

TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNGEN

ISBN 0937-4248

**Dichlor-
essigsäure,
Natriumdi-
chloracetat**

Nr. 188 b

CAS-Nr. 79-43-6

CAS-Nr. 2156-56-1



BG Chemie

Berufsgenossenschaft der
chemischen Industrie

ISSN 0937-4248

Die Erstellung der TOXIKOLOGISCHEN BEWERTUNGEN ist nach bestmöglicher Sorgfalt erfolgt, jedoch ist eine Haftung bei fehlerhaften Angaben oder Bewertungen ausgeschlossen.

© Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Heidelberg

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung, vorbehalten. Nachdrucke - auch auszugsweise - nur mit ausdrücklicher Genehmigung der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie.

Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie
Postfach 10 14 80, 69004 Heidelberg
Telefon: 06221 523 (0) 400
E-Mail: ToxikologischeBewertungen@bgchemie.de
Internet: www.bgchemie.de/toxikologischebewertungen

Dichloressigsäure, Natriumdichloracetat

Dichloroacetic acid, Sodium dichloroacetate

Neben Dichloressigsäure (Nr. 188 b) existiert eine TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG zu Dichloressigsäurechlorid (Nr. 188 a), die zum Vergleich herangezogen werden kann. Dichloressigsäurechlorid hydrolysiert in wässriger Phase zu Dichloressigsäure, sodass die resorptiven Wirkungen des Chlorids im Wesentlichen auf die der Dichloressigsäure zurückgeführt werden können. Die Datenlage zu Dichloressigsäurechlorid ist wesentlich weniger umfangreich.

1 Zusammenfassung und Bewertung

Dichloressigsäure wird nach oraler Aufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Bei gleicher Dosierung liegen die maximalen Konzentrationen im Blut und die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC-Werte) bei Ratten deutlich höher als bei Mäusen, während die Halbwertszeiten (ca. 2 bis 3 Stunden nach einmaliger Dosierung) sich nicht signifikant unterscheiden und das Verteilungsvolumen und die Clearance bei den Mäusen deutlich höher als bei den Ratten sind. Bemerkenswert ist, dass sich bei wiederholter im Vergleich zu einer einmaligen Applikation bei gleichem Verteilungsvolumen der AUC-Wert und die Halbwertszeit deutlich erhöhen und sich die Clearance aus dem Gesamtkörper sowie die metabolische Clearance verlangsamen, woraus 8- bis 10-mal höhere Blutspiegel resultieren als nach einmaliger Gabe. Dieser Effekt ist auch dann noch zu beobachten, wenn vor einer Bolusgabe nur sehr geringe Mengen verabreicht werden. Diese kumulative Eigenschaft von Dichloressigsäure spiegelt sich in den Ergebnissen der später beschriebenen Studien zur toxischen Wirkung der Substanz wider, wo sich eine steile Dosis-Wirkungsbeziehung und kumulative Effekte in den Zielorganen nach längerfristiger Applikation gezeigt haben. Es ist diskutiert worden, dass Dichloressigsäure am Metabolismus beteiligte Enzyme hemmt und dadurch eine autoinhibitorische Wirkung auf ihre eigene Metabolisierung ausübt. Bei der Zytochrom P450-abhängigen Metabolisierung von Dichloressigsäure werden Glykolsäure, Glyoxylsäure, Oxalsäure, Essigsäure, Thiodiessigsäure, Thiodiglykolsäure, Spuren von Monochloressigsäure und Kohlendioxid gebildet; un-

metabolisierte Dichloressigsäure erscheint nach einmaliger Applikation nur in geringen Mengen im Urin. Ein Teil der Glykolsäure findet Eingang in den Anabolismus und wird über eine Transaminierung zur Aminosäure Glyzin und diese wiederum zur Aminosäure Serin metabolisiert. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend mit der Atemluft und dem Urin; mit den Fäzes werden nur geringe Mengen ausgeschieden. Bei wiederholter Applikation nehmen die Ausscheidung als Kohlendioxid mit der Atemluft und die renale Ausscheidung von Oxalsäure ab, während die renale Ausscheidung der unmetabolisierten Verbindung und der Metaboliten Glykolsäure, Glyoxylsäure, Monochloressigsäure und Essigsäure zunimmt.

Die akute Toxizität von Dichloressigsäure bei oraler, inhalativer aber auch bei intravenöser Applikation ist gering (LD_{50} Ratte und Maus oral sowie intravenös > 2000 mg/kg Körpergewicht; keine erhöhte Mortalität der Ratte im Inhalations-Risiko-Test über 8 Stunden). Im einzigen akuten Test mit dermalen Applikation ist für das Kaninchen eine LD_{50} von ca. 798 mg (0,51 ml)/kg Körpergewicht ermittelt worden. Die 14-tägige Verabreichung von bis zu 600 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht im Trinkwasser (bis zu 1,875 g Dichloressigsäure/l) führt bei Ratten zu einer Säurebelastung, die die Nieren durch erhöhte Ammoniak-Bildung und Aktivitätssteigerung der hieran beteiligten Enzyme zu kompensieren versuchen. Bei Mäusen und Ratten kommt es nach akuter und subakuter oraler Gabe in der Leber zu Peroxisomenproliferation und Lipidperoxidation; das Lebergewicht ist erhöht.

Untersuchungen zur Haut- und Augenreizwirkung von Dichloressigsäure nach den heute gültigen Prüfrichtlinien liegen nicht vor. In älteren orientierenden Untersuchungen hat Dichloressigsäure sowohl an der Haut als auch am Auge ätzend gewirkt.

In subchronischen Studien an Ratte und Hund mit oraler Verabreichung von Natriumdichloracetat bzw. mit NaOH neutralisierter Dichloressigsäure per Schlundsonde, im Futter, im Trinkwasser oder in Gelatinekapseln (Hunde) kommt es zu ausgeprägten Schädigungen verschiedener Organsysteme. Selbst die untersten geprüften Dosen von nur 12,5 mg/kg Körpergewicht/Tag beim Hund (Verabreichung in Gelatinekapseln) bzw. von ca. 16 mg/kg Körpergewicht/Tag bei der Ratte (Trinkwasserapplikation in einer spezifischen 12-Wochen-Neurotoxizitätsstudie) verursachen noch nicht reversible degenerative Schädigungen des ZNS. Die dosisabhängigen Schä-

digungen des ZNS äußern sich klinisch in einer Paralyse der Hinterextremitäten und histopathologisch in einer Vakuolisierung der markhaltigen weißen Bereiche im Großhirn, Kleinhirn und/oder Rückenmark. Das periphere Nervensystem ist, wie auch der Sehnerv, frei von histopathologischen Veränderungen. Dosisabhängige Hodenschäden, gekennzeichnet durch eine makroskopische Verkleinerung des Hodens, degenerative Veränderungen des Keimepithels mit Riesenzellbildung, vergrößerte Sertoli-Zellen, atrophische Samenkanälchen und das Fehlen von Spermatogonien bzw. Spermien in den Hoden und den Nebenhoden, treten beim Hund, bei dem es auch noch zu einer Atrophie der Prostata kommt, ebenfalls schon nach subchronischer Gabe von nur 12,5 mg/kg Körpergewicht/Tag und bei der Ratte erst ab einer Dosis von 500 mg/kg Körpergewicht (Schlundsondenapplikation) auf. Die Nierengewichte sind bei der Ratte bzw. beim Hund ab einer Dosis von 35,5 bzw. 39,5 mg/kg Körpergewicht/Tag (Trinkwasserapplikation bzw. Applikation in Gelatine kapseln) erhöht. Diffuse Degenerationen des Nierentubulusepithels und der Glomeruli sind bei der Ratte nach Applikation von 345 mg/kg Körpergewicht/Tag (Trinkwasserapplikation) festgestellt worden. In der Leber induziert Dichloressigsäure dosisabhängig neben den bereits genannten Veränderungen (Organgewichtserhöhung, Lipidperoxidation und Peroxisomenproliferation) bei Ratte, Maus und Hund eine sehr ausgeprägte Hepatozytenhypertrophie mit Glykogenakkumulation, Hämosiderinablagerungen in den Kupffer'schen Sternzellen, Vakuolisierung des Zytoplasmas, Gallengangserweiterungen und nur bei der Maus fokale Nekrosen; als Folge der Lebertoxizität sind die Leberenzyme im Serum erhöht. Nur beim Hund und nur in einer von zwei subchronischen Studien an dieser Spezies, dort aber bereits in der Dosisgruppe 50 mg/kg Körpergewicht/Tag, hat Dichloressigsäure bilaterale Linsentrübungen mit Hyperämie der Konjunktiven und oberflächlichen Corneavaskularisationen sowie Anzeichen einer Keratokonjunktivitis sicca induziert. Ebenfalls nur beim Hund und auch nur in einer der beiden vorliegenden subchronischen Studien ist bei männlichen Tieren eine Thymusatrophie, charakterisiert durch einen Schwund des lymphatischen Gewebes, nach Applikation von 72 mg/kg Körpergewicht/Tag aufgetreten. Daneben ist in einzelnen Studien an der Ratte auch noch ohne histopathologisches Korrelat eine Organgewichtserhöhung der Nebennieren und der Milz genannt worden. Veränderungen klinisch-chemischer und hämatologischer Parameter bei Ratte und Hund (u. a. reduzierte Glukose- und Laktatspiegel sowie Erythrozytenzahlen und/oder Hämoglobin- und Hämatokritwerte, erhöhte Aktivitäten der

Laktatdehydrogenase, der alkalischen Phosphatase, der Alanin- sowie der Aspartataminotransferase, reduzierte Eiweißgehalte), die zum Teil bereits in den untersten geprüften Dosisgruppen festgestellt worden sind, haben sich in Recovery-Gruppen als reversibel erwiesen. Als low observed effect level (LOEL) für die Ratte kann die in einer subchronischen Trinkwasserstudie unterste geprüfte Konzentration von 50 ppm (entsprechend 3,9 mg/kg Körpergewicht/Tag) betrachtet werden, bei der nur eine Reduzierung des Gesamteiweißgehaltes im Serum aufgetreten ist. Die Angabe eines no observed effect level (NOEL) bzw. no observed adverse effect level (NOAEL) für den Hund ist nach den vorliegenden subchronischen Studien nicht möglich, da selbst nach Applikation der untersten geprüften Dosis von 12,5 mg/kg Körpergewicht/Tag bei männlichen Tieren noch degenerative Veränderungen des ZNS und der Hoden festgestellt worden sind.

Die genmutagene Wirkung von Dichloressigsäure bzw. von Natriumdichloracetat ist in Salmonella/Mikrosomen-Testen an den Salmonella typhimurium-Stämmen TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1537, TA 1538 und/oder TA 2638, in Prüfungen an Escherichia coli WP2-Stämmen, im HPRT-Test an Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (V79) und im L5178Y/TK-Test an Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK^{+/-}-3.7.2C) in vitro geprüft worden. In der Mehrzahl der Untersuchungen hat sich weder ohne noch mit metabolischer Aktivierung ein Hinweis auf eine mutagene Wirkung ergeben. Mit dem Stamm TA 100 sind im Salmonella/Mikrosomen-Test, durchgeführt als Präinkubationstest und als für flüchtige Substanzen modifizierter Test, allerdings positive Befunde erhoben worden. Uneinheitlich ist die Wirkung im L5178Y/TK-Test. Während ein nach standardisiertem und validiertem Protokoll mit neutralisierter Dichloressigsäure einer Reinheit von $\geq 99,5$ % durchgeführter Test ein negatives Ergebnis erbracht hat, hat die Prüfung von nicht neutralisierter Dichloressigsäure unbekannter Reinheit ohne metabolische Aktivierung einen positiven Befund ergeben. In vitro-Prüfungen hinsichtlich einer chromosomenaberrativen Wirkung mit Natriumdichloracetat (Reinheit $\geq 99,5$ %) an CHO-Zellen des chinesischen Hamsters und von nicht neutralisierter Dichloressigsäure (Reinheit 99,5 %) an V79-Zellen des chinesischen Hamsters haben weder ohne noch mit metabolischer Aktivierung einen Hinweis auf eine chromosomen-schädigende Wirkung der Verbindungen erbracht. An CHL-Zellen des chinesischen Hamsters und an Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK^{+/-}-3.7.2C) ohne metabolische Aktivierung durchgeführte Chromosomenaberrations-

teste mit nicht neutralisierter Dichloressigsäure unbekannter Reinheit sind dagegen positiv gewesen. Weder im in vitro-Mikronukleustest an Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK⁺-3.7.2C) noch im in vivo-Mikronukleustest an der CR:CD-Ratte mit dreimaliger intravenöser Applikation von bis zu 1100 mg/kg Körpergewicht und an der Swiss-Webster-Maus mit zweimaliger oraler Applikation von bis zu 4500 mg/kg Körpergewicht hat sich eine chromosomenschädigende Wirkung von Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat gezeigt. Inkonstant sind die Ergebnisse von Mikronukleustesten an der männlichen B6C3F1-Maus mit Befundung der Erythrozyten des peripheren Blutes gewesen. In der Testreihe wurde Trinkwasser (mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,4 eingestellt) mit 0,5, 1, 2 bzw. 3,5 g Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %)/l über bis zu 31 Wochen verabreicht, was in der oberen Dosisgruppe zu einzelnen Befundungsterminen einen Anstieg der mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten auf maximal 200 % der jeweiligen Kontrollen hervorgerufen hat. Die Autoren dieser Testreihe haben zur Diskussion gestellt, dass der geringe Anstieg der Mikrokernraten auch auf einer systemisch-toxischen Wirkung der applizierten Dosen beruhen könnte. Im in vitro-DNA-Repair-Test am DNA-reparaturprofizienten *Salmonella typhimurium*-Stamm hisGr sowie den reparaturdefizienten Stämmen TS24recA, TA 2322 polA und TA 1950 uvrB, der nur ohne metabolische Aktivierung durchgeführt worden ist, hat Dichloressigsäure keine DNA-Schäden induziert. In in vitro-Testsystemen, in denen die Induktion einer SOS-Antwort als Parameter für eine DNA-schädigende Wirkung dient (umu-Test an *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002, SOS-Chromotest an *Escherichia coli* PQ37 und Prophage lambda Induktionstest an *Escherichia coli* WP2 lambda), ist jeweils mit oder ohne metabolische Aktivierung ein schwach positiver Befund erhoben worden. Ebenfalls als schwach positiv ist Dichloressigsäure in einem in vitro-SCE-Test an Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO), in dem sich ohne metabolische Aktivierung in der sehr hohen Konzentration von 2000 µg mit NaOH neutralisierter Dichloressigsäure/ml ein geringer, aber konzentrationsabhängiger signifikanter Anstieg der SCE-Zahl/Zelle ergeben hat, bewertet worden. Ohne weitere Angaben ist berichtet worden, dass ein von den selben Autoren durchgeführter in vivo-SCE-Test an der Maus einen negativen Befund ergeben hat. Neutralisierte Dichloressigsäure hat in vitro weder in primären Ratten- und Mäusehepatozyten noch in Humanlymphoblasten (CCRF-CEM-Zellen) im alkalischen Elutionstest ("alkaline unwinding assay") DNA-Einzelstrangbrüche induziert. Positive Befunde einer Ar-

beitsgruppe im in vivo-alkalischen Elutionstest an Ratte und Maus konnten von einer anderen Arbeitsgruppe, obwohl diese beide Spezies sogar mit höheren Dosierungen behandelt hat, nicht reproduziert werden. Im modifizierten alkalischen Elutionstest („alkaline single cell gel electrophoresis assay“) mit subakuter oraler Applikation haben sich bei der Analyse der Leukozyten-DNA weder Hinweise auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen oder alkalilabilen Läsionen noch auf unvollständige DNA-Reparaturen ergeben. Da die DNA in diesem Test insgesamt langsamer im elektrischen Feld gewandert ist, haben die Autoren eine Bildung von Crosslinks vermutet. Die nach subakuter Applikation bei der Maus festgestellten Spermienkopfanomalien und die Aspermie in den Nebenhoden sind nach Meinung der Autoren der Studie eher auf unspezifisch toxische Wirkungen der Verbindung auf die Hoden zurückzuführen und nicht auf eine gentoxische Wirkung auf die Keimzellen. In einem Versuch an transgenen, ein Escherichia coli lacI-Gen tragenden männlichen Big-Blue-B6C3F1-Mäusen ist eine leichte Erhöhung der Mutationsfrequenzen gemessen worden. Insgesamt scheinen Dichloressigsäure und Natriumdichloracetat höchstens ein schwaches gentoxisches Potenzial zu besitzen.

Dichloressigsäure ist ein Hepatokanzerogen. Die hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure ist in einer Vielzahl von Einzelstudien an der männlichen und der weiblichen B6C3F1-Maus und der männlichen F344-Ratte untersucht worden. Dichloressigsäure, durchwegs neutralisiert mit NaOH - also als Natriumsalz - mit dem Trinkwasser appliziert, induziert dosisabhängig und in Abhängigkeit von der Applikationsdauer Foci veränderter Leberzellen, hyperplastische Knoten, Adenome und Karzinome. In Initiations-Promotionstesten an weiblichen B6C3F1-Mäusen wirkt Dichloressigsäure als Tumorpromotor, was sich gegenüber Versuchen ohne vorherige Initiation in niedrigeren wirksamen Dosen und höheren Tumorinzidenzen und/oder höherer Malignität der Tumoren bei gleicher applizierter Dosis ausdrückt. Wird die Applikation einer karzinominduzierenden Dichloressigsäure-Dosis in einem Stadium, in dem noch keine Karzinome, sondern nur hyperplastische Knoten und Adenome festzustellen sind, beendet (nach 31 Wochen), bilden sich die hyperplastischen Knoten und Adenome bei der weiblichen B6C3F1-Maus zurück (Nachbeobachtungsdauer 21 Wochen). Die no observed effect level (NOEL) für die hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure betragen bei Applikation im Trinkwasser über 100 bzw. 103 Wochen für die männliche F344-Ratte 0,05 g/l (ca. 3,6 mg/kg

Körpergewicht/Tag) sowie über 104 Wochen für die weibliche B6C3F1-Maus 0,5 g/l (ca. 94 mg/kg Körpergewicht/Tag). Für die männliche B6C3F1-Maus liegt der NOEL bei Applikation über 100 Wochen unter 0,05 g/l (ca. 8 mg/kg Körpergewicht/Tag) und bei Applikation über 75 Wochen bei 0,5 g/l (ca. 77 mg/kg Körpergewicht/Tag). Obwohl vielfach untersucht, ist der Mechanismus, über den sich die hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure entfaltet, bisher nicht vollständig aufgeklärt worden. Peroxidative Vorgänge - gemessen wurden Lipidperoxidation und Peroxisomenproliferation -, die über eine oxidative Zellschädigung mit anschließender reparativer Hyperplasie zur klonalen Expansion initiiert Zellen führen können, sind erst in deutlich höheren Dosisbereichen als die hepatokanzerogene Wirkung festgestellt worden und haben nicht mit den neoplastischen Leberveränderungen korreliert. Dichloressigsäure kann sogar eine sehr ausgeprägte Mitosehemmung in den Hepatozyten induzieren. Die Befunde, inwieweit genotoxische Vorgänge an der hepatokanzerogenen Wirkung beteiligt sind, sind nicht eindeutig. In der Mehrzahl der mechanistischen Studien ist man allerdings davon ausgegangen, dass Dichloressigsäure keine bzw., wenn überhaupt, nur eine schwache genotoxische Wirkung entfaltet. Eine Aktivierung von K-ras- und H-ras-Protoonkogenen oder Hemmung von Tumorsuppressorgenen scheint nach den vorliegenden Befunden aus Sequenzanalysen Polymerase-Kettenreaktion-amplifizierter DNA bzw. RNA als Voraussetzung der hepatokanzerogenen Wirkung nicht erforderlich zu sein. Jüngste Untersuchungen deuten darauf hin, dass spontan initiierte Zellen aufgrund von zytotoxischen Wirkungen der Dichloressigsäure einen Wachstumsvorteil haben, wodurch die klonale Expansion dieser Zellen und letztlich die Entstehung von Adenomen und Karzinomen begünstigt wird. Nach Applikation von Dichloressigsäure in tumorigenen und subtumorigenen Dosierungen ist eine Hemmung der interzellulären Kommunikation (gap junction), der Apoptose und der Mitose gemessen worden. Meist ist in den Studien hinsichtlich einer kanzerogenen Wirkung von Dichloressigsäure ausschließlich die Leber befundet worden. In den Studien, in denen eine vollständige Befundung vorgenommen worden ist, haben sich keine Hinweise auf weitere Tumorlokalisationen ergeben. In diesen Studien ist Trinkwasser mit bis zu 1,6 g Dichloressigsäure/l (ca. 139 mg/kg Körpergewicht/Tag) über 100 bzw. 103 Wochen männlichen F344-Ratten und mit 0,5 g/l (ca. 88 mg/kg Körpergewicht/Tag, einzige geprüfte Dosis) bzw. bis zu 3,5 g/l (ca. 429 mg/kg Körpergewicht/Tag) über 104 bzw. 100 Wochen männlichen B6C3F1-Mäusen verabreicht worden.

Dichloressigsäure wirkt in maternaltoxischen Dosen bei der Long-Evans-Ratte embryotoxisch und teratogen, wobei es ab 140 mg/kg Körpergewicht dosisabhängig zu Missbildungen des kardiovaskulären Systems, vorwiegend in Form von intraventrikulären Septumdefekten, und ab 1400 mg/kg Körpergewicht dosisabhängig zu Missbildungen des Urogenitalsystems (Hydronephrose) kommt. Der no observed adverse effect level (NOAEL) für die teratogene Wirkung hat bei oraler Applikation vom 6. bis zum 15. Gestationstag für die Long-Evans-Ratte in dieser Studie 14 mg/kg Körpergewicht/Tag betragen. Bei männlichen Long-Evans-Ratten führt Natriumdichloracetat bei 10-wöchiger oraler Applikation bis herab zu der niedrigsten Dosis von 31,25 mg/kg Körpergewicht/Tag zur Gewichtsverminderung von Präputialdrüsen und Nebenhoden bei gleichzeitiger Körpergewichtsretardierung ab dieser Dosis, ab 62,5 mg/kg Körpergewicht zusätzlich zur Verminderung der Menge, der Motilität und des Anteils an intakten Spermien und zur Verzögerung der Spermiogenese sowie im Verpaarungsversuch mit unbehandelten Weibchen bei 125 mg/kg Körpergewicht (höchste geprüfte Dosis) zur Beeinträchtigung der Fertilität in Form einer Verminderung der Anzahl der trächtigen Weibchen und der Implantate/Weibchen. Bei höheren bzw. über einen längeren Zeitraum vorgenommenen Dosierungen kommt es in subchronischen Studien bei Ratte und Hund zu degenerativen Hodenveränderungen mit Verminderung der Motilität und der Menge der Spermien bis zur Aspermie. Dosisabhängige Hodenschäden, gekennzeichnet durch eine makroskopische Verkleinerung des Hodens, degenerative Veränderungen des Keimepithels mit Riesenzellbildung, vergrößerte Sertoli-Zellen, atrophische Samenkanälchen und das Fehlen von Spermatogonien bzw. Spermien in den Hoden und den Nebenhoden, treten beim Hund, bei dem es auch noch zu einer Atrophie der Prostata kommt, ebenfalls schon nach subchronischer Gabe von nur 12,5 mg/kg Körpergewicht/Tag und bei der Ratte erst ab einer Dosis von 500 mg/kg Körpergewicht (Schlundsondenapplikation) auf.

Die Befundung immunologischer Parameter (Antikörperbildung, verzögerte Hypersensitivität, Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen, Produktion von Prostaglandin PGE₂ und Interleukin IL₂) im Rahmen einer subchronischen Trinkwasserstudie an der Sprague-Dawley-Ratte hat keinen Hinweis auf eine schädigende Wirkung von Dichloressigsäure auf das Immunsystem ergeben.

