences between wild-type and *mdr1a/b* knockout mice. However, Hotelling T²-test revealed significantly lower PCB concentrations and a more pronounced enantiomeric enrichment in the adipose tissue of *mdr1a/b* knockout mice. These differences are probably due to higher body weights and higher fecal fat contents of *mdr1a/b* knockout mice. Overall, by studying a PCB mixture in a transgenic mouse model in combination with a multivariate data reduction approach, PCBs 91, 95, 136, 149 and 174 could be excluded as substrates of multidrug resistance transporters 1a/b.

This approach can be extended to investigate disposition processes of xenobiotics in many other transgenic animal models and potentially facilitate the screening of a large number of compounds in a single animal experiment. One pitfall of this approach is that changes in the expression of a single gene affect the expression of many other genes and ultimately the physiology of the transgenic animals. This, in turn, may alter the disposition of xenobiotics in a manner that is not related to the knock out of a single gene product (e.g., mdr 1a/b in this study).