Wie bereits beschrieben, führt die subchronische Aufnahme von Dichloressigsäure bei Ratte und Hund zu degenerativen Veränderungen des ZNS

mit korrespondierenden neurologischen Ausfallerscheinungen. In speziellen Untersuchungen zur Neurotoxizität an Ratten ist es bereits nach akuter Schlundsondenapplikation von 300 mg/kg Körpergewicht zu einer reversiblen Verminderung der Griffstärke der Hinterextremitäten, einem charakteristischen Symptom der neurotoxischen Wirkung von Dichloressigsäure, gekommen. Die subchronische und die chronische Applikation von Dichloressigsäure mit dem Trinkwasser in diesen Neurotoxizitätsstudien hat in allen Teilstudien bis in den untersten geprüften Dosisbereich (ca. 16 mg/kg Körpergewicht/Tag über 12 Wochen bzw. 137 mg/kg Körpergewicht/Tag über 2 Jahre) zu neurologischen Veränderungen geführt, die sich insbesondere in einer Beeinträchtigung des Ganges und einer Schwäche der Hinterextremitäten geäußert haben. Als weitere Befunde haben sich eine reduzierte Griffstärke der Vorder- und Hinterextremitäten, Haltungsstörungen, erhöhte Extremitätenspreizung bei einem Fall aus 30 cm Höhe, Beeinträchtigung bzw. Ausfall des Stellreflexes und des Pupillenreflexes sowie leichter Tremor gezeigt. Die Inzidenz und die Intensität der einzelnen Veränderungen haben mit der Dosishöhe und der Behandlungsdauer korreliert. Neurohistopathologische Befunde haben gezeigt, dass ein sehr eng begrenzter Bereich des Rückenmarks pathologische Veränderungen aufgewiesen hat: Im Bereich des Fasciculus gracilis der Hinterstrangbahn des grauen Rückenmarks haben eine ausgeprägte Gliosis mit Verlust der myelinisierten Axone und große granuläre Strukturen bestanden. Das periphere Nervensystem hat keine pathologischen Veränderungen aufgewiesen und im Bereich des Gehirns ist auch keine Vakuolisierung festzustellen gewesen. Wie sich bei Tieren, die nach einer 3-monatigen Applikation von 172 mg/kg Körpergewicht/Tag 14 Wochen bzw. nach einer 6-monatigen Applikation von 235 mg/kg Körpergewicht/Tag 18 Monate nachbeobachtet worden sind, gezeigt hat, sind die neurologischen Veränderungen nur sehr langsam und auch nicht vollständig reversibel gewesen. Ein no observed effect level (NOEL) für die Induktion von neurologischen Veränderungen bei Ratten kann anhand dieser Studien nicht angegeben werden, da auch noch die unterste geprüfte Dosis von nur 16 mg/kg Körpergewicht/Tag, die 12 Wochen lang mit dem Trinkwasser appliziert worden ist, pathologische Veränderungen induziert hat.

Dichloressigsäure inhibiert die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase und greift damit in einen zentralen Stoffwechselmechanismus, der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A, ein. Da sowohl Pyruvat als

auch Acetyl-Coenzym A zentrale Stoffwechselprodukte bzw. -substrate des Kohlenhydrat-, des Fett- und des Eiweißstoffwechsels sind, beeinflusst Dichloressigsäure über die Hemmung der Pyruvat-Decarboxylase-Kinase zahlreiche intermediäre Stoffwechselforgänge, worauf wohl eine Vielzahl der toxikodynamischen, aber auch die pharmakodynamischen Wirkungen der Verbindung, z. B. bei Hyperglykämie, bei Hypercholesterinämie, aber auch bei angeborener, erworbener, generalisierter oder lokal begrenzter metabolischer Azidose, zurückgeführt werden können. Zur Langzeittherapie ist Dichloressigsäure allerdings nicht geeignet. Die Erprobung von Natriumdichloracetat zur Langzeittherapie einer Hypercholesterinämie, bei der ein 21-jähriger Patient mit schwerer familiärer Hypercholesterinämie täglich oral 50 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht erhalten hatte, ist aufgrund der sich einstellenden schwerwiegenden neurologischen Nebenwirkungen nach 16 Wochen abgebrochen worden. Unter der Behandlung mit Natriumdichloracetat (50 mg/kg Körpergewicht/Tag) hat sich die Lipoprotein-Konzentration im Plasma zwar deutlich gesenkt, parallel hat sich nach 16 Wochen aber eine Polyneuropathie, die durch Schwäche der Fazial-, Finger- und unteren Extremitätenmuskulatur gekennzeichnet war, entwickelt, Veränderungen, die auch in subchronischen Studien beim Hund und der Ratte festgestellt worden sind. Außerdem sind die tiefen Sehnenreflexe abgeschwächt und die Nervenleitgeschwindigkeit vermindert gewesen. Die Probandenstudie ist aufgrund dieser gravierenden Nebenwirkungen abgebrochen und Dichloressigsäure als Langzeittherapeutikum als ungeeignet bewertet worden. Die Nebenwirkungen der Behandlung mit Natriumdichloracetat sind nach Abbruch der Applikation bei dem Probanden innerhalb von 6 Monaten weitestgehend reversibel gewesen. Auch bei einer 13-jährigen Patientin, die zur Behandlung einer Laktatazidose mit konsekutiver metabolischer Enzephalopathie über 24 Wochen mit durchschnittlich dreimal täglich 55,8 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht behandelt worden ist, haben sich vergleichbare neurologische Nebenwirkungen trotz gleichzeitiger Verabreichung von 100 mg Thiamin/Tag eingestellt. 6 Monate nach Behandlungsende sind die aufgetretenen Gangstörungen und die Beeinträchtigung der Nervenleitgeschwindigkeiten reversibel gewesen. Als Akuttherapeutikum zur Kompensation kurzzeitiger Entgleisungen des Säure-Basen-Haushaltes aufgrund einer lokal begrenzten akuten Sauerstoffunterversorgung ist Dichloressigsäure patentiert und wird klinisch weiterhin noch untersucht.

Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MAK-Kommission) hat Dichloressigsäure und ihr Natriumsalz in der MAK- und BAT-Werte-Liste 2005 auf Anregung der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie in den „Gelben Seiten“ zur Überprüfung der Krebs erzeugenden Wirkung aufgeführt.

2 Stoffname

2.1	Gebrauchsname	Dichloressigsäure Natriumdichloracetat
2.2	IUPAC-Name	Dichloressigsäure Natriumdichloracetat
2.3	CAS-Nr.	79-43-6 (Dichloressigsäure) 2156-56-1 (Natriumdichloracetat)
2.4	EINECS-Nr.	201-207-0 (Dichloressigsäure) 218-461-3 (Natriumdichloracetat)

3 Synonyme, Trivial- und Handelsnamen

Acetic acid, dichloro-
Dichloressigsäures Natrium
2,2-Dichloressigsäure (Natriumsalz)
 α,α -Dichloressigsäure (Natriumsalz)
Dichlorethansäure (Natriumsalz)
Dichloroacetic acid (Sodium salt)
2,2-Dichloroacetic acid (Sodium salt)
 α,α -Dichloroacetic acid (Sodium salt)
Dichloroethanoic acid (Sodium salt)
Sodium dichloroacetate

4 Struktur- und Summenformel

4.1	Strukturformel	$\text{Cl}_2\text{CH-COOH}$ (Dichloressigsäure) $\text{Cl}_2\text{CH-COONa}$ (Natriumdichloracetat)
4.2	Summenformel	$\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ (Dichloressigsäure) $\text{C}_2\text{HCl}_2\text{O}_2\text{Na}$ (Natriumdichloracetat)

5 Physikalisch-chemische Eigenschaften

5.1	Molekularmasse, g/mol	128,94 (Dichloressigsäure) 150,92 (Natriumdichloracetat)
5.2	Schmelzpunkt, °C	13,5 (Dichloressigsäure) (Koenig et al., 2001; Lide und Frederikse, 1996)
5.3	Siedepunkt, °C	192 (bei 1013 hPa; Dichloressigsäure) (Clariant, 2003; Koenig et al., 2001) 194 (Dichloressigsäure) (Lide und Frederikse, 1996)
5.4	Dampfdruck, hPa	0,19 (bei 20 °C; Dichloressigsäure) (Clariant, 2003) 1,9 (bei 20 °C; Dichloressigsäure) (Koenig et al., 2001)
5.5	Dichte, g/cm ³	1,5634 (bei 20 °C; Dichloressigsäure) (Lide und Frederikse, 1996) 1,564 (bei 20 °C; Dichloressigsäure) (Koenig et al., 2001) 1,56 - 1,573 (bei 20 °C; Dichloressigsäure) (Clariant, 2003)
5.6	Löslichkeit in Wasser	Dichloressigsäure und Natriumdichloracetat sind in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar (Clariant, 2003; Koenig et al., 2001; Lide und Frederikse, 1996)
5.7	Löslichkeit in organischen Lösemitteln	Dichloressigsäure ist in allen üblichen Lösemitteln löslich (Koenig et al., 2001) Dichloressigsäure ist mischbar mit Ethanol und Diethylether sowie löslich in Aceton (Lide und Frederikse, 1996)
5.8	Löslichkeit in Fett	Verteilungskoeffizient log P _{ow} : 0,942 (berechnet) (Clariant, 2003)
5.9	pH-Wert	0,64 (10-prozentige Lösung) (Gordon et al., 1998) 1,2 (129 g Dichloressigsäure/l) (Clariant, 2003)

5.10 Umrechnungsfaktor	1 ml/m ³ (ppm) \triangleq 5,26 mg/m ³
	1 mg/m ³ \triangleq ml/m ³ 0,19 (ppm)
	(Dichloressigsäure)
	1 ml/m ³ (ppm) \triangleq 6,16 mg/m ³
	1 mg/m ³ \triangleq ml/m ³ 0,16 (ppm)
	(Natriumdichloracetat)
	(bei 1013 hPa und 25 °C)

6 Herstellung und Verwendung

6.1 Herstellung

Durch Hydrolyse von Dichloressigsäurechlorid (Koenig et al., 2001).

6.2 Verwendung

Dichloressigsäure ist ein vielseitiges Zwischenprodukt, u. a. für die Herstellung von Glyoxalsäure; Verwendung als medizinisches Desinfektionsmittel und als Testreagenz für Analysen während der Produktion von Polyethylenterephthalat-Fasern (Koenig et al., 2001). Es wurde zur Behandlung verschiedener Stoffwechsellentgleisungen klinisch eingesetzt (Stacpoole, 1989; Stacpoole et al., 1998 a, b).

7 Experimentelle Befunde

7.1 Toxikokinetik und Metabolismus

Toxikokinetik und Metabolismus von Natriumdichloracetat wurden in einer Studie an F344-Ratten und B6C3F1-Mäusen untersucht. Die jeweils 2 bis 4 männlichen Tiere/Dosis, Spezies und Befundungsendpunkt erhielten einmal 5, 20 oder 100 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht als wässrige Lösung oral per Schlundsonde. Unabhängig von der Dosis wurden in einer Mischung aus [1,2-¹⁴C]-Natriumdichloracetat (> 99-prozentig, spezifische Aktivität 55 mCi/mmol) und unmarkiertem Natriumdichloracetat (mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellte Dichloressigsäure mit einer Reinheit > 99,0 %) jeweils 5 bis 20 μ Ci/Tier verabreicht. In Intervallen über insgesamt 48 Stunden wurde die Radioaktivität in den Erythrozyten, im Gesamtplasma

und in der proteinarmen Fraktion des Plasmas bestimmt. Die Ausscheidung der Radioaktivität im Urin, den Fäzes und der Atemluft wurde bei den Ratten über 48 Stunden und bei den Mäusen über 24 Stunden verfolgt. Die Bestimmung der Restaktivität im Körper bei Versuchsende führte aufgrund einer unzureichenden Probenaufarbeitung zu sehr stark schwankenden Werten und wurde daher nicht weiter ausgewertet. Die ermittelten toxikokinetischen Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengefasst:

Tabelle 1. Toxikokinetische Parameter von Natriumdichloracetat bei der F344-Ratte und der B6C3F1-Maus bei einmaliger oraler Applikation (Larson und Bull, 1992 a)			
Parameter	Spezies	20 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht	100 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht
C _{max} (nmol/ml)	Maus	4 ± 1	20 ± 0
	Ratte	15 ± 8	380 ± 2
AUC (nmol/ml/Stunde)	Maus	8 ± 2	30 ± 0
	Ratte	13 ± 4	750 ± 40
t _{1/2} (Stunde)	Maus	1,5	1,6
	Ratte	0,9	0,9
V _d (ml/kg)	Maus	34800	32500
	Ratte	2400	1000
Clearance (ml/kg/Stunde)	Maus	16000	14300
	Ratte	2900	820
Ausscheidung innerhalb 24 Stunden (Maus) bzw. 48 Stunden (Ratte; jeweils in % der applizierten Dosis):			
in der Atemluft (¹⁴ CO ₂)	Maus	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1
	Ratte	23,9 ± 1,5	29,3 ± 3,6
im Urin	Maus	28,2 ± 1,0	27,2 ± 2,0
	Ratte	23,4 ± 2,0	24,4 ± 0,4
in den Fäzes	Maus	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
	Ratte	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2
C _{max}	maximale Konzentration im Plasma		
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve		
t _{1/2}	Plasmaeliminationshalbwertszeit		
V _d	Verteilungsvolumen		

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, waren die Konzentrationen im Blut und die AUC-Werte bei den Ratten bei gleicher Dosierung deutlich höher als bei den Mäusen. Bei den Ratten stiegen diese Werte dosisüberproportional an, während bei den Mäusen ein dosisproportionaler Anstieg verzeichnet wurde. Bezüglich der Eliminationshalbwertszeiten waren die Unterschiede zwischen Ratten und Mäusen nicht signifikant. Verteilungsvolumen und Clea-

rance waren bei den Mäusen sehr viel höher als bei den Ratten und gaben im Gegensatz zu den Ratten keinen Hinweis auf eine Sättigung des Metabolismus im geprüften Konzentrationsbereich. Die Menge der im Plasma analysierten Metaboliten (nicht näher charakterisierte unchlorierte Säuren) war bei beiden Spezies in etwa dosisproportional und bei den Ratten insgesamt niedriger als bei den Mäusen. Die Ausscheidung der applizierten Radioaktivität erfolgte über die Atemluft, den Urin und die Fäzes. Die Ratten exhalierten als $^{14}\text{CO}_2$ dosisunabhängig 23,9 bis 29,3 % der applizierten Aktivität, die Mäuse nur 2,2 bis 2,4 %. Der überwiegende Anteil des $^{14}\text{CO}_2$ wurde von beiden Spezies bereits innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Applikation ausgeschieden. Weitere Metaboliten erschienen in der Atemluft nicht. Im Urin wurden bei den Mäusen 27,2 bis 28,2 % und bei den Ratten 23,4 bis 24,4 % der applizierten Radioaktivität analysiert. Die mit den Fäzes ausgeschiedenen Mengen betragen bei beiden Spezies nur 1,0 bis 1,4 % der applizierten Aktivität. Im Metabolitenmuster ergaben sich zwischen den Ratten und den Mäusen keine signifikanten Unterschiede. Bei beiden Spezies wurden im Urin geringe Mengen der unmetabolisierten Verbindung (1,0 bis 2,3 %), relativ hohe Mengen der unchlorierten Säuren Glykolsäure, Glyoxylsäure und Oxalsäure (in Summe 10,5 bis 18,4 %) sowie Thiodiessigsäure (6,3 bis 12,3 %), Spuren von Monochloressigsäure (0,3 % Nachweisgrenze) und weitere nicht identifizierte Metaboliten (0,1 bis 1,0 %) analysiert. Von den Autoren wurde diskutiert, dass Dichloressigsäure über mindestens zwei Zytochrom P450-abhängige Abbauewege, eine Hydroxylierung und eine reduktive Dechlorierung, metabolisiert wird. Die enzymatische Hydroxylierung führt nach spontaner Dehydrochlorierung und anschließender Hydrolyse des intermediär gebildeten Säurechlorides zu Oxalsäure. Durch die enzymatische reduktive Dechlorierung kommt es einerseits zur Bildung von Monochloressigsäure, die nach Glutathionkonjugation weiter zu Thiodiessigsäure umgesetzt wird, und andererseits über mehrere Zwischenschritte zur Bildung von Glykolsäure, die weiter zu Glyoxylsäure und diese wiederum zu Oxalsäure, CO_2 oder Glyzin verstoffwechselt wird. Den Befund, dass eine Stunde nach der Applikation 50 % und nach 3 Stunden 90 % der im Blut analysierten Radioaktivität in der Proteinfraction gebunden war, führten die Autoren aufgrund weiterer Studien ihrer Arbeitsgruppe (siehe Stevens et al., 1992; unten) auf die Bildung des Metaboliten Glyoxylsäure zurück, der über eine Transaminierung zur Aminosäure Glyzin und diese wiederum zur Aminosäure Serin metabolisiert wird. 24

Stunden nach der Applikation war in proteinfreiem Plasma keine Radioaktivität mehr nachweisbar (Bull et al., 1993; Larson und Bull, 1992 a, b).

In einer späteren Studie der Arbeitsgruppe wurde bei männlichen B6C3F1-Mäusen nach Applikation von [1,2-¹⁴C]-Dichloressigsäure in Mischung mit unmarkierter Dichloressigsäure (Reinheiten > 99 %, spezifische Aktivität 55 mCi/mmol, keine Angaben, ob die Verbindungen neutralisiert mit NaOH appliziert wurden) nochmals die Ausscheidung über 24 Stunden verfolgt und das Metabolitenmuster im Urin analysiert. Nach der grafischen Darstellung schieden die mit 100 mg/kg Körpergewicht bzw. mit Spuren (keine weiteren Angaben) oral per Schlundsonde behandelten Tiere ca. 45 bzw. 46 % der applizierten Radioaktivität als CO₂ mit der Atemluft, 20 bzw. 17 % mit dem Urin und 3 % mit den Fäzes aus. In den Karkassen fanden sich 24 Stunden nach der Applikation noch ca. 22 bzw. 28 % der verabreichten Radioaktivität. Im Urin wurden bei beiden Gruppen unmetabolisierte Dichloressigsäure (0,3 bzw. 0,18 %), Monochloressigsäure (0,15 bzw. 0,16 %), Glyoxylsäure (0,14 bzw. 0,11 %), Glykolsäure (5,3 bzw. 1,5 %), Oxalsäure (6,8 bzw. 5,63 %), Essigsäure (0,07 bzw. 0,23 %) und nicht identifizierte Verbindungen (7,36 bzw. 8,98 %) analysiert. Für die 100 mg/kg Körpergewicht-Gruppe wurde zusätzlich angegeben, dass im Urin 0,56 % der applizierten Radioaktivität als Thiodiglykolsäure erschienen, ein Metabolit, der in den Publikationen der vorangegangenen Studie (siehe oben; Bull et al., 1993; Larson und Bull, 1992 a, b) nicht genannt wurde. Den Sachverhalt, dass bei ansonsten vergleichbaren Befunden für den als CO₂ ausgeschiedenen Dosisanteil ein wesentlich höherer Wert als in der früheren Studie der Arbeitsgruppe analysiert wurde (45 bzw. 46 % gegenüber 2,2 bzw. 2,4 %), kommentierten die Autoren nicht (Xu et al., 1995).

Im 24-Stunden-Urin von Mäusen, die über 26 Tage Trinkwasser mit 2 g Dichloressigsäure/l erhalten hatten, wurden pro ml 0,74 mg Dichloressigsäure, 3,56 mg Glykolsäure, 0,46 mg Glyoxylsäure und 1,5 mg Oxalsäure analysiert (Narayanan et al., 1999).

Bei wiederholter Applikation untersuchte die Arbeitsgruppe um Xu et al. (1995; siehe oben) in einer Folgestudie die Toxikokinetik und den Metabolismus von Natriumdichloracetat an männlichen F344-Ratten, die über 14 Tage Trinkwasser mit 0,2 oder 2 g Dichloressigsäure/l (ca. 20 oder 114 mg/kg Körpergewicht/Tag, mit NaOH neutralisiert, Reinheit 99 %) erhielten. Danach wurde den Tieren über einen Zeitraum von 16 Stunden unversetz-

tes Trinkwasser angeboten; anschließend wurden ihnen einmalig 5, 20 oder 100 mg/kg Körpergewicht intravenös bzw. 100 mg/kg Körpergewicht oral per Schlundsonde verabreicht (Mischungen aus unmarkierter und [1,2-¹⁴C]-Dichloressigsäure, 8 bzw. 12 µCi/ml, ebenfalls mit NaOH neutralisiert) und die Tiere 24 Stunden nachbeobachtet. Die Kontrolltiere wurden ohne Vorbehandlung einmalig behandelt. Die ermittelten toxikokinetischen Parameter der intravenös mit 100 mg/kg Körpergewicht behandelten Gruppen sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2. Toxikokinetische Parameter von Dichloressigsäure bei der F344-Ratte bei einmaliger und wiederholter Applikation (Gonzalez-Leon et al., 1997 b)		
Parameter	100 mg/kg Körpergewicht intravenös ohne Vorbehandlung	100 mg/kg Körpergewicht intravenös nach 14-tägiger Gabe von 2 g/l Trinkwasser
AUC (µg/ml/Stunde)	433,3 ± 233,2	2406,0 ± 405,5
V _{ss} (ml/kg)	618,1 ± 318,7	581,5 ± 146,4
t _½ (Stunde)	2,4 ± 0,15	10,8 ± 2,0
CL _b (ml/kg/Stunde)	267,4 ± 104,8	42,7 ± 8,2
CL _r (ml/kg/Stunde)	2,9 ± 0,5	8,9 ± 3,3
CL _m (ml/kg/Stunde)	264,5 ± 103,3	33,8 ± 4,9
Ausscheidung (jeweils in % der applizierten Dosis innerhalb 24 Stunden)		
in der Atemluft (¹⁴ CO ₂)	57,4 ± 10,3	19,9 ± 3,7
im Urin	12,4 ± 7,3	38,0 ± 13,2
in den Fäzes	0,7 ± 0,2	2,2 ± 2,2
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve	
t _½	Bluteliminationshalbwertszeit	
V _{ss}	Verteilungsvolumen unter steady-state-Bedingungen	
CL _b	Gesamtkörper-Clearance	
CL _r	renale Clearance	
CL _m	metabolische Clearance	

Die 14-tägige Vorbehandlung mit 2 g/l Trinkwasser führte gegenüber der einmaligen Applikation zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration im Blut, der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, der Bluteliminationshalbwertszeit und der renalen Clearance. Das Verteilungsvolumen blieb nahezu gleich. Die Werte für die Elimination aus dem Gesamtkörper, die metabolische Elimination und die Menge der im Blut nachweisbaren Metaboliten waren stark reduziert. Das Metabolitenmuster war deutlich verändert. Gegenüber der einmaligen Applikation nahmen die Ausscheidung an ¹⁴CO₂ über die Atemluft sowie die renale Ausscheidung von Oxalsäure

ab, während insbesondere die renale Ausscheidung der unmetabolisierten Verbindung, aber auch die Mengen der Metaboliten Glykolsäure, Glyoxylsäure, Monochloressigsäure und Essigsäure im Urin gegenüber der einmaligen Applikation der entsprechenden Dosis zunahm. Soweit berichtet, wurden entsprechende Veränderungen des Metabolismus von Dichloressigsäure bei wiederholter Applikation in allen Dosisgruppen festgestellt, auch in den mit nur 0,2 g/l Trinkwasser vorbehandelten Gruppen. Die Autoren diskutierten, dass Dichloressigsäure am Metabolismus beteiligte Enzyme hemmt und dadurch eine autoinhibitorische Wirkung auf ihre Ausscheidung hat (Gonzalez-Leon und Bull, 1996; Gonzalez-Leon et al., 1997 a, b). Erste veröffentlichte Befunde zwischenzeitlich von der Arbeitsgruppe an B6C3F1-Mäusen mit wiederholter Applikation durchgeführter Studien deuteten ebenfalls auf eine Verlangsamung der Elimination hin. Die Konzentrationen im Blut waren nach Vorbehandlung deutlich erhöht. Die Ausscheidung in Form von CO₂ bei wiederholter Applikation im Vergleich zur einmaligen Applikation blieb bei der Maus allerdings unverändert (Gonzalez-Leon und Bull, 1996; Gonzalez-Leon et al., 1997 a; Schultz et al., 1999). Auch beim Menschen wurde im Rahmen der Erprobung der Verbindung als Therapeutikum eine verzögerte Ausscheidung der Verbindung bei wiederholter Applikation festgestellt (siehe auch Kapitel 8; Curry et al., 1991).

Auch bei der männlichen B6C3F1-Maus inhibierte Dichloressigsäure seinen eigenen Metabolismus. Mäuse, die über 2 Wochen mit Trinkwasser mit 2 g Dichloressigsäure/l behandelt worden waren, wiesen nach intravenöser oder oraler Bolusgabe von 20 oder 100 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht eine deutlich langsamere Elimination aus dem Blut auf als ausschließlich mit den Bolusgaben behandelte Tiere. Die Autoren erarbeiteten toxikokinetische Parameter, mit denen in einem Toxikokinetikmodell die AUCL-Werte (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve in der Leber) der in der Kanzerogenesestudie von DeAngelo et al. (1999; siehe auch Kapitel 7.7 - Langzeitstudien) mit 0 (Kontrollen), 0,05, 0,5, 1, 2, oder 3,5 g/l behandelten männlichen Mäuse abgeschätzt wurden. Mit einer Metabolismusrate (V_{maxc}) bei einmaliger Applikation von 40 mg/kg Körpergewicht/Stunde (Kontrollwert) und bei wiederholter Applikation von 8 mg/kg Körpergewicht/Stunde, einer Michaeliskonstanten (K_m) von 0,5 mg/l, einer Absorptionsrate (K_a) von 0,25/Stunde und einer Eliminationsrate (K_e) von 0,003/Stunde wurde mit Hilfe des Modells errechnet, dass die 100 Wochen behandelten Mäuse der Kanzerogenesestudie, von denen 0 (Kontrolle),

33, 48, 71, 95 bzw. 100 % Leberkarzinome entwickelten, AUCL-Werte von 0 (Kontrolle), 0,041, 0,72, 15,8, 417 bzw. 1064 mg x Stunde/l hatten (Barton et al., 1999).

Die Ausscheidung und den Metabolismus von [1-¹⁴C]-Dichloressigsäure (9,3 mCi/mmol) und [2-¹⁴C]-Dichloressigsäure (56 mCi/mmol) nach einmaliger oraler Applikation untersuchte eine weitere Arbeitsgruppe ebenfalls an der Fischer-344-Ratte und kam unabhängig von der oben referierten Studie (Bull et al., 1993; Larson und Bull, 1992 a, b) zu vergleichbaren Ergebnissen. Jeweils 4 bis 6 männliche Tiere erhielten die beiden Verbindungen (radiochemische Reinheit \geq 97 %) in Mischung mit unmarkierter Dichloressigsäure, die mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,6 eingestellt wurde, in Dosierungen von 282 mg/kg Körpergewicht oral per Schlundsonde (20 μ Ci/Tier). [2-¹⁴C]-Dichloressigsäure wurde zusätzlich in einer Dosierung von 28,2 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die Ausscheidung der Radioaktivität mit der Atemluft, dem Urin und den Fäzes wurde über 48 Stunden verfolgt und anschließend die Restaktivität in den Organen und der Karkasse bestimmt. Zwischen der Ausscheidung der [1-¹⁴C]- und der [2-¹⁴C]-markierten Verbindung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb von 48 Stunden wurden 28,8 bzw. 25,0 % der Aktivität als ¹⁴CO₂ mit der Atemluft, 33,3 bzw. 35,2 % mit dem Urin und 2,1 bzw. 2,0 % mit den Fäzes ausgeschieden, der überwiegende Teil davon innerhalb der ersten 8 Stunden nach der Applikation. Als Restaktivität im Körper wurden 20,8 bzw. 26,2 % der verabreichten Aktivität analysiert. Bei Applikation der um den Faktor 10 niedrigeren Dosis waren die Restaktivität im Körper (36,4 %) und die Elimination über die Atemwege (34,4 %) höher und die Ausscheidung mit dem Urin (12,7 %) und den Fäzes (0,8 %) geringer. Im Urin wurden an Ausscheidungsprodukten nach Gabe von 282 mg [1-¹⁴C]- bzw. [2-¹⁴C]-Dichloressigsäure/kg Körpergewicht unveränderte Dichloressigsäure (19,8 bzw. 21,1 %), Glyoxylsäure (1,36 bzw. 1,12 %), Glykolsäure (4,65 bzw. 6,60 %) und Oxalsäure (1,86 bzw. 2,34 %) analysiert. Nach Gabe von 28,2 mg [2-¹⁴C]-Dichloressigsäure/kg Körpergewicht war die im Urin ausgeschiedene Menge an unmetabolisierter Dichloressigsäure mit 0,62 % deutlich geringer. Die relative Ausscheidung der weiteren Metaboliten wich nur geringfügig gegenüber den Werten nach Applikation der hohen Dosierung ab (1,34 % Glyoxylsäure, 1,67 % Glykolsäure und 3,01 % Oxalsäure). Von den nach 48 Stunden im Körper verbliebenen 20,8 bis 36,4 % der applizierten Aktivität entfielen die größten Anteile auf die Leber (4,89 bis 7,87 %),

die Muskulatur (4,52 bis 9,86 %), die Haut (3,25 bis 4,46 %), das Blut (1,38 bis 2,59 %), den Darm (0,96 bis 1,69 %), die Nieren (0,29 bis 0,60 %) und das Fettgewebe (0,25 bis 0,7 %; Lin et al., 1993).

Nur als Abstract publiziert wurde, dass männliche Sprague-Dawley-Ratten, die einmal oral mit 50 mg Natriumdichloracetat + 360 μCi $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht behandelt worden waren, innerhalb von 24 Stunden mit der Atemluft 36,8 % der applizierten Radioaktivität als CO_2 und im Urin als Metaboliten und unmetabolisierte Verbindung 9,3 % (0,7 % unmetabolisierte Verbindung) ausschieden. Wurde diese Dosis zweimal innerhalb von 24 Stunden appliziert, fanden sich in der Atemluft 43,6 % und im Urin 15,2 % (3,3 % unmetabolisierte Verbindung) der applizierten Radioaktivität (keine weiteren Angaben; James et al., 1995).

Nach einer späteren Veröffentlichung der Autoren verändern sich Toxikokinetik und Metabolismus von Dichloressigsäure bei der Ratte nicht nur mit der Häufigkeit der Stoffaufnahme, sondern hängen auch noch vom Fütterungszustand und dem Alter der Tiere ab. 3 bis 4 junge (3 bis 4 Monate alt, 180 bis 265 g schwer) Sprague-Dawley-Ratten/Gruppe erhielten einmal oder zweimal, ohne oder nach vorheriger 18-stündiger Nahrungskarenz, 50 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht als wässrige Lösung oral per Schlundsonde. Alte Tiere (16 Monate alt, 580 bis 690 g schwer) wurden zweimal im gefütterten Zustand mit einer entsprechenden Dosis behandelt. Es wurden jeweils 280 bis 400 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ Körpergewicht in Mischungen aus [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Natriumdichloracetat oder [$1,2\text{-}^{14}\text{C}$]-Natriumdichloracetat (radiochemische Reinheit > 99 bzw. > 99,5 %) und unmarkiertem Natriumdichloracetat (> 99,8 %) 3 bis 4 Tieren/Gruppe verabreicht. Die Ausscheidung der Radioaktivität im Urin, den Fäzes und der Atemluft wurde über 24 Stunden nach der einmaligen bzw. nach der letzten Applikation verfolgt und anschließend die Restaktivität im Blut, in den Organen und in der Karkasse bestimmt. Eine Gruppe von jungen nüchternen Ratten wurde zur Bestimmung der Verteilung der Radioaktivität im Körper bereits eine Stunde nach der Applikation getötet. Zur Erfassung des Konzentrationsverlaufs im Plasma wurde bei einigen Tieren in Intervallen Blut über einen Jugularvenenkatheter entnommen. Die berichteten toxikokinetischen Parameter sind in der nachfolgenden [Tabelle 3](#) zusammengefasst:

Tabelle 3. Toxikokinetische Parameter von Dichloressigsäure bei jungen und alten, gefütterten und nüchternen Sprague-Dawley-Ratten nach ein- oder zweimaliger oraler Applikation (James et al., 1998)

	Einmalige Applikation von 50 mg/kg Körpergewicht			Zweimalige Applikation von 50 mg/kg Körpergewicht		
	Junge nüchterne Tiere	Junge nüchterne Tiere	Junge gefütterte Tiere	Junge nüchterne Tiere	Junge gefütterte Tiere	Alte gefütterte Tiere
Nachbeobachtung (Stunden)	1	24	24	24	24	24
Kenngroßen für den Konzentrationsverlauf im Plasma ¹						
t _½ Res (Stunden)	n.b.	0,37 ± 0,03		1,45 ± 0,64		1,30 ± 0,69
V _d (l/kg)	n.b.	0,68 ± 0,07		0,39 ± 0,14		0,14 ± 0,02
AUC (mg x Stunde/l)	n.b.	11,72 ± 1,68		240,80 ± 75,4 ²		1509 ± 248 ³
C _{max} (µg/ml)	n.b.	10,19 ± 1,87		27,22 ± 5,54 ²		121,2 ± 20,4 ³
t C _{max} (Stunden)	n.b.	0,27 ± 0,04		1,13 ± 0,46		2,09 ± 0,96
t _½ El (Stunden)	n.b.	0,11 ± 0,02		5,38 ± 0,76 ²		9,72 ± 0,97 ³
t _½ α El (Stunden)	n.b.	n.b.		0,16 ± 0,04		0,22 ± 0,05
Ausscheidung (jeweils in % der applizierten Dosis)						
in der Atemluft (¹⁴ CO ₂)	6,1 ± 0,5	37,2 ± 1,05 ⁴	25,5 ± 1,7	43,6 ± 3,0 ⁴	19,8 ± 2,9	n.b.
im Urin	n.b.	9,8 ± 0,67	12,3 ± 6,5	15,4 ± 3,65	13,4 ± 5,7	28,0 ± 11,41 ³
mit den Fäzes	n.b.	1,39 ± 0,97	n.b.	4,57 ± 0,77	n.b.	5,01 ± 0,74
Unmetabolisierte Dichloressigsäure und ¹⁴ C-haltige Verbindungen im Urin (jeweils in % der applizierten Dosis)						
Dichloressigsäure	n.b.	0,66 ± 0,51	0,36 ± 0,36	3,21 ± 0,41 ²	0,85 ± 0,25 ²	20,2 ± 12,5 ³
Oxalsäure	n.b.	2,48 ± 0,49	2,57 ± 0,37	4,13 ± 3,04	2,51 ± 0,29	1,97 ± 0,93
Glyoxylsäure und weitere polare Metaboliten	n.b.	3,84 ± 0,82	2,61 ± 0,87	3,35 ± 1,91	2,69 ± 0,81	2,12 ± 0,57
Nicht näher aufgeklärtes Glyzinkonjugat	n.b.	0,88 ± 0,73	0,30 ± 0,29 ⁴	1,69 ± 0,55	0,23 ± 0,18 ⁴	0,62 ± 0,47
Hippursäure	n.b.	1,31 ± 0,74	5,66 ± 5,67 ⁴	0,99 ± 0,62	6,23 ± 5,26 ⁴	2,36 ± 1,1
Phenylacetylglizin	n.b.	0,45 ± 0,34	0,26 ± 0,29 ⁴	1,22 ± 0,61	0,06 ± 0,04 ⁴	0,07 ± 0,1
Restaktivität in den Organen und Geweben (jeweils in % der applizierten Dosis)						
Leber	16,3 ± 2,92	8,67 ± 1,12	6,19 ± 0,96	6,16 ± 0,57	7,01 ± 1,21	9,78 ± 4,65
Gastrointestinaltrakt	9,26 ± 2,13	4,2 ± 1,49	3,74 ± 0,39	2,40 ± 0,89	3,27 ± 0,28	7,97 ± 1,67
Muskelgewebe	22,5 ± 4,9	9,36 ± 3,55	11,9 ± 0,74	9,27 ± 2,5	12,8 ± 3,02	11,5 ± 1,92
Fettgewebe	4,58 ± 0,78	1,32 ± 0,4	3,87 ± 3,57	1,11 ± 0,29	2,39 ± 1,14	1,18 ± 0,18
Nieren	1,37 ± 0,34	0,65 ± 0,08	0,53 ± 0,05	0,63 ± 0,19	0,55 ± 0,09	0,85 ± 0,32
Restkörper	13,9 ± 1,9	8,38 ± 2,57	9,46 ± 2,37	8,46 ± 2,49	9,33 ± 1,54	7,63 ± 1,97
Gesamtwiederfindung (% der applizierten Dosis)						
	80,1 ± 6,4	80,9 ± 6,6	73,4 ± 9,3	91,6 ± 10,9	68,6 ± 1,8	71,3 ± 9,24
n.b.	nicht bestimmt					
t _½ Res	Resorptionshalbwertszeit					
V _d	Verteilungsvolumen					
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve					
C _{max}	maximale Plasmakonzentration					
t C _{max}	Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration					
t _½ El	Eliminationshalbwertszeit					
t _½ α El	Halbwertszeit der α-Phase der Elimination aus dem Plasma					
¹	da sich in Abhängigkeit vom Fütterungszustand keine Unterschiede in den Werten ergaben, wurden sie von den Autoren für beide Gruppen zusammengefasst					
²	signifikanter Unterschied zu den nur einmal behandelten Tieren					
³	signifikanter Unterschied zu den entsprechend behandelten jungen Tieren					
⁴	signifikanter Unterschied zu den Tieren, die entsprechend ohne vorherige 18-stündige Nahrungskarenz behandelt worden sind					

Tabelle 3 zeigt, dass sich, wie auch bereits in den oben dargestellten Studien (Barton et al., 1999; Gonzalez-Leon et al., 1997 a, b; Gonzalez-Leon und Bull, 1996; James et al., 1995; Schultz et al., 1999) festgestellt, die Elimination von Dichloressigsäure aus dem Plasma bei wiederholter Zufuhr des Stoffes verlangsamte. Auch dauerte sie bei alten Tieren deutlich länger als bei entsprechend behandelten jungen Tieren. Ältere Tiere schieden auch einen deutlich höheren Dosisanteil unmetabolisiert aus. Der Konzentrationsverlauf im Plasma wurde durch den Fütterungszustand der Tiere zum Zeitpunkt der Applikation nicht beeinflusst. Allerdings wurde Dichloressigsäure bei Tieren, denen der Stoff nach einer längeren Nahrungskarenz appliziert wurde, zu einem deutlich größeren Anteil zu $^{14}\text{CO}_2$ abgebaut als bei gefütterten Tieren. Die Autoren identifizierten Stoffe, die Folgeprodukte des Abbaus von Dichloressigsäure zu Glyzin sind, nämlich Phenylacetyl-glyzin und Hippursäure (Benzoylglyzin), die in den früheren Metabolismustudien noch nicht nachgewiesen worden waren (James et al., 1998).

Zur Untersuchung der Bindung an Blutproteine erhielten männliche F344-Ratten und B6C3F1-Mäuse einmal 5 mg neutralisierte [1,2- ^{14}C]-Dichloressigsäure/kg Körpergewicht oral per Schlundsonde (spezifische Aktivität der Sondierungs-lösungen 11,4 mCi/mg). Bei der Analyse der Radioaktivität wurden die Mengen an ^{14}C -markiertem Albumin und Hämoglobin in Relation zu den Mengen der ^{14}C -markierten Aminosäuren Serin und Glyzin gesetzt. Nach Diskussion der Autoren sind diese ^{14}C -markierten Aminosäuren auf die Bildung des Metaboliten Glyoxylsäure zurückzuführen, da im Anabolismus Glyoxylsäure über eine Transaminierung zur Aminosäure Glyzin und diese wiederum zur Aminosäure Serin umgesetzt wird. Ausgedrückt in pmol Äquivalente Dichloressigsäure/mg Protein wurden bei den Ratten 8 Stunden nach der Applikation Werte für Hämoglobin von 7 bzw. für Albumin von 690 analysiert, wobei 58 bzw. 67 % der Aktivität dabei auf Serin und Glyzin entfielen. Nach 120 Stunden betrug der Anteil für Hämoglobin 24 (61 % Glyzin und Serin) und nach 24 Stunden für Albumin 340 (48 % Glyzin und Serin). Bei der Maus waren im Vergleich zur Ratte die analysierten pmol Äquivalente Dichloressigsäure/mg Protein jeweils geringer und der Anteil der ^{14}C -markierten Aminosäuren höher, was die Autoren auf eine höhere Metabolismusrate bei der Maus zurückführten (Hämoglobin nach 8 Stunden 1 bzw. nach 120 Stunden 7, auf Glyzin und Serin entfallender Anteil unter der Nachweisgrenze bzw. 98 %; Albumin nach 4 Stunden 490 bzw. nach 24 Stunden 259, auf Glyzin und Serin entfallende Anteile 69 bzw. 74 %; Stevens et al., 1992).

Trächtige Long-Evans-Ratten erhielten am 12. Gestationstag 140 bis 3500 mg [1,2-¹⁴C]-Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht (keine Angaben zur Reinheit und zur Art der Applikation). Maximale Werte im Plasma der Muttertiere von 1 mg/ml wurden 2 bis 4 Stunden nach der Gabe erreicht. Danach fielen die Konzentrationen im Plasma sehr schnell. Carbonylkohlenstoff (C1) und Dichlormethylkohlenstoff (C2) der Dichloressigsäure waren bei den Muttertieren im Plasma und in der Leber in gleicher Menge nachweisbar. Es erfolgte also im Muttertier keine Spaltung der Verbindung. Die ¹⁴C-Spiegel im Embryonalgewebe überschritten nach 48 Stunden die Plasmaspiegel der Muttertiere und blieben unabhängig von der Dosis nahezu konstant, wobei C2-Fragmente überwogen (keine weiteren Angaben; Roth et al., 1991).

Je 6 männliche Neuseeland-Kaninchen erhielten eine intravenöse Injektion von 180 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht (keine Angabe zur Reinheit) bzw. Infusionen (20 Minuten) mit 50, 100, 200 oder 300 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht verabreicht. Nach der intravenösen Injektion betrug das Verteilungsvolumen (V_d) 0,28 l/kg, die Eliminationskonstante 1,09/Stunde, die Plasmahalbwertszeit 0,67 Stunden und die Clearance 0,31 l/kg/Stunde. Nach intravenöser Infusion über 20 Minuten wurden die maximalen Konzentrationen im Plasma am Ende der Infusionsperiode erreicht und waren nach Dosen von 50, 100 und 200 mg/kg Körpergewicht entsprechend parallel verschoben. Die kinetischen Parameter waren praktisch identisch (Verteilungsvolumen 0,41 bis 0,46 l/kg, Eliminationskonstante 0,96 bis 0,99/Stunde, Plasmahalbwertszeit 0,70 bis 0,72/Stunde, Clearance 0,40 bis 0,44 l/kg/Stunde). Nach Verabreichung von 300 mg/kg Körpergewicht war das Verteilungsvolumen (0,44 l/kg) nicht verändert, doch kam es zu einer signifikanten Verringerung der Eliminationskonstante (0,69/Stunde), zu einer Verlängerung der Halbwertszeit (1,01 Stunden) und zur Verringerung der Clearance (0,30 l/kg/Stunde). Dies ließ auf eine nicht lineare Kinetik höherer Dosen schließen. Nach parallel durchgeführten in vitro-Experimenten zur Bindung an Serumproteine wurden bei Konzentrationen von 10 bis 300 mg Natriumdichloracetat/l Serum 33,1 bis 37,2 % an Serumproteine gebunden, bei einer Konzentration von 600 mg/l nur 21,4 % (Gu et al., 1994).

Es liegen noch weitere Studien mit Bestimmung einzelner toxikokinetischer bzw. pharmakokinetischer Parameter von Dichloressigsäure vor. Diese Studien wurden überwiegend im Rahmen der Erforschung von Natriumdi-

chloracetat als Therapeutikum bei diversen Stoffwechsellagen (siehe Kapitel 7.11 - Pharmakodynamische Wirkungen von Dichloressigsäure) durchgeführt und in Review-Artikeln zusammenfassend dargestellt (Stacpoole et al., 1998 a, b). Die ermittelten pharmakokinetischen Parameter, die weitestgehend im Einklang mit den oben ausführlich dargestellten Toxikokinetikstudien stehen, sind in [Tabelle 4](#) im Anhang aufgeführt. Die Elimination von Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat war abhängig von der Spezies, dem Alter bzw. dem Gewicht der Versuchstiere und von der Dauer der Applikation (Lukas et al., 1980; Yan et al., 1997). Besonders auffällig war, wie auch in der oben ausführlich geschilderten Studie von Gonzalez-Leon et al. (1997 a, b), dass sich bei wiederholter Applikation die Plasmahalbwertszeit gegenüber der einmaligen Applikation einer entsprechenden Dosis deutlich erhöhte, ein Befund, der sich auch in klinischen Studien am Menschen bestätigte (siehe auch Kapitel 8). Bereits in einer früheren Review-Arbeit (Stacpoole, 1989) hatte der Autor diskutiert, dass Dichloressigsäure nach einer Dechlorierung unter Bildung von Glykolsäure und Glyoxylsäure durch verschiedene mikrosomale Enzymsysteme zu Oxalsäure, Glyzin und Kohlendioxid abgebaut wird. Als mögliche Abbaumechanismen wurden eine Zytochrom P450-abhängige Oxidation, die Bildung von freien Radikalen über enzymatische Oxidationen und Reduktionen, eine Konjugation an Glutathion und eine Dechlorierung über eine α -Lacton-Zwischenstufe diskutiert (Stacpoole, 1989; Stacpoole et al., 1998 a, b).

Untersuchungen in vitro

In in vitro-Untersuchungen mit verschiedenen aus männlichen B6C3F1-Mäusen und männlichen F344-Ratten gewonnenen subzellulären Fraktionen wurde Dichloressigsäure insbesondere durch Leber- und Lungengewebe sowie im geringeren Umfang auch durch Nieren-, Gastrointestinal- und Muskelgewebe abgebaut. Im lysierten Gesamtblut konnte kein Abbau von Dichloressigsäure gemessen werden. Der Abbau erfolgte überwiegend im Zytosol (K_M 0,28 mM, V_{max} 11,6 nmol/Minute/mg Protein) und war abhängig vom Glutathiongehalt, wobei eine Beteiligung der Glutathion-S-Transferase aber ausgeschlossen wurde. Eine Zugabe von $NADP^+$ und NADPH steigerte die Abbaurate, während NAD^+ und NADH ohne Wirkung blieben. Mitochondrien und Mikrosomen waren nur zu einem geringen Umfang an der Metabolisierung von Dichloressigsäure beteiligt und die Hem-

mung mikrosomaler Enzyme (Zytochrom P450 durch SKF 525-A und Kohlenmonoxid sowie Alkoholdehydrogenase durch Isoniazid und Pyrazol) hatte keinen Einfluss auf die Gesamtabbaurate von Dichloressigsäure (Lipscomb et al., 1995).

Eine NADPH-abhängige Oxidation oder UDPGA-abhängige Glukuronidierung von Dichloressigsäure konnte in vitro mit Phenobarbital-induzierten Mikrosomen männlicher Sprague-Dawley-Ratten nicht nachgewiesen werden. Wie auch von Lipscomb et al. (1995; siehe oben), gezeigt, war die Metabolisierung Glutathion-abhängig und erfolgte im Zytosol (James et al., 1995).

Spätere, von den zwei Arbeitsgruppen durchgeführte in vitro-Studien an Leberzytosol einmalig und wiederholt mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat behandelte F344- und Sprague-Dawley-Ratten zeigten eine Abhängigkeit der Bildung von Glykolsäure, Glyoxylsäure und Oxalsäure von den verfügbaren Glutathionmengen und wie in den in vivo-Studien (Gonzalez-Leon et al., 1997 a, b) eine verlangsamte Metabolisierung bei Verwendung von Zytosol wiederholt mit Dichloressigsäure behandelte Tiere (Cornett et al., 1997; Gonzalez-Leon et al., 1997 b; James et al., 1997).

Dichloressigsäure inhibierte in Rattenleberextrakten die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen A, AA, B, C, E und M (Dierickx, 1984).

In neueren Studien wurde gezeigt, dass die Glutathion-abhängige Oxidation von Dichloressigsäure zu Glyoxylsäure mit hoher Substratspezifität durch eine Glutathiontransferase der Zeta-Klasse katalysiert wird. Dies wurde in in vitro-Versuchen mit aus Rattenleberzytosol isolierter Glutathiontransferase Zeta und einem entsprechenden rekombinierten Humanenzym nachgewiesen. Beide aufgereinigten Enzyme hatten in etwa gleiche Aktivitäten. Bei Verwendung von Leberzytosol verschiedener Spezies wiesen die V_{\max} -Werte (Maximalgeschwindigkeit der katalysierten Reaktion) und die K_m -Werte (Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht) für die Umsetzung von Dichloressigsäure in Glyoxylsäure folgende Reihenfolge auf: Maus > Ratte >> Mensch. Von Rattenleberzytosol wurden ca. 20 bis 30 % der eingesetzten $[2-^{13}\text{C}]$ -Dichloressigsäure in $[2-^{13}\text{C}]$ -Glyoxylsäure umgesetzt. $[2-^{13}\text{C}]$ -Glyoxylsäure war der einzige durch die Glutathiontransferase Zeta aus $[2-^{13}\text{C}]$ -Dichloressigsäure gebildete stabile Metabolit. Für die Umsetzung war Glutathion erforderlich. Da das eingesetzte Glutathion aber we-

der verbraucht noch zu Glutathiondisulfid oxidiert wurde, vermuteten die Autoren einen Umsetzungsmechanismus, bei dem am Ende das Glutathion wieder quantitativ freigesetzt wird. Sie diskutierten, dass Glutathiontransferase Zeta vermutlich den Austausch eines Chlor-Atoms durch Glutathion unter Bildung von S-(α -Chlorcarboxymethyl)glutathion katalysiert, anschließend eine Hydrolyse dieses intermediären α -Chlorsulfides unter Bildung von S-(α -Hydroxycarboxymethyl)glutathion und Abspaltung des zweiten Chlor-Atoms erfolgt und aus diesem Hemithioacetal Glutathion wieder abgespalten und die Glyoxylsäure freigesetzt wird. Die Aktivität der Glutathiontransferase Zeta wurde durch Dichloressigsäure, nicht aber durch Glyoxylsäure relativ rasch gehemmt (Tong et al., 1998 a, b).

In einem Anschlussexperiment wurde die Hemmung der Glutathiontransferase Zeta durch Dichloressigsäure von der Arbeitsgruppe genauer untersucht. Die Umsetzung von Dichloressigsäure zu Glyoxylsäure erreichte in vitro in Versuchen mit Rattenleberzytosol bereits nach 10 Minuten ein Plateau. Da nur durch Zusatz von weiterem Zytosol, nicht aber durch Zusatz von Dichloressigsäure die Umsetzung wieder gesteigert werden konnte, schlossen die Autoren auf eine irreversible Inaktivierung der Glutathiontransferase. Würde das Plateau aufgrund eines Gleichgewichts zwischen Substrat und Produkt oder aufgrund einer kompetitiven Hemmung des Enzyms erreicht werden, müsste auch der Zusatz von weiterer Dichloressigsäure eine Steigerung der Umsetzung bewirken. Im Leberzytosol von mit 0,0 (Kontrolle), 0,15, 0,30 bzw. 0,60 mmol (ca. 18, 39 bzw. 77 mg) Dichloressigsäure/kg Körpergewicht einmalig intraperitoneal behandelten männlichen Fischer-344-Ratten war 24 Stunden nach der Applikation die Glutathiontransferase Zeta-Aktivität (Messung der Umsetzung von dem Zytosol zugesetzter Dichloressigsäure zu Glyoxylat) auf 79, 55 bzw. 24 % der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrolle gefallen. Einmalig intraperitoneal mit 0,30 mmol/kg Körpergewicht behandelte Ratten wiesen 12 Stunden nach der Applikation die stärkste Hemmung der Glutathiontransferase Zeta-Aktivität und die niedrigsten Werte des immunreaktiv gemessenen Glutathiontransferase Zeta-Proteins auf. Erst 10 bis 12 Tage nach der einmaligen Applikation erreichten die Werte für die Glutathiontransferase Zeta-Aktivität und die Menge des Glutathiontransferase Zeta-Proteins wieder ihre Ausgangswerte. Wurden 0,30 mmol Dichloressigsäure/kg Körpergewicht täglich intraperitoneal über 5 Tage appliziert, betrug im Vergleich zur Kontrolle die Glutathiontransferase Zeta-Aktivität nur 5 % und die Menge des

Glutathiontransferase Zeta-Proteins weniger als 10 %. Da nicht nur die Aktivität des Enzyms, sondern auch die Menge des korrespondierenden Proteins durch die Behandlung mit Dichloressigsäure abnahm, andererseits immunreaktiv ein im Molekulargewicht erhöhtes Enzym nachgewiesen werden konnte, vermuteten die Autoren eine irreversible kovalente Reaktion der Dichloressigsäure mit dem Enzym. Sie postulierten eine kovalente Anbindung des intermediären S-(α -Chlorcarboxymethyl)glutathions an einen nukleophilen Teil des Enzyms mit anschließendem Abbau des Reaktionsprodukts durch Proteolyse (Anderson et al., 1999).

Die von Anderson et al. (1999; siehe oben) postulierte irreversible kovalente Bindung eines Intermediärproduktes an die Glutathiontransferase Zeta wurde von der Arbeitsgruppe in einem in vitro-Folgeversuch mit dem rekombinierten Humanenzym und ^{14}C -Dichloressigsäure sowie ^{35}S -Glutathion experimentell bestätigt. Allerdings modifizierten sie das Reaktionsschema dahingehend, dass nicht S-(α -Chlorcarboxymethyl)glutathion, sondern erst ein aus dieser Verbindung unter Abspaltung des Chlor-Atoms gebildetes instabiles Zwischenprodukt (eine Carbonium-Sulfonium-Verbindung) entweder zu Glyoxylsäure und Glutathion hydrolysiert oder mit einem nukleophilen Rest des Enzyms, vermutlich einer Sulfhydryl-Gruppe, reagiert. Das inaktivierte Enzym enthielt irreversibel gebunden sowohl ^{14}C aus der Dichloressigsäure als auch ^{35}S aus dem Glutathion. Die Vermutung, dass die Bindung über einen nukleophilen Aminosäurerest des Enzyms erfolgt, wurde durch die Beobachtung gestützt, dass eine Zugabe von N-Acetyl-L-cystein zum Inkubationsmedium der Dichloressigsäure-induzierten Inaktivierung des Enzyms entgegenwirkt. Weiter wurde in Versuchen mit Leberzytosol verschiedener Spezies gezeigt, dass die Konstante für die Dichloressigsäure-abhängige Inaktivierung des Enzyms (k_{inact} (Minute $^{-1}$), Ratte > Maus >> Mensch) und die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$ (Minute), Ratte < Maus << Mensch) für diese Inaktivierung speziesabhängig sind, die erforderliche halbmaximale Dichloressigsäure-Konzentration (K_{inact} (μM)) aber keine Speziesabhängigkeit aufweist. Die Autoren diskutierten, dass die unterschiedliche Kinetik der Enzymhemmung bei den einzelnen Spezies vermutlich in einer unterschiedlichen Ausstattung mit den verschiedenen polymorphen Varianten des Enzyms begründet ist. Alle untersuchten polymorphen Varianten der rekombinierten Humanglutathiontransferase Zeta wurden durch Dichloressigsäure unter Anwesenheit von Glutathion inaktiviert, allerdings mit unterschiedlichen K_{inact} -Werten und Halbwertszeiten (Tzeng et al., 2000).

Glutathiontransferase Zeta ist identisch mit der Maleylacetoacetatisomerase, einem Schlüsselenzym im Abbau von Phenylalanin und Tyrosin zu Acetoacetyl-Coenzym A. Die Maleylacetoacetatisomerase katalysiert dabei die Isomerisierung von Maleylacetoacetat zu Fumarylacetoacetat und die Isomerisierung des Decarboxylierungsproduktes von Maleylacetoacetat, des Maleylacetons, zu Fumarylaceton. Im Leberzytosol von in vivo einmal oder über 5 Tage täglich mit 4, 12,5, 50, 200 oder 1000 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht behandelte männlicher Sprague-Dawley-Ratten (3 oder 4 Tiere/Gruppe) wurde die Aktivität der Glutathiontransferase Zeta gemessen. Die einmalige Applikation von > 50 mg/kg Körpergewicht führte zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Hemmung des Enzyms (Messung der Umsetzung von dem Zytosol zugesetzten ^{14}C -Natriumdichloracetat zu ^{14}C -Glyoxylat) um ca. 50 bis 98 %. Bei 5-maliger Behandlung war die Aktivität des Enzyms bereits in der niedrigsten Dosisgruppe von nur 4 mg/kg Körpergewicht signifikant gehemmt. Die Ausscheidung von Maleylaceton im Urin nahm dosisabhängig deutlich zu. In vitro reduzierte der Zusatz von Maleylaceton, einem physiologischen Substrat der Glutathiontransferase Zeta, in Humanleberzytosol und in Rattenleberzytosol die Metabolisierung von Dichloressigsäure. Wurde Leberzytosol mit Dichloressigsäure 30 Minuten vorinkubiert, anschließend zur Entfernung von ungebundener Dichloressigsäure über Nacht dialysiert, konnte bei nochmaliger Inkubation mit Dichloressigsäure nur im Rattenleberzytosol eine Hemmung der Glutathiontransferase Zeta um ca. 50 % festgestellt werden. Im Gegensatz zu den Befunden von Tzeng et al. (2000; siehe oben), die allerdings das Zytosol über bis zu 55 Minuten mit Dichloressigsäure vorinkubiert hatten, konnte hier keine reduzierte Aktivität der Glutathiontransferase Zeta 1-1 in Humanleberzytosol bei zweimaliger Inkubation mit Dichloressigsäure festgestellt werden. Als Halbwertszeit für die Inhibierung der Glutathiontransferase haben Tzeng et al. (2000) für Humanleberzytosol 22 Minuten, für Rattenleberzytosol dagegen nur 5,44 Minuten ermittelt. Auch die Diskussion der Autoren, dass nicht ein Intermediärprodukt der Dichloressigsäure, sondern die alkylierend wirkenden natürlichen Substrate Maleylacetoacetat und Maleylaceton die Glutathiontransferase Zeta hemmen, steht nicht im Einklang mit den Befunden von Tzeng et al. (2000; siehe oben), die in dem irreversibel inaktivierten Enzym sowohl ^{14}C aus ^{14}C -Dichloressigsäure als auch ^{35}S aus ^{35}S -Glutathion analysiert hatten (Cornett et al., 1999).

Der hepatische Abbau und die biliäre Ausscheidung von Dichloressigsäure wurden in einem Testsystem aus isolierten Lebern männlicher F344-Ratten genauer untersucht. Die Lebern wurden mit einer Perfusionslösung mit einer Anfangskonzentration an Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %) von 25 bzw. 250 μM 120 Minuten durchströmt. Mehr als 50 % der Ausgangsmenge an Dichloressigsäure wurden in der Perfusionslösung an Albumin gebunden. Nach 5 Minuten betrug die Menge an freier Dichloressigsäure in der Perfusionslösung 43 bzw. 47 % der Anfangskonzentration. Die Dichloressigsäure-Konzentration in der zirkulierenden Perfusionslösung nahm mit Halbwertszeiten von 7 bzw. 32 Minuten und Eliminationskonstanten ($K_{\text{EL}}(50)$) von 0,062 bzw. 0,022 Minute^{-1} rasch ab. Die deutlich niedrigere Eliminationskonstante in der oberen Dosisgruppe deutet nach Diskussion der Autoren auf eine Sättigung des Metabolismus hin. Am Ende des Experimentes war in der oberen Dosisgruppe die Konzentration an freier Dichloressigsäure in der Perfusionsflüssigkeit auf $7 \pm 5 \mu\text{M}$ abgefallen. In der unteren Dosisgruppe war die Dichloressigsäure bereits nach 60 Minuten vollständig aus der Perfusionslösung eliminiert. Mit der Galle wurden insgesamt 0,2 bzw. 0,05 % der applizierten Dichloressigsäure-Mengen ausgeschieden. Im Lebergewebe war zu Versuchsende keine Dichloressigsäure nachweisbar. Die Leberfunktion (Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität) war während des Versuchs nicht beeinträchtigt (Toxopeus und Frazier, 1998).

Dichloressigsäure als Metabolit von Trichlorethylen, Chloralhydrat und Trichloressigsäure

Die Frage, inwieweit Dichloressigsäure als Metabolit von Trichlorethylen, Tetrachlorethylen, Chloralhydrat oder auch Trichloressigsäure gebildet wird und damit auch zur toxischen, insbesondere kanzerogenen Wirkung dieser Verbindungen beiträgt, war in der Vergangenheit nicht eindeutig zu klären. In einigen Studien wurde Dichloressigsäure als wesentlicher Metabolit dieser Verbindungen analysiert, in anderen Studien war Dichloressigsäure dagegen nur in Spuren oder überhaupt nicht nachweisbar (siehe z. B. Bull et al., 1993; Davidson und Beliles, 1991; Dekant et al., 1984, 1986; Larson und Bull, 1992 a, b; Templin et al., 1993; Völkel et al., 1998; Xu et al., 1995). Neuere Metabolismusstudien belegen, dass Dichloressigsäure kein Hauptmetabolit dieser Verbindungen ist und, falls überhaupt, nur in Spuren gebildet wird. Experimentell wurde gezeigt, dass die in einigen Studien nachgewiesenen hohen Dichloressigsäure-Mengen Artefakte der Proben-

aufarbeitung waren (Barton et al., 1999; Fisher et al., 1998; Greenberg et al., 1999; Ketcha et al., 1996; Merdink et al., 1998, 1999).

7.2 Akute und subakute Toxizität

Akute Toxizität

Die Ergebnisse der Studien zur akuten Toxizität von Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat sind in [Tabelle 5](#) im Anhang zusammengestellt.

Mit LD₅₀-Werten für Ratte und Maus von deutlich über 2000 mg Dichloressigsäure, Natriumdichloracetat bzw. mit NaOH neutralisierter Dichloressigsäure/kg Körpergewicht bei oraler aber auch intravenöser Applikation wiesen die geprüften Stoffe eine sehr geringe akute Toxizität auf (siehe [Tabelle 5](#)). Selbst bei 5-maliger Applikation im Abstand von 24 Stunden war die Toxizität von Natriumdichloracetat mit LD₅₀-Werten von 4562 bis 6610 mg/kg Körpergewicht für die männliche B6C3F1-Maus und von 6610 bis 7500 mg/kg Körpergewicht für die weibliche B6C3F1-Maus sehr gering (Meier et al., 1997). Auch bei inhalativer Applikation war die akute Toxizität gering. Im Inhalations-Risiko-Test an der Ratte wirkte eine 8-stündige Exposition gegenüber einer bei Raumtemperatur angereicherten bzw. gesättigten Dichloressigsäure-Atmosphäre nicht letal (Smyth et al., 1951). Nicht im Einklang mit diesen Studien steht die einzige Prüfung mit dermalen Applikation am Kaninchen, in der eine LD₅₀ von ca. 798 mg (0,51 ml) Dichloressigsäure/kg Körpergewicht und damit eine gesundheitsschädliche Wirkung ermittelt worden ist (Smyth et al., 1951). Als einzige klinische Veränderung wurde im Rahmen der akuten Studien Narkose genannt (Woodard et al., 1941). In den vorliegenden Berichten zu akuten Studien finden sich keine Angaben zu Sektionsbefunden.

Subakute Toxizität

Männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten (5 bis 7 Tiere/Dosis und Geschlecht) erhielten 14 Tage lang 0 (Kontrollen), 0,03, 0,125, 0,50 oder 1,875 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser, was nach Angaben des Autors Dosierungen von 0 (Kontrollen), 10, 40, 150 oder 600 mg/kg Körpergewicht/Tag entsprach. 2 zusätzliche männliche Ratten erhielten 7,5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser. Es wurden nur Körpergewichtsentwicklung, Futter- und Trinkwasserverbrauch, Menge, Osmolalität, Ammonium- sowie

Hippursäuregehalt des Urins, Enzymaktivitäten in Leber und Nieren sowie die Glukosemenge im Plasma befundet. Die Befunde wurden statistisch ausgewertet, doch ist der Publikation nicht immer eindeutig zu entnehmen, ab welcher Dosis bzw. bei welchem Geschlecht einzelne Befunde signifikant waren. In den oberen Dosisgruppen kam es bei reduziertem Futter- und Wasserverbrauch zu einer Körpergewichtsabnahme bzw. Körpergewichtsretardierung, die allerdings nur bei den männlichen Tieren signifikant war. Eine signifikante Beeinflussung der Harnvolumina konnte nicht festgestellt werden, doch zeichnete sich in den hohen Dosisgruppen nach 7 und weniger stark nach 14 Tagen ein mit der verminderten Wasseraufnahme korrelierendes reduziertes Harnvolumen ab. Tendenziell bei beiden Geschlechtern und signifikant bei den männlichen Tieren war die Osmolalität des Urins umgekehrt proportional zum Harnvolumen erhöht, woraus der Autor schloss, dass das Konzentrationsvermögen der Nieren durch Dichloressigsäure nicht nachteilig beeinflusst wurde. Als ein Maß für die renale Adaptation an die erhöhte Säurebelastung wurde am 14. Tag die Ammoniakausscheidung untersucht. Sie war nur bei den männlichen Tieren in allen Dosisgruppen erhöht. Bei den weiblichen Ratten war korrelierend mit der Aktivität der Phosphat-abhängigen Glutaminase in den Nieren in den niedrigeren Konzentrationen ein Abfall und erst in den höheren Dosierungen ab 0,5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser ein Anstieg der Ammoniakausscheidung zu verzeichnen. Auf die Hippursäureausscheidung im Urin und die Aktivität der Phosphat-unabhängigen Glutaminase (Glutamyltranspeptidase) in den Nieren hatte die Verabreichung von Dichloressigsäure keinen Einfluss. Die nur bei den weiblichen Ratten gemessenen Laktat- und Pyruvatkonzentrationen in Leber und Nieren sowie die Glukosewerte im Plasma der männlichen und der weiblichen Tiere waren zwar in den oberen Dosisgruppen numerisch reduziert, die Unterschiede zu den Kontrolltieren waren jedoch nicht signifikant. Nach Diskussion des Autors sprechen diese Befunde dafür, dass die Nieren die erhöhte Säurebelastung durch Erhöhung der Ammoniakausscheidung und Aktivitätssteigerung der daran beteiligten Enzyme zu kompensieren versuchen (Davis, 1986 a, b).

Untersuchungen zur Lipidperoxidation und Peroxisomenproliferation bei akuter und subakuter Applikation

Zur Untersuchung der lipidperoxidativen Eigenschaften von Dichloressigsäure wurden männlichen B6C3F1-Mäusen und F344-Ratten (3 bis 5 Tie-

re/Dosis und Spezies) einmalig 100, 300 oder 1000 mg/kg Körpergewicht, formuliert in destilliertem Wasser und vermutlich mit NaOH neutralisiert, oral mittels Schlundsonde verabreicht. Als positive Kontrollen wurden Ratten und Mäuse einmalig mit 1600 mg Tetrachlorkohlenstoff/kg Körpergewicht intraperitoneal behandelt. Als Maß für die lipidperoxidative Wirkung wurden die homogenisierten Lebern auf ihren Gehalt an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS, in nmol/g Leber) 6 Stunden nach der Applikation, nach Vorversuchen der Zeitpunkt der maximalen TBARS-Bildung, untersucht. In den Dosisgruppen 300 und 1000 mg/kg Körpergewicht kam es bei den Mäusen zu einem signifikanten Anstieg an TBARS auf 129 bzw. 138 nmol/g gegenüber der mit Wasser behandelten Negativkontrolle (40 nmol/g). In der Positivkontrolle betrug der Wert 287 nmol/g. Bei den Ratten kam es nur in der 300 mg/kg Körpergewicht-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg an TBARS (120 nmol/g, Negativkontrolle 40 nmol/g, Positivkontrolle 152 nmol/g). Die Autoren diskutierten, dass die lipidperoxidative Wirkung von Dichloressigsäure, die sie auf intermediär gebildete dechlorierte Radikale und nicht auf eine intermediäre Bildung von Wasserstoffperoxid zurückführten, an der Bildung von Lipofuszin und der Entstehung von Leberknötchen bei männlichen Mäusen (siehe Kapitel 7.7 - Langzeitstudien; Bull et al., 1990, 1993; Washington State University, 1989) beteiligt sein könnte (Larson und Bull, 1992 a).

In einer Folgestudie sollte geprüft werden, ob die wiederholte Gabe von Dichloressigsäure im Trinkwasser die lipidperoxidative Wirkung akuter Dosen verändert. Dazu wurde männlichen B6C3F1-Mäusen 14 Tage lang Trinkwasser mit 1 g Dichloressigsäure (Reinheit ca. 99 %)/l (eingestellt mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0, tägliche Substanzaufnahme ca. 216 mg/kg Körpergewicht) und am 15. Tag per Schlundsonde einmal eine Challenge-Dosis von 300 mg Dichloracetat/kg Körpergewicht (ebenfalls mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt) verabreicht. Weitere Gruppen erhielten destilliertes Wasser (Negativkontrolle), nur über 14 Tage die Verbindung im Trinkwasser oder ohne Vorbehandlung einmal eine Dosis von 300 mg/kg Körpergewicht per Schlundsonde. Die Lebern der Mäuse wurden homogenisiert und die Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS, Indikator für Lipidperoxidation), die Aktivitäten der Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase und der Katalase (Marker für Peroxisomenproliferation), die Aktivität der Laurylsäurehydroxylase (Marker für die Aktivität von Zytochrom P450 4A), die Hydroxylierung von p-Nitrophenol (Marker für die Aktivität von Zyto-

chrom P450 2E1) sowie die Gesamtmenge von Zytochrom P450 und die Mengen einzelner Zytochrom P450-Isoenzyme untersucht. Die 14-tägige Verabreichung von Trinkwasser mit 1 g Dichloressigsäure/l hatte keinen Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung, die Futter- und Wasseraufnahme oder auf das relative Lebergewicht der Mäuse. Die akute Dosis erhöhte im Gegensatz zu einer früheren Studie der Arbeitsgruppe (siehe oben; Larson und Bull, 1992 a) die TBARS-Spiegel bei nicht vorbehandelten Tieren nur leicht (ca. 70 nmol/g Feuchtgewicht, Negativkontrolle ca. 50 nmol/g Feuchtgewicht, Unterschied nicht statistisch signifikant). Bei den vorbehandelten Tieren bewirkte die zusätzliche Schlundsondenapplikation von 300 mg/kg Körpergewicht im Vergleich zu der Negativkontrolle und der nur vorbehandelten Kontrolle eine signifikante Erhöhung des TBARS-Spiegels auf ca. 130 nmol/g Feuchtgewicht (vorbehandelte Kontrolle ca. 55 nmol/g Feuchtgewicht). Nach der wiederholten Verabreichung war die Aktivität der Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase nicht und die der Katalase signifikant 1,3fach gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Aktivität der Laurylsäurehydroxylase und die Hydroxylierung von p-Nitrophenol unterschieden sich nicht von den Kontrollwerten. Auch die Gesamtmenge an Zytochrom P450 sowie die Mengen der Zytochrom P450-Isoenzyme 4A, 4A1, 4A2, 4A3, 2E1, 1A1/2, 2B1/2 und 3A1 waren nicht verändert. Die Vorbehandlung mit Dichloressigsäure führte also zu einem signifikanten Anstieg der lipidperoxidativen Wirkung im Vergleich zur einmaligen Applikation der Challenge-Dosis, der nicht mit einer Erhöhung von Zytochrom P450 2E1, wie von den Autoren ursprünglich angenommen, oder eines der anderen untersuchten Zytochrom P450-Isoenzyme verknüpft war (Austin et al., 1995).

In einer anderen Studie an männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten waren 3 Stunden nach der letzten Applikation von Dichloressigsäure (3-mal innerhalb von 24 Stunden 2,45 mmol (ca. 3,16 g)/kg Körpergewicht per Schlundsonde appliziert) Menge und Aktivität des Zytochrom P450-Isoenzym 2E1 erhöht. Bei den Weibchen war außerdem noch die Gesamtmenge an Zytochrom P450 und die Aktivität der NADPH-abhängigen Zytochrom P450-Reduktase erhöht. Menge und Aktivität von Zytochrom P450 2B blieben bei beiden Geschlechtern unbeeinflusst und die Aktivität der Ethoxyresorufindealkylase war bei den Männchen reduziert (Yang et al., 1996).

Inwieweit es durch die Applikation von Dichloressigsäure neben einer Lipidperoxidation auch zu einer oxidativen Schädigung der DNA kommt, wur-

de von der Arbeitsgruppe in einer weiteren Studie an männlichen B6C3F1-Mäusen nach einmaliger oraler Applikation per Schlundsonde von 300 mg Dichloressigsäure (eingestellt auf einen pH-Wert von 7,0 mit NaOH)/kg Körpergewicht untersucht. Als Maß für die oxidative Schädigung der DNA wurde in der Leber die Menge an 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) bestimmt. 4 und 6 Stunden nach der Applikation lagen die 8-OHdG-Werte signifikant über der Kontrolle (maximal bei ca. 150 % des Normalwertes) und 8 Stunden nach der Applikation lagen sie wieder im Normalbereich. Ferner teilten die Autoren ohne weitere Angaben mit, dass es bei einer wiederholten Applikation von Dichloressigsäure in den Lebern von B6C3F1-Mäusen zu keinem Anstieg der 8-OHdG-Level kam. Die Autoren diskutierten einen möglichen Zusammenhang zwischen einer oxidativen Schädigung der DNA und der kanzerogenen Wirkung von Dichloressigsäure, da 8-OHdG Transversionen von Guanin → Thymin und Adenin → Cytosin verursachen kann (Austin et al., 1996).

Die peroxisomenproliferative Wirkung wurde an männlichen Sprague-Dawley-Ratten und B6C3F1-Mäusen untersucht, die Dichloressigsäure (Reinheit ≥ 99 %, eingestellt auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2 mit NaOH) 14 Tage lang im Trinkwasser in Konzentrationen von 8, 16 oder 39 mM (1, 3 oder 5 g/l) erhielten. Dies entsprach nach Angabe der Autoren täglichen Dosierungen von 166, 294 oder 666 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht für die Ratten und von 90, 166 oder 346 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht für die Mäuse. Kontrolltiere erhielten Trinkwasser mit 34 mM Natriumchlorid. Die Körpergewichtsentwicklung der Ratten war dosisabhängig retardiert, die der Mäuse blieb durch die Behandlung mit Dichloressigsäure unbeeinflusst. Das relative Lebergewicht war bei den Mäusen dosisabhängig erhöht, das der Ratten nicht. Bei beiden Spezies war die Aktivität der Carnitin-Acetyl-Coenzym A-Transferase in der Leber, einem Markerenzym für eine Peroxisomenproliferation, dosisabhängig erhöht. In der hohen Dosisgruppe lag die Aktivität bei den Ratten bei 1033 % und bei den Mäusen bei 450 % der Kontrollen. Die Aktivität eines weiteren Markerenzym einer Peroxisomenproliferation, der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase, war bei den Mäusen in der mittleren und hohen Dosisgruppe dosisabhängig erhöht und lag in der hohen Dosisgruppe bei 430 % der Kontrollen. Bei den Ratten war die Aktivität dieses Enzyms nur in der hohen Dosisgruppe signifikant auf 243 % der Kontrolle erhöht. Hinweise auf eine Peroxisomenproliferation gab auch das Auftreten des PP-A-

Proteins, eines Peroxisomenproliferation-assoziierten Proteins mit einem Molekulargewicht von 80000 kDa, bei beiden Spezies in der hohen Dosisgruppe. Quantitative morphometrische Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie ergaben in der hohen Dosisgruppe bei beiden Spezies eine erhöhte Anzahl von Peroxisomen/100 μm^3 Zytoplasma (Maus 30,77, Kontrolle 6,89; Ratte 16,75, Kontrolle 6,60). Nach Diskussion der Autoren erwies sich die Maus als die deutlich empfindlichere Spezies hinsichtlich der peroxisomenproliferativen Wirkung von Dichloressigsäure (DeAngelo et al., 1986, 1989).

Ohne weitere Angaben wurde mitgeteilt, dass bei Mäusen nach der Applikation von Dichloressigsäure eine hepatische Peroxisomenproliferation elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde (Tamirisa, 1997).

7.3 Haut- und Schleimhautverträglichkeit

Als Hautreizindex von Dichloressigsäure wurde ohne weitere Angaben ein Wert von 7 bei einer Skala von 1 bis 10 berichtet (Smyth et al., 1951). Einer früheren Publikation der Autoren zur Beurteilung der Hautreizteste ist zu entnehmen, dass bei einem Reizindex von 7 die Applikation der unverdünnten Verbindung Nekrosen an der Kaninchenhaut verursacht und bei Applikation einer 1-prozentigen Formulierung in Aceton keine stärkeren Reaktionen als Ödeme festgestellt werden (Smyth et al., 1949). Somit kann eine ätzende Wirkung von Dichloressigsäure an der Haut von Kaninchen angenommen werden.

In vitro wurde die Ätzwirkung von Dichloressigsäure in einem dreidimensionalen Modell der Humanhaut (Skin² ZK 1350TM), das aus neonatalen Humanhautzellen auf einem inerten Nylonnetz kultiviert wird und aus dermalen und epidermalen sowie dem Stratum corneum vergleichbaren Schichten besteht, geprüft. Die Testsubstanzen werden in diesem Modell für 10 Sekunden auf die epidermale Seite der Hautkulturen appliziert und als Kriterium für die Ätzwirkung der Prozentsatz der überlebenden Zellen nach 24 Stunden ermittelt. Dichloressigsäure in einer Konzentration von 36,1 % führte zu einer Überlebensrate der Zellen von $21,8 \pm 14,3$ % und wurde, basierend auf der Klassifizierung, dass bei Überlebensraten von weniger als 80 % eine ätzende Wirkung unterstellt wird, als ätzend bewertet (Liebsch et al., 1995).

Auch in einem weiteren in vitro-Testsystem, dem so genannten Corrositex-Test, mit dem Stoffe im Sinne der Verpackungsrichtlinie klassifiziert werden sollen, wurde Dichloressigsäure als ätzend (Verpackungsgruppe II) eingestuft. In dem Testsystem wird die Zeit erfasst, in der ein Stoff eine Proteinbeschichtete Zellulosemembran, von den Autoren als Biomembran bezeichnet, zerstört und dadurch im angrenzenden Medium erscheint, was zu einem Farbumschlag des zugesetzten pH-Wert-Indikators führt (Gordon et al., 1998).

Die Augenreizwirkung der Dichloressigsäure bei Kaninchen wurde ohne weitere Angaben in einer 10-teiligen Skala mit dem Wert 10 beurteilt (Smyth et al., 1951). Nach einer früheren Publikation der Autoren zur Testdurchführung und Testbewertung entspricht dies, dass 24 Stunden nach Applikation einer 1-prozentigen Lösung in Propylenglykol eine Corneatrübung von mehr als 50 % (nach Fluoresceinfärbung 88 bis 100 %) sowie ausgeprägte Schädigungen der Konjunktiven und der Iris festgestellt worden sind (Carpenter und Smyth, 1946). Somit ist eine stark ätzende Wirkung von Dichloressigsäure am Auge anzunehmen.

In einem alternativen Augenreiztest (HET-CAM-Test) wurde neben weiteren chlororganischen Verbindungen auch Dichloressigsäure geprüft. Die niedrigste reizende Konzentration von Dichloressigsäure betrug 100 mg/l Wasser (keine Angaben zur Reizwirkung höherer Konzentrationen). Der Test erfolgte an der Chorionallantoismembran, einem gut mit Blutgefäßen versorgten Gewebe von schleimhautähnlicher Konsistenz, von 9 Tage bebrüteten Hühnereiern. Die Testsubstanzen wurden für 60 Minuten auf die Membran aufgetragen. Als Reizeffekte wurden Hyperämie (Erweiterung der Gefäße), Lyse (Gefäße makroskopisch nicht mehr erkennbar), Hämorrhagie (Blutaustritt aus den Gefäßen) oder hyperämische Reaktion der Gefäße (Injektion bzw. verstärkte Zeichnung der Kapillaren) sowie die Koagulation von Eiweiß und von Blut befundet (Erdinger et al., 1997/98).

7.4 Sensibilisierende Wirkung

Keine Information vorhanden.

7.5 Subchronische und chronische Toxizität

Je 10 männliche und 10 weibliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten täglich über 13 Wochen 0 (Kontrollen), 125, 500 oder 2000 mg Natriumdichlorace-

tat (Reinheit 99,5 bis 100,7 %)/kg Körpergewicht als wässrige Lösung per Schlundsonde. In der Kontroll- und der hohen Dosisgruppe wurden je 5 weitere Tiere/Geschlecht für eine 4-wöchige Nachbeobachtungszeit mitgeführt. Studienumfang und -auswertung genügten weitestgehend den Anforderungen der OECD-Richtlinie Nr. 408. Von den mit 2000 mg/kg Körpergewicht behandelten Tieren verendeten 2 Männchen und 2 Weibchen. In allen Dosisgruppen war dosisabhängig bei verminderter Futteraufnahme die Körpergewichtsentwicklung retardiert. An klinischen Symptomen wurden in der oberen Dosisgruppe eine Paralyse der Hinterextremitäten und häufiges Urinieren beobachtet. Dosisabhängig in allen Dosisgruppen kam es zu einer leichten Verminderung der Erythrozytenzahlen und/oder Hämoglobin- und Hämatokritwerte sowie zu einer deutlichen Reduzierung der Glukose- und Laktat Spiegel im Blut. Des Weiteren waren im Blut bei den Weibchen ab 500 mg/kg Körpergewicht die Kreatininwerte erhöht und bei den Männchen ab der niedrigsten Dosis die Werte für Eisen reduziert, ab 500 mg/kg Körpergewicht die für Bilirubin erhöht und die der Triglyzeride reduziert sowie bei 2000 mg/kg Körpergewicht die für Kreatinin, Natrium sowie Kalium erhöht und die für Gesamtprotein und Kalzium reduziert. Die relativen Gewichte der Leber (beide Geschlechter) und der Nieren (weibliche Tiere) lagen dosisabhängig in allen Dosisgruppen, die der Nebennieren bei den männlichen Ratten ab 500 mg/kg Körpergewicht und bei den weiblichen Ratten in der hohen Dosisgruppe über denen der Kontrolltiere. Histopathologisch erwiesen sich das Gehirn und die Hoden als Hauptzielorgane. Die Veränderungen im Gehirn traten ab der untersten geprüften Dosis auf, betrafen ab der mittleren Dosis sämtliche Tiere und waren durch eine Vakuolisierung der markhaltigen Bereiche im Großhirn und in geringerem Ausmaß auch im Kleinhirn charakterisiert. Ischias- und Sehnerv waren ohne Befund. Degenerative Veränderungen des Keimepithels der Hoden wiesen in der mittleren Dosisgruppe 40 % der Männchen auf. In der oberen Dosisgruppe waren bei sämtlichen Männchen die Hoden makroskopisch verkleinert und wiesen histopathologisch degenerative Veränderungen im Keimepithel mit Riesenzellbildung auf. Weder die Hoden noch die Nebenhoden enthielten Spermatogonien bzw. Spermien. Während der Nachbeobachtungszeit waren die klinischen Symptome, die Körpergewichtsretardierung und die Veränderungen der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter reversibel, die histopathologischen Befunde bildeten sich nicht oder nur in geringem Umfang zurück (Katz et al., 1981). Da auch in der untersten geprüften Dosisgruppe von 125 mg Natriumdichloracetat/kg Kör-

pergewicht/Tag noch substanzbedingte Befunde bis hin zu histopathologischen Veränderungen des ZNS erhoben worden sind, kann ein no observed effect level (NOEL) anhand dieser Studie nicht abgeleitet werden.

Je 10 männliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten 90 Tage Trinkwasser mit 0 (Kontrollen), 50, 500 oder 5000 ppm Dichloressigsäure (Reinheit 99 %), eingestellt mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,5. Bezogen auf den Trinkwasserverbrauch nahmen die Tiere täglich 0 (Kontrollen), 3,9, 35,5 oder 345 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht auf. In den beiden oberen Dosisgruppen war die Trinkwasseraufnahme vermindert und die Körpergewichtsentwicklung retardiert. Die relativen Leber- und Nierengewichte waren in den beiden oberen Dosisgruppen und die relativen Milzgewichte in der oberen Dosisgruppe erhöht. Im Serum war dosisabhängig in allen Dosisgruppen der Gesamteiweißgehalt reduziert sowie in den beiden oberen Dosisgruppen die Aktivität der alkalischen Phosphatase und in der höchsten Dosisgruppe die der Alaninaminotransferase erhöht. In der 5000 ppm-Gruppe war in der Leber die peroxisomale β -Oxidation erhöht (Messung der ^{14}C -Palmitoyl-Coenzym A-Oxidation); Menge und Aktivität des Zytochrom P450 blieben unverändert. Anzeichen für eine Beeinflussung immunologischer Parameter (Antikörperbildung, verzögerte Hypersensitivität, Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen, Produktion von Prostaglandin PGE_2 und Interleukin IL_2) wurden nicht beobachtet. Hämatologische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Die Lebern der mit 5000 ppm behandelten Ratten waren makroskopisch vergrößert und wiesen histopathologisch fokale Herde von vergrößerten, stark Glykogen-haltigen Zellen auf. In den Nieren der Tiere der oberen Dosisgruppe wurden außerdem diffuse Degenerationen des Tubulusepithels und von Zellen der Glomeruli festgestellt. Weitere pathologische Veränderungen wurden bei den umfassenden histologischen Befundungen nicht gesehen. Die Autoren wiesen noch darauf hin, dass in einer weiteren von ihnen durchgeführten und bisher noch nicht publizierten Studie nach 6-monatiger Applikation von 500 und 5000 ppm im Trinkwasser wie in den oben bzw. unten beschriebenen Studien (Katz et al., 1981; Yount et al., 1982) ebenfalls eine Schwäche der Hinterbeine und eine Atrophie der Hoden aufgetreten sind (Mather et al., 1990). In der untersten geprüften Dosierung von 50 ppm im Trinkwasser (entsprechend 3,9 mg/kg Körpergewicht/Tag) war die Reduzierung des Gesamteiweißgehaltes im Serum der einzige beobachtete Befund (low observed effect level). Ein no observed effect level (NOEL) wurde somit in dieser Studie nicht gefunden.

6 männliche Wistar-Ratten erhielten 0,04 mol Natriumdichloracetat/kg Futter über einen Zeitraum von 12 Wochen. Bezogen auf den Futterverbrauch nahmen die Tiere am Studienbeginn 4 mmol/kg Körpergewicht/Tag und am Studienende 2,5 mmol/kg Körpergewicht/Tag, entsprechend ca. 604 bzw. 377 mg/kg Körpergewicht/Tag, auf. Eine ebenfalls aus 6 Tieren bestehende Kontrollgruppe erhielt das normale Futter. Die Körpergewichtsentwicklung der Ratten war bei signifikant verminderter Futteraufnahme retardiert. Ein Tier starb. Nach 2- bis 4-wöchiger Versuchsdauer entwickelten sich Schwäche der Hinterbeine und abnormaler Gang. Verbunden damit war eine Herabsetzung der Leitungsgeschwindigkeit und des Durchmessers des Nervus tibialis. Der Lipid- und der Proteingehalt des Ischiasnervs unterschieden sich nicht von den Werten der Kontrolltiere. Bei Versuchsende waren die relativen Organgewichte von Nebennieren, Gehirn, Nieren sowie Leber und im Plasma der Ketonkörper-Spiegel signifikant erhöht. Makroskopisch wurde eine Vergrößerung der Leber festgestellt. Histopathologisch wurden bei jeweils einer Ratte eine Hemmung der Spermio-genese und Degeneration der Keimzellen, eine erhöhte Hämosiderinablagerung in der Milz bzw. atrophische Muskelfasern gesehen (Yount et al., 1982).

5 männliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten 90 Tage lang Trinkwasser mit 80,5 mM (10,38 g/l) Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %), das mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 eingestellt worden war. Nach dem Trinkwasserverbrauch der Tiere entsprach dies einer täglichen Dosis von ca. 1100 mg/kg Körpergewicht, etwa $\frac{1}{4}$ der akuten LD₅₀. Die Behandlung bewirkte von Beginn an eine stark retardierte Körpergewichtsentwicklung. Am Versuchsende betrug die Körpergewichte nur 66 % der mit destilliertem Wasser behandelten Kontrollen. Die absoluten und die relativen Lebergewichte waren erhöht und die absoluten und die relativen Hodengewichte reduziert. Die histopathologische Untersuchung ergab Veränderungen in den Lungen, der Leber, den Testes und im Gehirn. In der Leber waren die Veränderungen vorwiegend in den periportal Dreiecken lokalisiert und durch Gallengangproliferation, Erweiterung der Portalvenen, Kollagenablagerungen, Ödem und vereinzelt entzündliche Veränderungen charakterisiert. Die Lungen wiesen perivaskuläre Entzündungsherde auf. In den Hoden wurden mäßig bis stark atrophische Samenkanälchen, die vergrößerte Sertoli-Zellen, vielkernige Riesenzellen, nur wenige Spermatozyten und keine reifen Spermien enthielten, und eine Hyperplasie der interstitiellen Zellen festgestellt. In weiten Gehirnbereichen und besonders im Vorder-

hirn, im Hirnstamm, im zervikalen Rückenmark und in den Basalganglien wurden fokale Vakuolisierung und Gliosis gesehen (Bhat et al., 1991).

Zu speziellen neurotoxikologischen Studien an Ratten der Stämme Fischer-344 und Long-Evans, die akut, subchronisch und chronisch in zahlreichen Teilstudien mit Dichloressigsäure per Schlundsonde oder Trinkwasser behandelt und in denen noch im untersten geprüften Dosisbereich von ca. 16 mg/kg Körpergewicht/Tag neurotoxische Effekte festgestellt worden sind, siehe Moser et al. (1999) im Kapitel 7.10.

Je 3 weibliche und 3 männliche Beagle-Hunde erhielten 0 (Kontrollen), 50, 75 oder 100 mg Natriumdichloracetat (Reinheit 99,5 bis 100,7 %)/kg Körpergewicht täglich über 13 Wochen in Gelatine kapseln. In der Kontroll- und der hohen Dosisgruppe wurde jeweils ein Tier/Geschlecht für eine 5-wöchige Nachbeobachtungszeit mitgeführt. Studienumfang und -auswertung genügen weitestgehend den Anforderungen der OECD-Richtlinie Nr. 409. In der 100 mg/kg Körpergewicht-Gruppe verendete ein männliches und in der 75 mg/kg Körpergewicht-Gruppe ein weibliches Tier. Dosisabhängig nahm in allen Dosisgruppen bei beiden Geschlechtern das Körpergewicht bei reduzierter Futteraufnahme ab. An klinischen Symptomen wurden ab 75 mg/kg Körpergewicht Erbrechen und in der hohen Dosisgruppe blutiger Stuhl und Paralyse der Hinterextremitäten festgestellt. Die ophthalmologische Untersuchung ergab in allen Dosisgruppen bei beiden Geschlechtern bilaterale Linsentrübungen, Hyperämie der Konjunktiven und oberflächliche Corneavaskularisation sowie Anzeichen einer Keratokonjunktivitis sicca. Die hämatologische Untersuchung zeigte bei beiden Geschlechtern in allen Dosisgruppen einen Abfall der Erythrozytenzahlen sowie der Hämoglobin- und Hämatokritwerte. Weiterhin waren die Glukose-, Laktat- und Pyruvat Spiegel im Blut bei allen behandelten Tieren deutlich und die Kalzium- und Kalium-Werte leicht erniedrigt. Die Urinanalyse war ohne Befund. Makroskopisch wurde bei allen mit Natriumdichloracetat behandelten Tieren eine Konsolidierung der Lungen festgestellt. Histopathologisch ergaben sich dosisabhängig in allen Dosisgruppen eine Vakuolisierung der markhaltigen Bereiche im Großhirn und im geringeren Ausmaß auch im Kleinhirn (Seh- und Ischiasnerv waren ohne Befund), eine Atrophie der Prostata und degenerative Veränderungen des Keimepithels der Hoden mit Riesenzellbildung und Vakuolisierung der Leydig-Zellen, zystische Hyperplasie der Gallenblasenschleimhaut und eine erhöhte Inzidenz an Hämosiderinablagerungen in den Kupffer'schen Sternzellen der Leber. Einige Tiere wiesen in den Lun-

gen einen Nematodenbefall mit den damit verbundenen entzündlichen Veränderungen auf. Die histopathologischen und die ophthalmologischen Befunde bildeten sich während der Nachbeobachtungsperiode nicht oder nur in geringem Umfang zurück (Katz et al., 1981). Da auch in der untersten geprüften Dosisgruppe von 50 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht/Tag noch substanzbedingte Veränderungen bis hin zu histopathologischen Veränderungen des ZNS, der Prostata, der Hoden, der Gallenblase und der Leber festgestellt worden sind, kann anhand dieser Studie kein no observed effect level (NOEL) abgeleitet werden. Die Autoren wiesen noch auf die Befunde einer von ihnen durchgeführten früheren Studie am Beagle-Hund mit intravenöser 1-monatiger Applikation von 10, 40 oder 100 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht/Tag, in der vergleichbare Veränderungen der hämatologischen Parameter und der Gallenblase, aber nicht die ophthalmologischen Veränderungen und auch nicht die histopathologischen Befunde an Gehirn, Prostata und Hoden festgestellt wurden, hin (keine weiteren Angaben; Katz et al., 1977).

In einem weiteren Versuch erhielten je 5 männliche und 5 weibliche Beagle-Hunde (Ausgangsgewicht einen Monat vor Applikationsbeginn 6,1 bis 13,6 kg, 4 Monate alt) 0 (Kontrollen), 12,5, 39,5 oder 72 mg Dichloressigsäure („Reagenz-Reinheit“, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt)/kg Körpergewicht in Gelatine kapseln täglich über 90 Tage. Die Tiere der oberen und der mittleren Dosisgruppe zeigten an klinischen Symptomen Diarrhö, Dyspnoe und Konjunktivitis mit klarem bis eitrigem Augenfluss. Bei einigen Hunden der oberen Dosisgruppe trat ab dem 50. Versuchstag eine partielle Paralyse der Hinterextremitäten auf. 2 männliche Hunde und ein weiblicher Hund der oberen Dosisgruppe verendeten nach 51, 74 bzw. 50 Tagen. Die Sektion dieser Tiere ergab als Todesursache eine Pneumonie und starke Dehydratation. Bei großen individuellen Variationen waren die Futter- und die Wasseraufnahme in allen Dosisgruppen reduziert. Die männlichen und die weiblichen Tiere der mittleren und der hohen Dosisgruppe zeigten im Studienverlauf einen Körpergewichtsverlust von 9 bis 16 %. Die im 15-tägigen Abstand wiederholten hämatologischen Befundungen ergaben bei den Tieren der oberen Dosisgruppe ab dem 30. Versuchstag und den Tieren der mittleren Dosisgruppe ab dem 45. Versuchstag reduzierte Erythrozytenzahlen und Hämoglobin-Spiegel. Zu Versuchsende war bei den Männchen und bei den Befundungen am 30. und 45. Versuchstag bei den Weibchen die Aktivität der Laktatdehydrogenase

im Serum erhöht. Die Aktivitäten der Alanin- und der Aspartataminotransferase im Serum waren in der oberen Dosisgruppe nur bei der Befundung am 60. Versuchstag und nur bei den Männchen erhöht. Erhöhte relative Gewichte der Leber wurden in allen Dosisgruppen, der Nieren in der mittleren und der hohen Dosisgruppe und des Gehirns sowie der Lungen in der hohen Dosisgruppe bei beiden Geschlechtern festgestellt. Bei der makroskopischen Befundung zeigten sich bei den mit 72 mg/kg Körpergewicht und Tag behandelten Tieren Veränderungen der Lungen, Trachea, Nieren und Leber. Wie bereits in der Studie von Katz et al. (1977; siehe oben) kam es zu gravierenden histopathologischen Veränderungen des ZNS und der Hoden. In den markhaltigen Bereichen des Großhirns, des Kleinhirns und/oder des Rückenmarks kam es besonders bei den Männchen der oberen Dosisgruppe zu einer Vakuolisierung, die auch bei einigen Hunden der mittleren und unteren Dosisgruppe vorhanden war; nur die Weibchen der niedrigen Dosisgruppe hatten keinerlei histopathologische Veränderungen des ZNS. Bei den männlichen Hunden aller Dosisgruppen zeigte sich dosisabhängig in den Hoden eine Degeneration des Keimepithels mit synzytialer Riesenzellbildung und in der mittleren und der hohen Dosisgruppe eine Atrophie der Prostata. Die männlichen Tiere der hohen Dosisgruppe wiesen außerdem eine Thymusatrophie, charakterisiert durch eine Depletion des lymphoiden Gewebes, auf. Vakuolige Veränderungen der Leber wurden in allen Gruppen einschließlich der Kontrolle gesehen; Vakuolisierung und Hyperplasie der Gallenblasenschleimhaut traten in allen mit Dichloressigsäure behandelten Gruppen und Zeichen einer chronischen Entzündung der Leber und Hämosiderinablagerungen besonders in den beiden oberen Dosisgruppen auf. Bei vielen Tieren der oberen und einigen der mittleren Dosisgruppe wurden Entzündungen der Lungen und der Bauchspeicheldrüse festgestellt. Ein no observed adverse effect level (NOAEL) konnte in diesem Versuch nicht ermittelt werden. Die Autoren diskutierten die pathologischen Veränderungen der verschiedenen Organsysteme als Folge der Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase durch Dichloressigsäure (siehe auch Kapitel 7.11 - Pharmakodynamische Wirkungen von Dichloressigsäure) und der damit verbundenen Beeinflussung des Lipid- und des Aminosäuremetabolismus, wobei insbesondere ein induzierter Thiaminmangel von Bedeutung zu sein scheint (Cicmanec et al., 1991).

Weitere subchronische Studien an der Maus werden zurzeit im Rahmen des NTP in den USA durchgeführt (NTP, 2003).

7.6 Gentoxizität

7.6.1 In vitro

Die zahlreichen Studien zur gentoxischen Wirkung von Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat in vitro sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst.

Anfang Tabelle 6

Tabelle 6. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Bakterien					
Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
1 Genmutationen					
1.1 Salmonella/Mikrosomen-Testsysteme					
1.1.1 Salmonella/Mikrosomen-Test als Standard-Platteninkorporationstest					
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, Test nach standardisiertem und validiertem Protokoll mit mindestens 3 Platten/Konzentration	333 bis 5000 ¹ , bis zur obersten Konzentration nicht bakteriotoxisch	S9-Mix aus Rattenleber (vermutlich Aroclor 1254-induziert)	negativ	negativ	Fox et al., 1996 a
¹ Es wurde Natriumdichloracetat mit einer Reinheit von ≥ 99,5 % geprüft (einzige Verunreinigung: ≤ 0,5 % Trichloracetat).					
Salmonella typhimurium TA 102, Auswertung von 3 Platten/Konzentration	1 - 1000 ¹ , keine Angaben zur Bakteriotoxizität	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Meier et al., 1997
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 99 % geprüft, die mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde.					
Salmonella typhimurium TA 102, TA 2638, Test mit unabhängiger Wiederholung und Reproduktion der Ergebnisse in einem weiteren Labor	313 - 5000 ¹ , Bakteriotoxizität geprüft	S9-Mix aus Phenobarbital- und 5,6-Benzoflavon-induzierter Rattenleber	negativ	nicht geprüft	Watanabe et al., 1996
¹ Keine Angabe zur Reinheit der verwendeten Dichloressigsäure.					
Salmonella typhimurium TA 100	keine Angabe	S9-Mix (keine weiteren Angaben)	negativ	negativ	Matsuda et al., 1991
Salmonella typhimurium (5 Stämme)	keine Angabe ¹	keine Angabe	positiv (TA 1538; keine Angabe, ob mit und/oder ohne metabolische Aktivierung)		Herbert et al., 1978
¹ Es wurde Dichloracetat (vermutlich mit NaOH neutralisierte Dichloressigsäure) geprüft, keine Angabe zur Reinheit. Beim Stamm TA 1538 soll die Revertanzahl 10fach über der der Kontrolle gelegen und sich somit ein eindeutig mutagener Effekt gezeigt haben (keine weiteren Angaben). Der Befund wurde in einer späteren Studie der Autoren nicht bestätigt (siehe unten; Herbert et al., 1979 a, b, c, 1980).					

Tabelle 6. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Bakterien

Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
Salmonella typhimurium TA 98 ¹	0, 1, 5 und 10 ¹ , keine Angabe zur Bakteriotoxizität	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	schwach positiv ²	schwach positiv ²	Herbert et al., 1979 a, b, c, 1980
<p>¹ In einem Vorversuch wurde mit NaOH auf pH-Werte von 3, 7 bzw. 9 eingestellte Dichloressigsäure (keine Angabe zur Reinheit) an den Stämmen TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 und TA 1538 geprüft. In diesen Vorversuchen zeigte sich nur bei den Stämmen TA 98 und TA 1538 eine Erhöhung der Revertanzahlen, die aber nur beim Stamm TA 98 und nur bei Prüfung der auf einen pH-Wert von 7 eingestellten, also neutralisierten Verbindung konzentrationsabhängig war (keine weiteren Angaben). Der Hauptversuch wurde nur mit dem Stamm TA 98 und der auf einen pH-Wert von 7 eingestellten Verbindung durchgeführt.</p> <p>² Weder ohne noch mit metabolischer Aktivierung ergab sich mindestens eine Verdoppelung der Revertanzahl. Die Bewertung als schwach positiv durch die Autoren beruht auf einem leichten, konzentrationsabhängigen Anstieg der Revertanzahlen um die Faktoren 1,08, 1,26 und 1,36 (ohne metabolische Aktivierung) bzw. 1,37, 1,47 und 1,69 (mit metabolischer Aktivierung), die als Mittelwerte aus 3 bzw. 4 unabhängigen Testdurchführungen errechnet wurden.</p>					
Salmonella typhimurium, nach Herbert et al. (1980) TA 98, TA 100, TA 1535	bis zur bakteriotoxischen Konzentration geprüft ¹	S9-Mix aus Aroclor 1254- und Phenobarbital-induzierter Rattenleber	schwach positiv bzw. negativ ²	nicht geprüft	Waskell, 1978
<p>¹ Keine Angabe zur Reinheit. Nach Herbert et al. (1980) wurden technische, destillierte sowie aus Ethanol umkristallisierte Dichloressigsäure und die in das Kaliumsalz überführte Verbindung geprüft.</p> <p>² Vom Autor wurde angegeben, dass die technische und die destillierte Probe schwach mutagen wirkten, während die umkristallisierte Probe keine gentoxische Wirkung zeigte (keine weiteren Angaben). Nach Herbert et al. (1980) war die von Waskell (1978) geprüfte technische Dichloressigsäure bei den Stämmen TA 100 und TA 1535 schwach positiv und beim Stamm TA 90 negativ, während die aus Ethanol umkristallisierte Probe und die ins Kaliumsalz überführte Probe nicht mehr mutagen wirkten (Herbert et al., 1980).</p>					
1.1.2 Salmonella/Mikrosomen-Test als Präinkubationstest					
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100	bis 4000 ¹ , bis zur bakteriotoxischen Konzentration geprüft	S9-Mix ¹	negativ	positiv (TA 100)	Kato et al., 1999; Saito et al., 1995
<p>¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von $\geq 97\%$ geprüft, weitere Angaben sind, mit Ausnahme, dass der positive Befund beim Stamm TA 100 ohne metabolische Aktivierung bei einer Konzentration von 2560 µg/Platte erhoben wurde, den weitestgehend in Japanisch abgefassten Arbeiten nicht zu entnehmen.</p>					

Tabelle 6. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Bakterien

Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
1.1.3 Salmonella/Mikrosomen-Test im geschlossenen Testsystem zur Prüfung flüchtiger Substanzen					
Salmonella typhimurium TA 100, Test mit mindestens einer unabhängigen Wiederholung	100 - 600 ppm (ca. 526 - 3156 mg/m ³) ¹ , bis zur bakteriotoxischen Konzentration geprüft	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	positiv ^{2,3}	positiv ^{2,3}	DeMarini et al., 1994
<p>¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von 99 % geprüft.</p> <p>² Fuscoe et al. (1996) berichteten, dass die Prüfung von Dichloressigsäure am Stamm TA 100 im Standard-Platteninkorporationstest nach persönlicher Mitteilung von DeMarini ein negatives Ergebnis ergeben hat.</p> <p>³ Eine Sequenzanalyse der durch Polymerase-Kettenreaktion amplifizierte Revertanten-DNA ergab, dass die durch Dichloressigsäure am hisG46-Allel induzierte Basensubstitution abweichend vom Hintergrundmutationsspektrum überwiegend eine CCC → CTC Transition und zu geringeren Teilen eine CCC → CAC Transversion war. Als wahrscheinlichen Mechanismus diskutierten die Autoren eine Ethenoadduktbildung an Cytosin, wodurch es im gegenüber liegenden Strang statt dem Einbau von Guanin zu einem Fehleinbau von überwiegend Adenin und in geringerem Umfang Thymin durch die DNA-Polymerase kommt. Nach Replikation des Adenin- bzw. Thymin-enthaltenen Stranges manifestieren sich die G : C → A : T Transitionen bzw. G : C → T : A Transversion.</p>					
1.1.4 Salmonella/Mikrosomen-Test als Fluktuationstest					
Salmonella typhimurium TA 100, Test mit mindestens einer unabhängigen Wiederholung	30 - 3000 µg/ml (- S9-Mix) bzw. 300 - 1000 µg/ml (+ S9-Mix) ¹ , ab 2000 µg/ml (- S9-Mix) bzw. 10000 µg/ml (+ S9-Mix) bakteriotoxisch	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	positiv	positiv	Giller et al., 1997
<p>¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 97 % geprüft.</p>					
1.1.5 Salmonella/Mikrosomen-Test als Mikrosuspensionstest					
Salmonella typhimurium TA 98, TA 100	keine Angaben	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Kohan und Huggins-Clark, 1998
1.2 Weitere Genmutagenitätsteste an Bakterien					
Escherichia coli WP2 uvrA, Tryptophan-Reversionstest, Test nach standardisiertem und validiertem Protokoll mit mindestens 3 Platten/Konzentration	333 - 5000 ¹ , bis zur obersten Konzentration nicht bakteriotoxisch	S9-Mix aus Rattenleber (vermutlich Aroclor 1254-induziert)	negativ	negativ	Fox et al., 1996 a
<p>¹ Es wurde Natriumdichloracetat mit einer Reinheit von ≥ 99,5 % geprüft (einzige Verunreinigung: ≤ 0,5 % Trichloracetat).</p>					

Tabelle 6. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Bakterien

Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
Escherichia coli WP2/pKM101 und WP2 uvrA/pKM 101, Test mit unabhängiger Wiederholung und Reproduktion der Ergebnisse in einem weiteren Labor	313 - 5000 ¹ , Bakteriotoxizität geprüft	S9-Mix aus Phenobarbital- und 5,6-Benzoflavon-induzierter Rattenleber	negativ	nicht geprüft	Watanabe et al., 1996
¹ Keine Angabe zur Reinheit der verwendeten Dichloressigsäure.					
2 DNA-Schäden					
2.1 DNA-Repair-Testsysteme					
Salmonella typhimurium hisGr (reparaturprofizient) und TS 24 recA, TA 2322 polA sowie TA 1950 uvrB (reparaturdefizient), DNA-Repair-Test als Filterplättchen-Plattendiffusionstest	31 mg/Filterplättchen (6 mm Durchmesser) ¹	nicht geprüft	nicht geprüft	negativ	Waskell, 1978
¹ Es wurde vermutlich technische Dichloressigsäure geprüft.					
2.2 Teste zur Prüfung der Induktion einer SOS-Antwort					
Salmonella typhimurium TA 1535/pSK 1002, umu-Test mit Messung der β-Galaktosidase-Aktivität	58, 5 µg/ml ¹	S9-Mix aus mit Phenobarbital und 5,6-Benzoflavon induzierter Rattenleber	positiv ²	negativ	Ono et al., 1991
¹ Keine Angabe zur Reinheit der verwendeten Dichloressigsäure.					
² Die Enzymaktivität war um das 1,5fache gegenüber dem Ausgangswert erhöht. Positiv- und/oder Negativkontrollen wurden nicht mitgeführt.					
Escherichia coli PQ37, SOS-Chromotest, Test mit mindestens einer unabhängigen Wiederholung	10 - 10000 µg/ml ¹ , ab 750 µg/ml (- S9-Mix) bzw. 3000 µg/ml (+ S9-Mix) bakteriotoxisch	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	negativ	schwach positiv ²	Giller et al., 1997
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 97 % geprüft.					
² Maximaler Induktionsfaktor 1,56 (bei 500 µg/ml), ab einem Induktionsfaktor von 1,5 wurde der Befund von den Autoren als positiv bewertet.					
Escherichia coli WP2s lambda (lon11, sulA1, trpE65, uvrA155, lamB ⁺), Prophage lambda Induktionstest als Mikroscreentest mit mindestens einer unabhängigen Wiederholung	bis 5000 µg/ml (- S9-Mix) bzw. 10000 µg/ml ¹ (+ S9-Mix), bis zur bakteriotoxischen Konzentration geprüft	S9-Mix aus Rattenleber (keine Angabe zu einem eventuellen Induktor)	schwach positiv ²	negativ	DeMarini et al., 1994
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von 99 % geprüft.					
² 3,7- bis 4,3fache Erhöhung der Plaque bildenden Einheiten (PFU) gegenüber dem Basiswert. Die Autoren gaben für einen positiven Effekt eine mindestens 3fache Erhöhung gegenüber dem Basiswert an und gruppieren die Wirkung von Dichloressigsäure im Vergleich zu mehr als 100 positiven Substanzen im Prophage lambda Induktionstest als schwach ein.					

Tabelle 6. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Bakterien					
Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
3 Sonstiges					
Klebsiella pneumoniae, Induktion einer Uracil- und/oder Prolin-Unabhängigkeit	0,01 % (v/v) ¹	nicht geprüft	nicht geprüft	negativ	Voogd et al., 1972
¹ Keine Angabe zur Reinheit der verwendeten Dichloressigsäure.					

Ende Tabelle 6

Anfang Tabelle 7

Tabelle 7. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Säugerzellen					
Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/ml)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
1 Genmutationen					
V79/HPRT-Test, 6-Thioguaninresistenz, Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (V79), Test nach OECD-Richtlinie Nr. 476 mit einer unabhängigen Wiederholung	30 - 1000 (- S9-Mix) bzw. 30 - 600 (+ S9-Mix) ¹ , obere Konzentrationen zytotoxisch	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	RBM, 1994 a
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von 99,5 % geprüft, die nicht neutralisiert wurde. Im Vorversuch zur Zytotoxizität wurden nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden im Inkubationsmedium bei Dichloressigsäure-Konzentrationen von 2000 bis 5000 µg/ml pH-Werte von < 3,6 gemessen.					
L5178Y/TK-Test, Trifluorthymidinresistenz, Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK ^{+/+} -3.7.2C), Test nach standardisiertem und validiertem Protokoll an mindestens 3 Platten/Konzentration	125 - 5000 ¹ , bis zur obersten Konzentration nicht zytotoxisch	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Fox et al., 1996 a
¹ Es wurde Natriumdichloracetat mit einer Reinheit von ≥ 99,5 % geprüft (einzige Verunreinigung: ≤ 0,5 % Trichloracetat).					

Tabelle 7. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Säugerzellen

Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/ml)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
L5178Y/TK-Test, Tri-fluorthyminresistenz, Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK ^{+/} -3.7.2C), Test an jeweils einer Platte/Konzentration mit unabhängiger Wiederholung	100 - 1000 im ersten Test und 200 - 900 ¹ in der Wiederholung, Zellüberlebensraten konzentrationsabhängig 100 - 2 % bzw. 97 - 7 %	nicht geprüft	nicht geprüft	schwach positiv ²	Harrington-Brock et al., 1998
¹ Keine Angabe zur Reinheit der verwendeten Dichloressigsäure, die nicht neutralisiert wurde. Die pH-Werte des Inkubationsmediums lagen konzentrationsabhängig bei 7,2 bis 6,1. Die Autoren schlossen einen pH-Wert-bedingten positiven Effekt aus. ² Auch bereits in einer früheren Publikation haben die Autoren berichtet, dass sie in diesem Testsystem bei einer Konzentration von 1200 µg Dichloressigsäure/ml (geprüftes Konzentrationsintervall 100 bis 1200 µg/ml) und einer Zellüberlebensrate von nur 10 % (Zellüberlebensraten im gesamten Konzentrationsintervall 100 bis 10 %) einen positiver Befund erhoben haben (keine weiteren Angaben; Harrington-Brock et al., 1992).					
2 Chromosomenschäden					
Chromosomenaberrationstest, Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (V79), Test nach OECD-Richtlinie Nr. 473 mit einer unabhängigen Wiederholung, je 200 Metaphasen/Konzentration analysiert	150 - 1500 (- S9-Mix) bzw. 150 - 3000 (+ S9-Mix) ¹ , jeweils oberste Konzentration zytotoxisch	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	RBM, 1994 b
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von 99,5 % geprüft, die nicht neutralisiert wurde. Im Vorversuch zur Zytotoxizität wurde im Inkubationsmedium bei einer Dichloressigsäure-Konzentration von 5000 µg/ml eine starke Absenkung des pH-Wertes gemessen.					
Chromosomenaberrationstest, Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO WBL), Test nach standardisiertem und validiertem Protokoll, je 100 Metaphasen/Konzentration an zwei Aufarbeitungszeitpunkten analysiert	500 - 5000 ¹ , oberste Konzentration zytotoxisch	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Fox et al., 1996 a
¹ Es wurde Natriumdichloracetat mit einer Reinheit von ≥ 99,5 % geprüft (einzige Verunreinigung: ≤ 0,5 % Trichloracetat).					

Tabelle 7. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Säugerzellen

Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/ml)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
Chromosomenaberrationstest, Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (CHL), Test nach standardisiertem und validiertem Protokoll, je 100 Metaphasen/Konzentration an zwei Aufarbeitungszeitpunkten von jeweils zwei Kulturen/Konzentration analysiert	250 - 2000 ¹ , Zytotoxizität geprüft	nicht geprüft	nicht geprüft	positiv ²	JETOC, 1996
¹ Keine Angabe zur Reinheit der verwendeten Dichloressigsäure, die nicht neutralisiert wurde. ² Positiv ab 1500 µg/ml (Aufarbeitung nach 24 Stunden) bzw. bei 2000 µg/ml (Aufarbeitung nach 48 Stunden) unter Einbeziehung und Ausschluss der Gaps in die Auswertung.					
kombinierter Chromosomenaberrations- und Mikronukleustest, Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK ^{+/+} -3.7.2C), 1000 Zellen/Konzentration im Mikronukleustest und 100 Metaphasen/Konzentration im Chromosomenaberrationstest analysiert, die Kulturen waren Parallelkulturen des oben beschriebenen L5178Y/TK-Testes der Autoren	600 und 800 ¹ , Zellüberlebensrate 42 bzw. 28 %	nicht geprüft	nicht geprüft	positiv ²	Harrington-Brock et al., 1998
¹ Keine Angabe zur Reinheit der verwendeten Dichloressigsäure, die nicht neutralisiert wurde. ² Die Zahl der Aberrationen war (exklusive Gaps) von 8 in der Kontrolle auf 22 bzw. 28 in den beiden geprüften Konzentrationen angestiegen. Die Auswertung hinsichtlich einer signifikanten Induktion von Mikronuklei ergab einen negativen Befund. Ferner wiesen die Autoren noch darauf hin, dass auch keine Aneuploidie induziert wurde. Keine Angabe, ob die Befunde in einem unabhängigen Wiederholungsexperiment bestätigt wurden.					
3 DNA-Schäden					
SCE-Test, Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1), mindestens 50 Metaphasen/Konzentration analysiert	500 - 10000 ¹ , ab 2000 (- S9-Mix) zytotoxisch bzw. bis einschließlich 10000 (+ S9-Mix) nicht zytotoxisch	S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber	negativ	schwach positiv ²	Meier et al., 1997
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 99 % geprüft, die mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde. ² Der Befund wurde von den Autoren als schwach bewertet, da nur in der oberen sehr hohen Konzentration von 2000 µg/ml ein geringer, aber konzentrationsabhängiger signifikanter Anstieg der SCE-Zahl/Zelle (14,58 gegenüber 10,02 in der Lösemittelkontrolle und 25,48 in der Positivkontrolle) festgestellt wurde.					

Tabelle 7. In vitro-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat an Säugerzellen					
Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich (µg/ml)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Rattenhepatozyten (F344)	ca. 129 - 1289 (1 - 10 mM) ¹ , keine Zytotoxizität (Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität)	primäre Hepatozyten	negativ	- ²	Chang et al., 1992
¹ Keine Angabe zur Reinheit der mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,4 eingestellten Dichloressigsäure. ² Nicht zutreffend, da primäre Hepatozyten per se eine metabolische Kompetenz besitzen.					
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Mäusehepatozyten (B6C3F1)	ca. 12,9 - 1289 (0,1 - 10 mM) ¹ , keine Zytotoxizität (Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität)	primäre Hepatozyten	negativ	- ²	Chang et al., 1992
¹ Keine Angabe zur Reinheit der mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,4 eingestellten Dichloressigsäure. ² Nicht zutreffend, da primäre Hepatozyten per se eine metabolische Kompetenz besitzen.					
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Humanlymphoblasten, CCRF-CEM-Zellen	ca. 129 - 1289 (1 - 10 mM) ¹ , keine Zytotoxizität (Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität)	nicht geprüft	nicht geprüft	negativ	Chang et al., 1989, 1992
¹ Keine Angabe zur Reinheit der mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,4 eingestellten Dichloressigsäure.					

Ende Tabelle 7

Genmutagene Wirkung

Die mutagene Wirkung von Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat bei Prokaryonten wurde in Salmonella/Mikrosomen-Testen und an Escherichia coli geprüft. Prüfungen im Standard-Platteninkorporationstest an den Salmonella typhimurium-Stämmen TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1537, TA 1538 und TA 2638 sowie an Escherichia coli WP2-Stämmen ergaben sowohl ohne als auch mit metabolischer Aktivierung (S9-Mix aus mit Aroclor bzw. Phenobarbital und Benzoflavon induzierter Rattenleber) negative Befunde (siehe [Tabelle 6](#)). Auch eine als Mikrosuspensionstest an den Stäm-

men TA 98 und TA 100 sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung durchgeführte Prüfung verlief negativ (Kohan und Huggins-Clark, 1998).

Positive Befunde in mehreren älteren Standard-Platteninkorporationstesten wurden nur aufgrund einer geringen Erhöhung, aber keiner Verdoppelung der Revertanzahlen abgeleitet, wurden in späteren Versuchen derselben Arbeitsgruppe nicht bestätigt bzw. nur mit technischer Dichloressigsäure erhoben und bei Prüfung der durch Umkristallisation gereinigten Probe nicht mehr festgestellt (Herbert et al., 1978, 1979 a, b, c, 1980; Waskell, 1978). Im Präinkubationstest am Stamm TA 100 wurde mit metabolischer Aktivierung ein negativer Befund und ohne metabolische Aktivierung ein positiver Befund erhoben (Kato et al., 1999; Saito et al., 1995). Die Prüfung dieses Stammes im Fluktuationstest sowie im für flüchtige Substanzen modifizierten Test war sowohl ohne als auch mit metabolischer Aktivierung (S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber) ebenfalls positiv (DeMarini et al., 1994; Giller et al., 1997). Für eine positive Wirkung von Dichloressigsäure am Stamm TA 100 spricht auch, dass eine Sequenzanalyse der durch Polymerase-Kettenreaktion amplifizierte Revertanten-DNA eine vom Hintergrundmutationsspektrum abweichende Basensubstitution am hisG46-Allel ergab. Als Auslöser für die überwiegend CCC → CTC Transition und zu geringeren Teilen CCC → CAC Transversion diskutierten die Autoren eine Ethenoadduktbildung an Cytosin (siehe auch [Tabelle 6](#); DeMarini et al., 1994). Im entsprechend der OECD-Richtlinie Nr. 476 durchgeführten HPRT-Test an Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (V79-Zellen) ergab die Prüfung von nicht neutralisierter Dichloressigsäure (Reinheit 99,5 %) und im ebenfalls nach standardisiertem und validiertem Protokoll durchgeführten L5178Y/TK-Test an Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK^{+/-}-3.7.2C) die Prüfung von Natriumdichloracetat (Reinheit ≥ 99,5 %) keine Hinweise auf mutagene Wirkungen der Verbindungen (RBM, 1994 a; Fox et al., 1996 a). Im Widerspruch zu diesen Befunden steht ein positiver Befund, der ohne metabolische Aktivierung mit nicht neutralisierter Dichloressigsäure unbekannter Reinheit im L5178Y/TK-Test an Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK^{+/-}-3.7.2C) erhoben wurde. Es wurde zwar nur eine Platte/Konzentration ausgewertet, der Befund aber in einer unabhängigen Wiederholung des Experimentes bestätigt. Unwahrscheinlich ist, dass das positive Ergebnis durch Verschiebungen des pH-Wertes im Medium induziert wurde. Die pH-Werte des Inkubationsmediums lagen konzentrationsabhängig bei 7,2 bis 6,3 (Harrington-Brock et al., 1998).

Chromosomenschädigende Wirkung

Lege artis durchgeführte Prüfungen hinsichtlich einer chromosomenaberrativen Wirkung von Natriumdichloracetat (Reinheit $\geq 99,5\%$) an CHO-Zellen des chinesischen Hamsters und von nicht neutralisierter Dichloressigsäure (Reinheit $99,5\%$) an V79-Zellen des chinesischen Hamsters ergaben weder ohne noch mit metabolischer Aktivierung (S9-Mix aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber) einen Hinweis auf eine chromosomenschädigende Wirkung der Verbindungen (Fox et al., 1996 a; RBM, 1994 b). An CHL-Zellen des chinesischen Hamsters entsprechend den japanischen Prüfrichtlinien und an Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK^{+/-}-3.7.2C) durchgeführte Chromosomenaberrationsteste waren dagegen ohne metabolische Aktivierung positiv. Beide Tests wurden nur ohne metabolische Aktivierung mit nicht neutralisierter Dichloressigsäure (keine Angaben zur Reinheit) durchgeführt (JETOC, 1996; Harrington-Brock et al., 1998). Ein als in vitro-Versuch an Maus-Lymphoma-Zellen (L5178Y/TK^{+/-}-3.7.2C) nur ohne metabolische Aktivierung durchgeführter Mikronukleustest ergab einen negativen Befund (Harrington-Brock et al., 1998).

DNA-schädigende Wirkung

Im DNA-Repair-Test am DNA-reparaturprofizienten *Salmonella typhimurium*-Stamm hisGr sowie an den reparaturdefizienten Stämmen TS24recA, TA 2322 polA und TA 1950 uvrB, der nur ohne metabolische Aktivierung durchgeführt wurde, ergab sich kein Hinweis auf eine DNA-schädigende Wirkung von Dichloressigsäure (Waskell, 1978). In Testsystemen, in denen die Induktion einer SOS-Antwort als Parameter für eine DNA-schädigende Wirkung dient (umu-Test an *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002, SOS-Chromotest an *Escherichia coli* PQ37 und Prophage lambda Induktionstest an *Escherichia coli* WP2 lambda), wurde jeweils mit oder ohne metabolische Aktivierung ein schwach positiver Befund erhoben (Ono et al., 1991; Giller et al., 1997; DeMarini et al., 1994). Ebenfalls als schwach positiv wurde Dichloressigsäure in einem SCE-Test an Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO), in dem sich ohne metabolische Aktivierung in der sehr hohen Konzentration von $2000\ \mu\text{g}$ mit NaOH neutralisierter Dichloressigsäure/ml ein geringer, aber konzentrationsabhängiger, signifikanter Anstieg der SCE-Zahl/Zelle ergeben hat, von den Autoren bewertet (Meier et al., 1997). Neutralisierte Dichloressigsäure induzierte weder in

primären Ratten- und Mäusehepatozyten noch in Humanlymphoblasten (CCRF-CEM-Zellen) im alkalischen Elutionstest („alkaline unwinding assay“) DNA-Einzelstrangbrüche (Chang et al., 1989, 1992).

7.6.2 In vivo

Die Befunde zur gentoxischen Wirkung von Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat in in vivo-Testsystemen sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Anfang Tabelle 8

Tabelle 8. In vivo-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat				
Testsystem	Dosis, Behandlungsschema	Toxizität	Ergebnis	Literatur
1 Chromosomenschäden				
Mikronukleustest, Ratte (CR:CD (SD) BR), 5 Tiere/Dosis und Geschlecht, 1000 polychromatische Erythrozyten (Knochenmark)/Tier untersucht, Test nach standardisiertem und validiertem Protokoll	3-mal im Abstand von 24 Stunden 275, 550 oder 1100 mg/kg Körpergewicht ¹ intravenös (keine Angabe zum Zeitpunkt der Befundung)	in der obersten Konzentration nach jeder Applikation Ataxie und Prostration, Dosen > 1100 mg/kg Körpergewicht waren in einer Vorstudie letal	negativ	Fox et al., 1996 a
¹ Es wurde Natriumdichloracetat mit einer Reinheit von ≥ 99,5 % geprüft (einzige Verunreinigung: ≤ 0,5 % Trichloracetat).				
Mikronukleustest, Maus (Swiss-Webster), 6 Tiere/Dosis, Geschlecht und Befundungszeitpunkt, mindestens 500 polychromatische Erythrozyten (Knochenmark)/Tier untersucht	2-mal im Abstand von 24 Stunden 1125, 2250 oder 4500 mg/kg Körpergewicht ¹ oral per Schlundsonde appliziert, Befundung 48 oder 72 Stunden nach der ersten Applikation	LD ₅₀ im Vorversuch an B6C3F1-Mäusen betrug 5697 bis 7500 mg/kg Körpergewicht, 2 Weibchen der oberen Dosisgruppe verendeten und der Anteil der polychromatischen Erythrozyten an der Gesamterythrozytenzahl war bei den männlichen und den weiblichen Tieren der oberen Dosisgruppe reduziert	negativ	Meier et al., 1997
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 99 % geprüft, die mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde.				

Tabelle 8. In vivo-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat

Testsystem	Dosis, Behandlungsschema	Toxizität	Ergebnis	Literatur
Mikronukleustest, Maus (B6C3F1), 10 Männchen/Gruppe, 1000 polychromatische Erythrozyten des peripheren Blutes/Tier untersucht	0,5, 1, 2 oder 3,5 g/l Trinkwasser ¹ oral appliziert über 9 Tage, eine weitere mit 3,5 g/l behandelte Gruppe erhielt zusätzlich Vitamin E (100 mg/kg Körpergewicht/Woche intraperitoneal)	keine dosisabhängige signifikante Veränderung des Anteils der polychromatischen Erythrozyten/1000 Erythrozyten	schwach positiv in der höchsten Dosisgruppe ²	Fuscoe et al., 1996; Salman et al., 1996
<p>¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von ≥ 99 % geprüft. Das Trinkwasser wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,4 eingestellt.</p> <p>² Geringer, aber statistisch signifikanter Anstieg der mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten auf 180 % der unbehandelten Kontrolle. Die zusätzliche Applikation von Vitamin E in der 3,5 g/l-Gruppe hatte keinen Einfluss auf die Zahl der mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten.</p>				
Mikronukleustest, Maus (B6C3F1), 10 Männchen/Gruppe, 1000 bis 2000 polychromatische und 1000 bis 2000 normochromatische Erythrozyten des peripheren Blutes/Tier untersucht	0,5, 1, 2 oder 3,5 g/l Trinkwasser ¹ oral appliziert über 28 Tage, eine weitere mit 3,5 g/l behandelte Gruppe erhielt zusätzlich Vitamin E (100 mg/kg Körpergewicht/Woche)	keine signifikante Veränderung des Anteils der polychromatischen Erythrozyten/1000 Erythrozyten	negativ ²	Fuscoe et al., 1996; Salman et al., 1996
<p>¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von ≥ 99 % geprüft. Das Trinkwasser wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,4 eingestellt.</p> <p>² Die zusätzliche Applikation von Vitamin E hatte keinen Einfluss auf die Zahl der mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten.</p>				
Mikronukleustest, Maus (B6C3F1), 10 Männchen/Gruppe, 1000 bis 2000 polychromatische und 1000 bis 2000 normochromatische Erythrozyten des peripheren Blutes/Tier untersucht	3,5 g/l Trinkwasser ¹ oral appliziert über 10, 26 oder 31 Wochen, alle Gruppen wurden nach einer Gesamtstudiendauer von 31 Wochen befundet	keine signifikante Veränderung des Anteils der polychromatischen Erythrozyten/1000 Erythrozyten	schwach positiv ²	Fuscoe et al., 1996; Salman et al., 1996
<p>¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von ≥ 99 % geprüft. Das Trinkwasser wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,4 eingestellt.</p> <p>² Nach allen Behandlungszeiten geringer, aber signifikanter Anstieg der mikrokernhaltigen normochromatischen Erythrozyten auf 170, 180 bzw. 200 % der Kontrolle. Der Anteil der mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle. Die Autoren diskutierten, dass der geringe Anstieg der mikrokernhaltigen normochromatischen Erythrozyten möglicherweise keine Folge einer direkten gentoxischen Wirkung der Verbindung, sondern eventuell auch eine sekundäre Folge der systemisch-toxischen Wirkung der applizierten Dosis sein könnte und Dichloressigsäure, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache gentoxische Wirkung habe.</p>				
2 DNA-Schäden				
SCE-Test, Maus	keine Angaben	keine Angaben	negativ	Meier, ohne Jahreszahl

Tabelle 8. In vivo-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat

Testsystem	Dosis, Behandlungsschema	Toxizität	Ergebnis	Literatur
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Leber-DNA, Ratte (Sprague-Dawley), 5 Männchen/Gruppe	ca. 0,1 - \geq ca. 3,9 mmol (12,9 - 503 mg)/kg Körpergewicht ¹ einmalig oral per Schlundsonde, Tötung 4 Stunden nach der Applikation	keine hepatotoxische Wirkung (Aktivitäten der Aspartatamino- und der Alaninaminotransferase im Serum in einer mit 3,8 mmol/kg Körpergewicht behandelten Parallelgruppe 24 Stunden nach der Applikation nicht erhöht)	positiv (ab 0,23 mmol (ca. 30 mg)/kg Körpergewicht)	Nelson und Bull, 1988; Washington State University, 1989
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 99 % geprüft. Keine Angabe, ob die mit Tween 80 formulierte Verbindung vor der Applikation neutralisiert wurde. Unklar bleibt die höchste applizierte Dosis, die nur der grafischen Befunddarstellung zu entnehmen ist. Bei identischem Kurvenverlauf enthalten die beiden Publikationen unterschiedliche Abszissen, wonach als maximale Dosis ca. 3,9 (Washington State University, 1989) bzw. ca. 15 mmol/kg Körpergewicht (Nelson und Bull, 1988) appliziert worden sind.				
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Leber-DNA, Ratte (Sprague-Dawley), 4 Männchen/Gruppe	ca. 3,9 mmol (503 mg)/kg Körpergewicht ¹ einmalig oral per Schlundsonde, Tötung 0,5, 1 bzw. 2 Stunden nach der Applikation	keine Angabe	positiv (zu allen Sektionszeiten)	Nelson und Bull, 1988; Washington State University, 1989
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 99 % geprüft. Keine Angabe, ob die mit Tween 80 formulierte Verbindung vor der Applikation neutralisiert wurde.				
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Leber-DNA, Maus (B6C3F1), 5 Männchen/Gruppe	ca. 0,006 - \geq ca. 3,9 mmol (12,9 - 503 mg)/kg Körpergewicht ¹ einmalig oral per Schlundsonde, Tötung 4 Stunden nach der Applikation	keine hepatotoxische Wirkung (Aktivitäten der Aspartatamino- und der Alaninaminotransferase im Serum in einer mit 3,9 mmol/kg Körpergewicht behandelten Parallelgruppe 24 Stunden nach der Applikation nicht erhöht)	positiv	Nelson und Bull, 1988; Washington State University, 1989
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 99 % geprüft. Keine Angabe, ob die mit Tween 80 formulierte Verbindung vor der Applikation neutralisiert wurde. Unklar bleibt die höchste applizierte Dosis, die nur der grafischen Befunddarstellung zu entnehmen ist. Bei identischem Kurvenverlauf enthalten die beiden Publikationen unterschiedliche Abszissen, wonach als maximale Dosis ca. 3,9 (Washington State University, 1989) bzw. ca. 15 mmol/kg Körpergewicht (Nelson und Bull, 1988) appliziert worden sind.				

Tabelle 8. In vivo-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat

Testsystem	Dosis, Behandlungsschema	Toxizität	Ergebnis	Literatur
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Leber-DNA, Maus (B6C3F1), 6 Männchen/Gruppe	0,08 oder 3,9 mmol (ca. 10 oder 503 mg)/kg Körpergewicht ¹ einmalig oral per Schlundsonde, Tötung 1, 2, 4, 8 bzw. 24 Stunden nach der Applikation	keine Peroxisomenproliferation (Oxidation von ¹⁴ C-Palmitoyl-Coenzym A als Maß für eine erhöhte β -Oxidationsrate bei einmaliger Applikation nicht erhöht, bei wiederholter Gabe von 500 mg/kg Körpergewicht über 10 Tage erhöhte Lebergewichte, vergrößerte Hepatozyten mit Glykogeneinlagerungen sowie erhöhten Peroxisomenzahlen und erhöhter Oxidation von Palmitoyl-Coenzym A (Wert bei ca. 160 % der Kontrolle))	positiv (0,08 und 3,9 mmol/kg Körpergewicht zu den Sektionszeiten 1 (Maximum), 2 und 4 Stunden)	Nelson und Bull, 1988; Nelson et al., 1988, 1989; Washington State University, 1989
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von > 99 % geprüft. Keine Angabe, ob die mit Tween 80 formulierte Verbindung vor der Applikation neutralisiert wurde.				
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Leber-DNA, Ratte (F344), 4 Männchen/Gruppe, DNA-Messung an 3 Proben/Tier	1 oder 5 mmol (ca. 129 oder 645 mg)/kg Körpergewicht ¹ einmalig oral per Schlundsonde, Tötung 4 Stunden nach der Applikation	Applikation von $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ der LD ₅₀	negativ	Chang et al., 1989, 1992
¹ Keine Angabe zur Reinheit der mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,4 eingestellten Dichloressigsäure.				
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Leber-DNA, Ratte (F344), 5 Männchen/Gruppe, DNA-Messung an 3 Proben/Tier	0,05, 0,5 oder 2 g/l Trinkwasser ¹ oral appliziert über 30 Wochen	Peroxisomenproliferation (Aktivität eines Markerenzym, der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase, in der hohen Dosisgruppe auf 364 % des Kontrollwertes in der Leber erhöht)	negativ	Chang et al., 1992
¹ Keine Angabe zur Reinheit der mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,4 eingestellten Dichloressigsäure.				
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Leber-, Milz-, Magen- und Darm-DNA, Maus (B6C3F1), 4 Männchen/Gruppe, DNA-Messung an 3 Proben/Tier und Organ	1, 5 oder 10 mmol (ca. 129, 645 oder 1289 mg)/kg Körpergewicht ¹ einmalig oral per Schlundsonde, Tötung 1 bzw. 4 Stunden nach der Applikation	Applikation von $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ der LD ₅₀	negativ	Chang et al., 1989, 1992
¹ Keine Angabe zur Reinheit der mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,4 eingestellten Dichloressigsäure.				

Tabelle 8. In vivo-Gentoxizitätsteste mit Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat

Testsystem	Dosis, Behandlungsschema	Toxizität	Ergebnis	Literatur
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalische Elution („alkaline unwinding assay“), Leber-DNA, Maus (B6C3F1), 3 Männchen/Gruppe, DNA-Messung an drei Proben/Tier	0,5 oder 5 g/l Trinkwasser ¹ oral appliziert über 7 bzw. 14 Tage	Peroxisomenproliferation (Aktivität eines Markerenzym, der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase, in der hohen Dosisgruppe auf 652 % (7 Tage) bzw. 90 % (14 Tage) der Kontrollwerte in der Leber erhöht)	negativ	Chang et al., 1992
¹ Keine Angabe zur Reinheit der mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,4 eingestellten Dichloressigsäure.				
DNA-Einzelstrangbrüche, alkalilabile DNA-Läsionen, unvollständige Reparatur, Crosslinks, modifizierte alkalische Elution („alkaline single cell gel electrophoresis assay“), Leukozyten-DNA, Maus (B6C3F1), 9 bis 10 Männchen/Gruppe, 25 Zellen/Tier untersucht	0,5, 1, 2 oder 3,5 g/l Trinkwasser ¹ oral appliziert über 28 Tage, eine weitere mit 3,5 g/l behandelte Gruppe erhielt zusätzlich Vitamin E (100 mg/kg Körpergewicht/Woche intraperitoneal)	keine Angabe	negativ bezüglich der Induktion von DNA-Brüchen, alkalilabilen Läsionen und unvollständiger Reparatur, schwach positiv in der hohen Dosisgruppe bezüglich der Bildung von Crosslinks ²	Fuscoe et al., 1996; Salman et al., 1996
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von $\geq 99\%$ geprüft. Das Trinkwasser wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,4 eingestellt. ² In der zusätzlich mit Vitamin E behandelten Gruppe wurden keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle festgestellt.				
3 Sonstiges				
Spermienkopfanomalien, Maus (B6C3F1), 12 Tiere/Dosis und Befundungszeitpunkt, 500 Spermien/Tier untersucht	0, 1125, 2250 oder 4500 mg/kg Körpergewicht ¹ täglich über 5 Tage oral per Schlundsonde, Befundung 21 bzw. 35 Tage nach der ersten Applikation	LD ₅₀ bei 5-maliger Applikation 4562 bis 6610 mg/kg Körpergewicht	positiv ²	Meier et al., 1997
¹ Es wurde Dichloressigsäure mit einer Reinheit von $> 99\%$ geprüft, die mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde. ² Der Anteil von Spermien mit Spermienkopfanomalien war bei der Befundung nach 21 Tagen in allen Dosisgruppen und bei der Befundung nach 35 Tagen in der oberen Dosisgruppe signifikant erhöht. Ferner war die Zahl der Spermien in den Nebenhoden nach 35 Tagen in allen Dosisgruppen signifikant reduziert. Die Hodengewichte entsprachen zu allen Befundungszeitpunkten in allen Dosisgruppen denen der Kontrollen. Die Autoren diskutierten, dass unter Berücksichtigung des negativen Befundes des von ihnen durchgeführten Mikronukleustestes (siehe oben) und der Hodenbefunde, die bei wiederholter Applikation der Verbindung festgestellt worden sind (Katz et al., 1981; siehe Kapitel 7.5), die festgestellten Spermienkopfveränderungen und die Reduzierung der Spermienzahlen in den Nebenhoden wahrscheinlich eher auf eine unspezifisch toxische Wirkung der Verbindung auf die Hoden als auf eine gentoxische Wirkung zurückzuführen sei.				

Ende Tabelle 8

Chromosomenschädigende Wirkung

Weder im Mikronukleustest an der CR:CD-Ratte mit dreimaliger intravenöser Applikation von bis zu 1100 mg/kg Körpergewicht noch im Mikronukleustest an der Swiss-Webster-Maus mit zweimaliger oraler Applikation von bis zu 4500 mg/kg Körpergewicht ergaben sich bei der Untersuchung aus dem Knochenmark gewonnener Erythrozyten Hinweise auf eine klastogene Wirkung von Natriumdichloracetat bzw. von mit NaOH neutralisierter Dichloressigsäure (Reinheiten $\geq 99\%$). Inkonstante Befunde wurden in einer Reihe von Mikronukleustesten an der männlichen B6C3F1-Maus mit Befundung der Erythrozyten des peripheren Blutes erhoben. Die Tiere erhielten in einem Telexperiment Trinkwasser (mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,4 eingestellt) mit 0,5, 1, 2 oder 3,5 g Dichloressigsäure (Reinheit $\geq 99\%$)/l über einen Zeitraum von 9 bzw. 28 Tagen und in einem weiteren Telexperiment mit 3,5 g Dichloressigsäure/l über 10, 26 oder 31 Wochen. Im zweiten Telexperiment wurden alle Tiere nach 31 Wochen befundet, ein Teil der Tiere also 21 Wochen bzw. 5 Wochen nachbeobachtet. Bei der Befundung nach 28-tägiger Applikation ergab sich in keiner Dosisgruppe eine Erhöhung der Zahlen der mikrokernhaltigen polychromatischen bzw. normochromatischen Erythrozyten. Schwach positiv bewerteten die Autoren die Befunde in der mit 3,5 g/l über 9 Tage behandelten Gruppe (Anstieg der mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten auf 180 % der unbehandelten Kontrolle) und in den mit 3,5 g/l über 10, 26 oder 31 Wochen behandelten Gruppen (Anstieg der mikrokernhaltigen normochromatischen Erythrozyten auf 170, 180 bzw. 200 % der Kontrolle, kein Anstieg der mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten). Die Autoren diskutierten, dass der geringe Anstieg der mikrokernhaltigen normochromatischen Erythrozyten möglicherweise keine Folge einer direkten gentoxischen Wirkung der Verbindung, sondern eventuell auch eine sekundäre Folge der systemisch-toxischen Wirkung der applizierten Dosis sein könnte und Dichloressigsäure, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache gentoxische Wirkung habe (Fuscoe et al., 1996; Salman et al., 1996).

DNA-schädigende Wirkung

Während mit Dichloressigsäure im SCE-Test *in vitro* an CHO-Zellen des chinesischen Hamsters in hohen Konzentrationen ohne metabolische Aktivierung ein schwach positiver Befund erhoben wurde (siehe oben; Meier et al.,

1997), soll ein von den Autoren durchgeführter SCE-Test in vivo an der Maus negativ verlaufen sein (keine weiteren Angaben; Meier, ohne Jahreszahl).

Diametral sind die Befunde, die von zwei Arbeitsgruppen in Testreihen hinsichtlich der Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen im alkalischen Elutionstest („alkaline unwinding assay“) erhoben wurden. Die eine Arbeitsgruppe, die Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %) einmalig oral per Schlundsonde in Dosen von bis zu 3,9 mmol (ca. 500 mg)/kg Körpergewicht männlichen Sprague-Dawley-Ratten und männlichen B6C3F1-Mäusen applizierte, stellte bei beiden Spezies bei den Befundungen bis einschließlich 2 Stunden (Ratte) bzw. 4 Stunden (Maus) nach der Applikation eine signifikante Erhöhung der DNA-Einzelstrangbrüche der Leber-DNA fest. Befundungen 8 und 24 Stunden nach der Applikation bei der Maus waren negativ (Nelson und Bull, 1988; Nelson et al., 1988, 1989; Washington State University, 1989). Die zweite Arbeitsgruppe applizierte mit NaOH auf pH-Werte von 7,0 bis 7,4 eingestellte Dichloressigsäure (keine Angaben zur Reinheit) männlichen F344-Ratten und männlichen B6C3F1-Mäusen entweder oral per Schlundsonde in einmaligen Dosen von bis zu 645 (Ratte) bzw. bis zu 1289 mg/kg Körpergewicht (Maus) oder oral mit dem Trinkwasser über 30 Wochen in Dosen von bis zu 2 g Dichloressigsäure/l (Ratte) bzw. über 7 und 14 Tage in Dosen von 0,5 oder 5 g Dichloressigsäure/l (Maus). In keinem der Teilversuche wurde eine Erhöhung von DNA-Einzelstrangbrüchen in der Leber-DNA und in dem akuten Teilversuch an der Maus auch nicht in der Milz-, Magen- und Darm-DNA festgestellt (Chang et al., 1989, 1992). Im modifizierten alkalischen Elutionstest („alkaline single cell gel electrophoresis assay“) ergaben sich bei männlichen B6C3F1-Mäusen nach einer 28-tägigen Applikation von Trinkwasser mit 0,5, 1, 2 oder 3,5 g Dichloressigsäure (Reinheit \geq 99 %)/l (mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,4 eingestellt) bei der Analyse der Leukozyten-DNA weder Hinweise auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen oder alkalilabilen Läsionen noch auf unvollständige DNA-Reparaturen. Da die DNA insgesamt langsamer im elektrischen Feld wanderte, vermuteten die Autoren eine Bildung von Crosslinks (Fusco et al., 1996; Salman et al., 1996).

Sonstiges

Spermienkopfanomalien sowie eine Aspermie in den Nebenhoden wurden nach 5-maliger oraler Applikation per Schlundsonde von 1125 bis 4500 mg

Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt)/kg Körpergewicht bei der B6C3F1-Maus festgestellt (Befundungen 21 oder 35 Tage nach der ersten Applikation). Die Autoren diskutierten, dass die festgestellten Spermienkopfveränderungen und die Reduzierung der Spermienzahlen in den Nebenhoden unter Berücksichtigung des negativen Befundes des von ihnen durchgeführten Mikronukleustestes (siehe oben) und der Hodenbefunde, die bei wiederholter Applikation der Verbindung festgestellt worden sind (siehe Kapitel 7.5), wahrscheinlich eher auf eine unspezifisch toxische Wirkung der Verbindung auf die Hoden als auf eine gentoxische Wirkung zurückzuführen sei (Meier et al., 1997).

In einem Versuch an transgenen, ein Escherichia coli lacI-Gen tragenden männlichen Big-Blue-B6C3F1-Mäusen wurde eine leichte Erhöhung der Mutationsfrequenzen gemessen. Zur Messung eventueller Mutationen wurde die Leber-DNA von mit 0 (Kontrolle), 1 oder 3,5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser über 4, 10 oder 60 Wochen behandelten Tieren isoliert und das lacI-Gen in lambda Phagen überführt. Danach wurden Escherichia coli mit diesen Phagen infiziert und deren β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Nach einer 4- und 10-wöchigen Behandlungszeit wurde keine Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Nach einer Behandlungsdauer von 60 Wochen war diese in der 1 g/l-Dosisgruppe um 30 % und in der 3,5 g/l-Dosisgruppe um 133 % gegenüber der Kontrolle erhöht. Eine Sequenzanalyse zeigte eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Mutationsrate des A:T-Basenpaares (Leavitt und Ross, 1997; Leavitt et al., 1997).

7.7 Kanzerogenität

Langzeitstudien

Zur kanzerogenen Wirkung von Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %) bei Ratten liegt eine Studie an männlichen Tieren des Stammes F344 vor, die in zwei Teilexperimenten durchgeführt wurde. Im ersten Teilversuch erhielten die Tiere (50 bis 60 Tiere/Gruppe, den Arbeiten nur indirekt entnehmbar) 0,05, 0,5 oder 5,0 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser, das mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,9 bis 7,1 eingestellt wurde, über bis zu 100 Wochen. Die hohe Konzentration von 5,0 g/l wurde nach 9 Wochen auf 2,5 g/l, nach 23 Wochen auf 2,0 g/l und nach 52 Wochen auf 1,0 g/l reduziert, da sich bei den Ratten eine periphere Neuropathie der Hinterextremitäten ent-

wickelt hatte. Da die Neuropathie auch nach Absenkung der Dosis nicht reversibel war, wurden die Tiere dieser Dosisgruppe nach 60 Wochen getötet und nicht in die Tumorauswertung einbezogen. Im zweiten Teilversuch wurden bei einer Gesamtbehandlungsdauer von 103 Wochen anfänglich 78 Tieren 2,5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser verabreicht. Nach 8 Wochen wurde die Konzentration auf 1,5 g/l und nach 26 Wochen auf 1,0 g/l zurückgenommen, da die Ratten leichte neurologische Symptome zeigten, die nach Verringerung der Konzentration jedoch überwiegend reversibel waren (durchschnittliche Konzentration über die gesamte Versuchszeit 1,6 g/l). Die Kontrollen des ersten Teilversuches erhielten Trinkwasser mit 2 g NaCl/l, das damit nahezu isomolar (32 mM) zu dem Trinkwasser der hohen Dosisgruppe (39 mM) war, und die Kontrollen des zweiten Teilversuches deionisiertes Wasser. Bezogen auf den Trinkwasserverbrauch und die analysierten Konzentrationen im Trinkwasser betrug die durchschnittliche Dichloressigsäure-Aufnahme 0 (Kontrollen), 3,6, 40,2 oder 139 mg/kg Körpergewicht/Tag. Zwischensektionen an 5 bis 7 Tieren/Gruppe (den Arbeiten nur indirekt entnehmbar) mit Befundung von Körper-, Leber-, Nieren-, Hoden- und Milzgewicht sowie makroskopischer Veränderungen wurden nach 15, 30, 45 und 60 Wochen (erster Teilversuch) bzw. nach 14, 26, 52 und 78 Wochen (zweiter Teilversuch) vorgenommen. Die zu Versuchsende befundeten Tiere wurden einer vollständigen Sektion mit Fixierung der bei einer Kanzerogenesestudie üblichen Organe und Gewebe unterzogen. Leber, Nieren, Milz und Hoden sowie makroskopisch auffällige Veränderungen wurden histopathologisch befundet. Zu allen Befundungsterminen wurde außerdem im Leberhomogenat eine Aktivitätsmessung der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase als Maß für eine Peroxisomenproliferation und nach vorheriger Gabe von [³H]-Thymidin (erster Teilversuch) bzw. Bromdesoxyuridin (zweiter Teilversuch) eine Messung der Hepatozytenproliferation vorgenommen. In allen Gruppen des ersten Teilversuches erfolgte des Weiteren zu allen Sektionsterminen in der Leber immunhistochemisch eine Befundung hinsichtlich Glutathion-S-Transferase P-positiver Foci (GST-P-positive Foci) und ebenfalls immunhistochemisch eine Messung von Tumormarkern (Onkoproteine p21 ras, p39 c-jun und p55 c-fos, tumorassoziierte Aldehyddehydrogenase und Glutathion-S-Transferase P sowie α -Fetoprotein) in kleinen Foci, hyperplastischen Knötchen, Adenomen und Karzinomen. In den Behandlungsgruppen unterschied sich die Mortalität nicht von der der Kontrollen. Die Tiere der hohen Dosisgruppe wiesen eine retardierte Körpergewichtsentwicklung, erhöhte

relative Leber- und Nierengewichte sowie reduzierte absolute Hodengewichte (gemessen nach 78 Versuchswochen) auf. Bei den Tieren der mittleren Dosisgruppe waren absolutes und relatives Hodengewicht erhöht. Substanzbedingte neoplastische Veränderungen wurden ausschließlich in der Leber festgestellt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9. Hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure bei männlichen F344-Ratten nach oraler Gabe im Trinkwasser - Anzahl der Tiere¹/Gruppe mit Leberveränderungen (% der befundenen Tiere; DeAngelo et al., 1996)					
Behandlungsgruppe	1. Teilversuch			2. Teilversuch	
	2 g/l NaCl (Kontrolle)	0,05 g DCA/l	0,5 g DCA/l	Wasser (Kontrolle)	1,6 g DCA/l
Anzahl der befundenen Tiere	23	26	29	33	28
Hyperplastische Knötchen	1 (4,4)	0	3 (10,3)	1 (3,0)	1 (3,6)
Adenome	1 (4,4)	0	5 (17,2)	0	3 (10,7)
Karzinome	0	0	3 (10,3)	1 (3,0)	6 (21,4) ²
Adenome plus Karzinome	1 (4,4)	0	7 (24,1) ²	1 (3,0)	8 (28,6) ³
Hyperplastische Knötchen plus Adenome plus Karzinome	2 (8,7)	0	10 (34,9) ²	2 (6,1)	9 (32,1) ³
DCA	Dichloressigsäure				
¹	es wurden nur Tiere befundet, die mehr als 78 Wochen überlebten				
²	p ≤ 0,05				
³	p ≤ 0,01				

Wie Tabelle 9 zeigt, kam es dosisabhängig in der mittleren und in der oberen Dosisgruppe zu einem signifikanten Anstieg der Summe der neoplastischen Leberveränderungen (Adenome + Karzinome) und der Summe der proliferativen Leberveränderungen (hyperplastische Knötchen + Adenome + Karzinome) sowie in der oberen Dosisgruppe zu einem signifikanten Anstieg der Karzinome. Neben der Zahl der Tiere mit den genannten Veränderungen war auch die Anzahl der genannten Veränderungen/Tier in der mittleren und der oberen Dosisgruppe jeweils erhöht. In der unteren und der mittleren Dosisgruppe wurde weder eine Peroxisomenproliferation noch eine Proliferation der Hepatozyten festgestellt. In der oberen Dosisgruppe war ab der 14. Versuchswoche die Aktivität der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase erhöht und der Prozentsatz der mit Bromdesoxyuridin markierten Hepatozyten signifikant bzw. tendenziell reduziert. Die im ersten Teilversuch vorgenommenen immunhistochemischen Messungen ergaben eine erhöhte Anzahl GST-P-positiver Foci/cm² in allen Dosisgruppen nach 45 Versuchswochen und einen dosisunabhängig erhöh-

ten Flächenanteil GST-P-positiver Foci nach 60 Versuchswochen und zu Versuchsende. Kein GST-P-positiver Foci war gegenüber einem der anderen Tumormarker positiv. Von den nach 60 Versuchswochen getöteten 27 Tieren der oberen Dosisgruppe des ersten Teilversuches, die nicht in die Tumorauswertung einbezogen wurden, wiesen 19 Tiere hyperplastische Knötchen, 7 Tiere Adenome und ein Tier ein Leberkarzinom auf. Alle diese Veränderungen waren GST-P-negativ, während sie gegenüber den 5 weiteren Tumormarkern markerabhängig zu 37 bis 89 % (hyperplastische Knötchen) bzw. zu 43 bis 86 % (Adenome und Karzinome) positiv waren. Alle weiteren hepatischen Veränderungen (Vakuolisierung des Zytoplasmas, verstärkte Glykogenablagerungen, sinusoidale Dilatation und zystische Degeneration (keine weiteren Angaben)) bewerteten die Autoren als nicht substanzbedingt. Angaben zu nicht neoplastischen Veränderungen weiterer Organe machten die Autoren, mit Ausnahme eines Hinweises auf Myokardveränderungen (keine weiteren Angaben), nicht. Als no observed effect level (NOEL) wurden 0,05 g/l (entsprechend 3,6 mg/kg Körpergewicht/Tag) ermittelt. Die Autoren diskutierten, dass GST-P-positive Foci keine präneoplastischen Veränderungen der durch Dichloressigsäure induzierten Hepatokarzinogenese darstellen und auch die Peroxisomenproliferation nicht im Zusammenhang mit der Hepatokarzinogenese steht. Sie vermuteten vielmehr, dass durch Dichloressigsäure natürliche Schutzmechanismen unterdrückt werden (z. B. die Apoptose) und sich dadurch aus spontan initiierten Zellen vermehrt Tumoren entwickeln können (DeAngelo et al., 1996; DeAngelo und Daniel, 1992; Richmond et al., 1995).

60 Wochen mit der bekanntermaßen kanzerogenen Dosis von 2,5 g Dichloressigsäure/l behandelte männliche F344-Ratten entwickelten zu ca. 70 % (Kontrolle 8 %) Lebertumoren, die in der Mehrzahl Karzinome waren. In den Tumoren wurde in der mitochondrialen mRNA eine deutliche Hemmung der Transkription der Untereinheit 4 (ND4) des NADH-Dehydrogenase-Gens gemessen. Bei Tieren ohne Lebertumoren war die ND4-Transkription den Kontrollen entsprechend. Auch die Transkription der Untereinheiten ND4L und ND5, die auf dem selben RNA-Strang liegen, war erhöht, während die der Untereinheit ND6, die auf einem anderen RNA-Strang liegt, nicht erhöht war. Bei einer Applikationsdauer von 26 bzw. 52 Wochen (Zwischentötungstermine), bei der noch keine Tumoren beobachtet wurden, war die ND4-Transkription stark erhöht. Die Autoren sahen die veränderte Expression der Gene als eine Folge der Aktivierung des Pyruvat-De-

hydrogenase-Komplexes (siehe Kapitel 7.11 - Pharmakodynamische Wirkungen von Dichloressigsäure). Der Beitrag dieser Veränderung zur hepatokanzerogenen Wirkung von Dichloressigsäure ist nach Diskussion der Autoren unklar (Kandala et al., 1997).

Die hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure bei der B6C3F1-Maus wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander in einer Vielzahl von Einzelstudien untersucht:

Den ersten Nachweis einer hepatokanzerogenen Wirkung von Dichloressigsäure bei der männlichen B6C3F1-Maus führte eine Arbeitsgruppe der US Environmental Protection Agency. In der Studie, die als Initiations-Promotionstest angelegt war, erhielten 16 bis 32 männliche B6C3F1-Mäuse/Gruppe im Alter von 15 Tagen intraperitoneal 2,5 µg Ethylnitrosoharnstoff/g Körpergewicht und ab einem Alter von 4 Wochen im Trinkwasser Dichloressigsäure (Reinheit $\geq 99\%$) in einer Konzentration von 2 oder 5 g/l über 61 Wochen. Das Trinkwasser wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 bis 7,5 eingestellt. Die Applikation von 2 bzw. 5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser entsprach, abweichend von der anfänglichen Annahme, dass 400 bzw. 1000 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht/Tag aufgenommen werden, nach einer späteren Studie der Autoren Dosierungen von ca. 230 bzw. 486 mg/kg Körpergewicht/Tag (siehe DeAngelo et al., 1991; unten). Die Kontrollen bekamen nach bzw. ohne Vorbehandlung mit Ethylnitrosoharnstoff Trinkwasser mit 2 g NaCl/l bzw. nur 5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser. Nach 16 Wochen wurde eine Zwischensektion an 5 bis 9 Tieren/Gruppe vorgenommen. Der Untersuchungsumfang beschränkte sich auf Körpergewichtsentwicklung, Leber- und Nierengewicht, Leberveränderungen, die Messung der Aktivität der hepatischen Cyanid-insensitiven Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase als Markerenzym einer Peroxisomenproliferation, die Bestimmung der relativen Peroxisomenzahl im Zytoplasma und des durch Peroxisomen beanspruchten Anteils am Zytoplasma. Nur in den mit 5 g Dichloressigsäure/l behandelten Gruppen kam es zu einer Körpergewichtsretardierung und einer Reduzierung des absoluten Nierengewichts. In allen mit Dichloressigsäure behandelten Gruppen waren das absolute und das relative Lebergewicht deutlich erhöht. Von den Tieren der ohne Gabe von Ethylnitrosoharnstoff mit 5 g Dichloressigsäure/l behandelten Gruppe wiesen 96 % (25/26) Leberadenome (NaCl-Kontrolle 9 % (2/22), Ethylnitrosoharnstoff-Kontrolle 5 % (1/22)) und 81 % (21/26) Leberkarzinome (NaCl-Kontrolle 0 %, Ethylnitrosoharnstoff-Kontrolle 5 % (1/22))

auf. Die mit Ethylnitrosoharnstoff plus 2 bzw. 5 g Dichloressigsäure/l behandelten Tiere hatten zu 76 % (22/29) bzw. 97 % (31/32) Adenome und zu 66 % (19/29) bzw. 72 % (25/32) Karzinome. Auch die Anzahl der Adenome und Karzinome/Tier war jeweils gegenüber der NaCl-Kontrolle und der Ethylnitrosoharnstoff-Kontrolle erhöht. Die hepatische Cyanid-insensitive Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase-Aktivität war nach 12 Versuchswochen in der mit 2 g Dichloressigsäure/l behandelten Gruppe nicht erhöht und lag in dieser Dosisgruppe bei Versuchsende 79 % über dem Wert der NaCl-Kontrolle. In der mit 5 g Dichloressigsäure/l behandelten Gruppe lag die hepatische Cyanid-insensitive Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase-Aktivität nach 12 Wochen 122 % und nach 61 Wochen 216 % über dem Wert der Kontrolle (keine Angabe, ob mit oder ohne vorherige Gabe von Ethylnitrosoharnstoff). Die Peroxisomenzahl und der durch Peroxisomen beanspruchte Anteil des Zytoplasmas waren gegenüber der Kontrolle nicht verändert. Die Autoren diskutierten, dass Dichloressigsäure, da es mit und ohne vorherige Gabe von Ethylnitrosoharnstoff deutliche Erhöhungen der Tumorzinidenzen bewirkt hat, möglicherweise ein komplettes Kanzerogen sei, wiesen aber darauf hin, dass der verwendete Mäusestamm (B6C3F1) hohe Spontantumorraten aufweist und dass Dichloressigsäure womöglich auch als Promotor für spontan initiierte Leberzellen wirkt. Ferner diskutierten sie, da eine Regressionsanalyse der Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase-Aktivität gegen die Lebertumoren/Maus keine klare Beziehung zwischen den beiden Parametern erkennen ließ, dass sie die Peroxisomenproliferation als Mechanismus für die Tumorentstehung für unwahrscheinlich halten (Herrenfreund et al., 1987; DeAngelo und McMillan, 1990).

In einem Folgeversuch erhielten Gruppen von je 50 männlichen B6C3F1-Mäusen (Ausgangsalter 28 Tage) Trinkwasser mit 0,05, 0,5, 3,5 oder 5 g Dichloressigsäure (Reinheit \geq 99-prozentig)/l über einen Zeitraum von 60 bis 75 Wochen. Auch das Trinkwasser dieser Tiere wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2 eingestellt. Die Kontrollen wurden mit 2 g NaCl/l Trinkwasser oder mit 1,5 g Essigsäure/l (nur Kontrolle für die 3,5 g/l-Dosisgruppe) behandelt. Bezogen auf den Trinkwasserverbrauch und das Körpergewicht der Tiere betragen die täglich aufgenommenen Dosen 7,6, 77, 410 bzw. 486 mg/kg Körpergewicht (bei DeAngelo und Daniel (1990) werden 7 (0,05 g/l-Gruppe), 74 (0,5 g/l-Gruppe) bzw. 465 mg (5 g/l-Gruppe)/kg Körpergewicht angegeben). Zwischensektionen an 5 Tieren/Gruppe erfolgten nach 4, 15, 30 und 45 Wochen. Der Versuch wurde in den beiden

oberen Dosisgruppen nach 60 Wochen und in den beiden unteren Dosisgruppen teilweise nach 60 Wochen (9 Tiere/Gruppe) und teilweise nach 75 Wochen abgeschlossen. Leber, Nieren, Hoden und Milz wurden gewogen sowie makroskopisch und gegebenenfalls histopathologisch befundet. Die Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Mortalität. In den beiden oberen Dosisgruppen war die Trinkwasseraufnahme um bis zu 40 % reduziert und die Körpergewichtsentwicklung retardiert (minus 17 bzw. 13 %). Um 18, 130 bzw. 251 % waren die relativen Lebergewichte in den oberen drei Dosisgruppen gegenüber den Kontrollen erhöht. Eine leichte Erhöhung des relativen Nierengewichts wurde nur in der 3,5 g/l-Dosisgruppe festgestellt. Die Inzidenzen neoplastischer Veränderungen lagen in der 5 g/l-Gruppe bei 80 % (Adenome) bzw. bei 83 % (Karzinome) und in der 3,5 g/l-Gruppe bei 100 % (Adenome) bzw. 67 % (Karzinome). Außerdem wiesen 58 % der mit 3,5 g/l und 83 % der mit 5 g/l behandelten Tiere hyperplastische Knötchen auf. Die Tumorzinzenzen der mit 3,5 bzw. 5 g Dichloressigsäure/l behandelten Gruppen unterschieden sich signifikant von den Kontrollgruppen (Adenome + Karzinome, NaCl 7,1 %, Essigsäure 0 %). Die Tumorzinzenzen in den Dosisgruppen 0,05 und 0,5 g/l (Adenome plus Karzinome 24,1 bzw. 11,1 %) unterschieden sich nicht signifikant von der Tumorzinzenzen der Kontrollen. Als nicht neoplastische Leberveränderungen wurden für die 5 g/l-Gruppe eine vorübergehende Peroxisomenproliferation, die nach 60 Versuchswochen nicht mehr festzustellen war, und chronische Entzündungen mit ausgeprägter Lebernekrose genannt. Leberentzündung und -nekrose waren in der 0,5 g/l-Gruppe schwächer ausgeprägt. Angaben zu nicht neoplastischen Leberveränderungen in den anderen Dosisgruppen fehlen. In der mit 5 g/l behandelten Gruppe erfolgte des Weiteren zu allen Sektionsterminen in der Leber eine immunhistochemische Messung von Tumormarkern (Onkoproteine p21 ras und p39 c-jun, Phosphotyrosin, tumorassoziierte Aldehyddehydrogenase sowie α -Fetoprotein) in normalem Lebergewebe, kleinen Foci, hyperplastischen Knötchen, Adenomen und Karzinomen. Normales Lebergewebe war negativ gegenüber den Tumormarkern. Kleine Foci wurden mit den Markern und auch mit histochemischen Färbungen nur in sehr geringer Anzahl und auch nur bis zur 30. Versuchswoche nachgewiesen. Leberadenome und Leberkarzinome waren in der Mehrzahl gegenüber den Markern positiv, während die hyperplastischen Knötchen zu einem deutlich geringeren Anteil positiv reagierten. In Adenomen und Karzinomen reagierten in der Regel alle Zellen gegenüber den Markern positiv. In den hyperplastischen Knötchen, die positiv reagierten,

beschränkte sich diese Reaktion auf kleine Nester positiver Zellen. Aufgrund dieser Beobachtung vermuteten die Autoren, dass diese Nester positiver Zellen in einzelnen hyperplastischen Knoten neoplastische Veränderungen darstellen, aus denen sich in der Folge Adenome und Karzinome entwickeln. Dichloressigsäure erwies sich also auch in diesem Versuch für männliche Mäuse als kanzerogen mit einem no observed effect level (NOEL) bei einer 75-wöchigen Applikation von 0,5 g/l Trinkwasser (77 mg/kg Körpergewicht/Tag; DeAngelo und Daniel, 1990; DeAngelo et al., 1991; Richmond et al., 1991).

Dieselbe Arbeitsgruppe applizierte 33 männlichen B6C3F1-Mäusen (Ausgangsalter 28 Tage, aufgeteilt in zwei Gruppen zu 23 bzw. 10 Tieren) über 104 Wochen Trinkwasser mit 0,5 g Dichloressigsäure (≥ 95 -prozentig)/l (neutralisiert auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2 mit NaOH). Bezogen auf den Trinkwasserverbrauch und das Körpergewicht entsprach dies einer Dosierung von 88 mg/kg Körpergewicht/Tag. An 5 Tieren erfolgte nach 30 Wochen eine Zwischensektion. Die 33 Tiere der Kontrollgruppe (ebenfalls aufgeteilt in zwei Gruppen zu 23 bzw. 10 Tieren) erhielten destilliertes Wasser. Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien zur kanzerogenen Wirkung von Dichloressigsäure, in denen nur die Leber einer ausführlichen Befundung unterzogen wurde, erfolgte am Ende dieser Studie eine umfassende Befundung mit vollständiger Nekropsie, Fixierung von 40 Organen und Geweben sowie histopathologischer Beurteilung von Leber, Nieren, Hoden, Milz und allen makroskopisch auffälligen Organen. Die Tiere waren frei von klinischen Symptomen. Mortalität, Trinkwasserverbrauch, Körpergewichts- und Organgewichtsentwicklung, mit Ausnahme des Lebergewichts, unterschieden sich nicht von den entsprechenden Werten der Kontrolle. Bereits zur Zwischensektion waren absolutes und relatives Lebergewicht signifikant erhöht. Bei Versuchsende lag das Lebergewicht ca. 50 % (absolut und relativ) über dem der Kontrolle. Makroskopische und histopathologische Veränderungen zeigten sich bei den 24 befundeten Tieren ausschließlich in der Leber. Als nicht neoplastische Veränderungen wurden hepatozelluläre Nekrosen (8/24, Kontrolle 1/20), hepatozelluläre Hyperplasie (8/24, Kontrolle 0/20), eine Vakuolisierung des Zytoplasmas (24/24, Kontrolle 19/20), Zytomegalie (22/24, Kontrolle 1/20, vermutlich ist eine sehr starke Hypertrophie mit massiver Glykogeneinlagerung gemeint; vergleiche Bull et al., 1990, 1993; Washington State University, 1989; unten) sowie eine chronische aktive Entzündung beschrieben (11/24, Kontrolle

7/20). Alle genannten, nicht neoplastischen Veränderungen waren bei den mit Dichloressigsäure behandelten Tieren deutlich stärker ausgeprägt als bei den Kontrolltieren. Von den 24 mit Dichloressigsäure behandelten und befundeten Tieren wiesen 15 Leberkarzinome, 10 Leberadenome und 2 hyperplastische Knötchen in der Leber auf, während in der Kontrollgruppe nur bei 3/20 Tiere proliferative Leberveränderungen festgestellt wurden. Keines der Tiere der Zwischensektion trug eine proliferative Leberveränderung. Ferner liegt ein Abstract vor (Snyder et al., 1995 b), wonach Lebergewebe, hyperplastische Knoten, Leberadenome und Lebertumoren von über 100 Wochen mit Dichloressigsäure behandelten männlichen B6C3F1-Mäusen eine signifikante und dosisabhängige Verminderung der Apoptoseaktivität aufwiesen. Die Autoren diskutierten, dass die kanzerogene Wirkung der Dichloressigsäure vermutlich auf diese Hemmung der Apoptose (programmierter Zelltod; Zelluntergang, der im Gegensatz zur Nekrose durch genetische Informationen der betroffenen Zelle selbst reguliert wird, mit nachfolgendem Abbau) zurückzuführen ist, da spontan initiierte Zellen nicht mehr abgebaut werden können (Daniel et al., 1992; Snyder et al., 1995 c).

Schließlich führte die Arbeitsgruppe eine weitere Kanzerogenesestudie an männlichen B6C3F1-Mäusen mit Applikation von 0,05, 0,5, 1, 2, oder 3,5 g Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %)/l Trinkwasser über die gesamte Lebenszeit und umfassender Befundung der Tiere durch. Den 35 bis 71 Tieren/Gruppe wurden beginnend in einem Alter von 28 bis 30 Tagen die mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,9 bis 7,1 eingestellten Trinkwasserformulierungen über 90 bis 100 Wochen verabreicht. Der Versuch wurde mit den Dosisgruppen $\geq 0,5$ g/l begonnen und einen Monat später die Dosierung von 0,05 g/l mit einer eigenen Kontrollgruppe nachgesetzt. Die insgesamt 88 Kontrolltiere wurden mit normalem Trinkwasser behandelt. Bezogen auf den Trinkwasserverbrauch und die analysierten Konzentrationen im Trinkwasser nahmen die Tiere durchschnittlich 0 (Kontrollen), 8, 84, 168, 315 bzw. 429 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht/Tag auf. Zwischensektionen an jeweils 10 Tieren/Gruppe mit Befundung makroskopischer Veränderungen sowie der Bestimmung von Körper-, Leber-, Nieren-, Hoden- und Milzgewicht wurden, außer in der unteren Dosisgruppe, nach 26, 52 und 78 Wochen vorgenommen. Nach 100 Wochen wurden die im Versuch verbliebenen Tiere getötet und einer vollständigen Sektion mit Fixierung der bei einer Kanzerogenesestudie üblichen Organe und Gewebe unterzogen. Leber, Nieren, Milz und Hoden sowie makroskopisch auffällige Veränderun-

gen wurden in allen Dosisgruppen und sämtliche fixierten Gewebe von 5 Tieren in der oberen Dosisgruppe histopathologisch befundet. Die Auswertung der Leberveränderungen wurde hinsichtlich Inzidenz und Multiplizität der neoplastischen Veränderungen sowie der Verbreitung nekrotisch veränderter Hepatozytenherde vorgenommen. Zu allen Befundungsterminen wurde außerdem im Leberhomogenat die Aktivität der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase als Maß für eine Peroxisomenproliferation gemessen. Bei den Tieren der Zwischensektionen nach 26 bzw. 52 Versuchswochen wurde nach vorheriger Gabe von [³H]-Thymidin der Labeling-Index als Kenngröße der Hepatozytenproliferation bestimmt. Nach 30 Versuchstagen wurde im Serum die Aktivität der Alaninaminotransferase und nach 26 und 52 Versuchswochen die der Laktatdehydrogenase gemessen. In den Behandlungsgruppen 2 und 3,5 g/l waren der Trinkwasserverbrauch anfänglich reduziert sowie die frühe Mortalität tendenziell erhöht und lagen die Körpergewichte zu Versuchsende 18 % unter denen der Kontrollen. Dosisabhängig waren in allen Dosisgruppen nach 26 und nach 52 Wochen das relative und das absolute Lebergewicht erhöht. Zu Versuchsende waren das absolute und das relative Lebergewicht nur in den mit 2 bzw. 3,5 g/l behandelten Gruppen erhöht. Die Gewichte von Nieren, Milz und Hoden wurden durch die Behandlung mit Dichloressigsäure nicht beeinflusst. Substanzbedingte neoplastische Veränderungen wurden ausschließlich in der Leber festgestellt (siehe Tabelle 10).

Anfang Tabelle 10

Tabelle 10. Hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure bei der männlichen B6C3F1-Maus nach oraler Gabe im Trinkwasser über bis zu 100 Wochen (DeAngelo et al., 1999)						
Behandlungsgruppe	Kontrolle	0,05 g/l	0,5 g/l	1 g/l	2 g/l	3,5 g/l
Anzahl der eingesetzten Tiere	88	35	55	71	55	46
Anzahl der Tiere der Zwischensektionen	35	0	30	30	30	30
Anzahl der verendeten Tiere	3	2	1	9	11	8
Anzahl der Tiere bei der Endsektion	50	33	24	32	14	8
Leberkarzinome (Inzidenz (% der befundeten Tiere) und Multiplizität (Karzinome/Tier))						
Nach 26 Wochen	0 %	-	0 %	0 %	0 %	0 %
Nach 52 Wochen	0 %	-	0 %	0 %	20 % 0,20±0,13	50 % 0,70±0,25
Nach 78 Wochen	10 % 0,10±0,10	-	0 %	20 % 0,20±0,13	50 % 1,0±0,47	70 ¹ % 1,20±0,37 ¹
Nach 100 Wochen	26 % 0,28±0,07	33 % 0,58 ¹	48 % 0,69±0,17 ¹	71 ¹ % 1,29±0,17 ¹	95 ¹ % 2,47±0,29 ¹	100 ¹ % 2,90±0,40 ¹

Tabelle 10. Hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure bei der männlichen B6C3F1-Maus nach oraler Gabe im Trinkwasser über bis zu 100 Wochen (DeAngelo et al., 1999)

Leberadenome (Inzidenz (% der befundeten Tiere) und Multiplizität (Adenome/Tier))						
Nach 26 Wochen	0 %	-	0 %	0 %	0 %	10 % 0,10±0,09
Nach 52 Wochen	0 %	-	10 % 0,10±0,09	10 % 0,10±0,09	0 %	50 % 0,80±0,31 ¹
Nach 78 Wochen	10 % 0,10±0,09	-	10 % 0,10±0,09	20 % 0,20±0,13	50 % 1,00±0,42	50 % 1,00±0,42
Nach 100 Wochen	10 % 0,12±0,05	k.A.	20 % 0,32±0,14	51,4 ¹ % 0,80±0,17 ¹	42,9 ¹ % 0,57±0,16 ¹	45 ¹ % 0,64±0,23
Große Foci präneoplastisch veränderter Zellen ² (Multiplizität (Foci/Tier))						
Nach 52 Wochen	k.A.	k.A.	0,1	0,1	0,2	0,16
Nach 100 Wochen	k.A.	0,03 ¹	k.A.	0,06 ¹	0,14 ¹	0,27 ¹
Häufigkeit nekrotisch veränderter Hepatozytenherde ³						
Nach 26 Wochen	0,10±0,10	k.A.	0,20±0,13	1,20±0,38 ¹	1,20±0,39 ¹	1,10±0,28 ¹
Nach 52 Wochen	0	k.A.	0	0,20±0,13	0,40±0,22	1,10±0,43 ¹
Nach 78 Wochen	0	k.A.	0	0	0,30±0,21	0,20±0,13
Nach 100 Wochen	0,20±0,16	k.A.	0,20±0,08	0,42±0,15	0,38±0,20	1,38±0,42 ¹
Abschätzung der in der Leber wirksamen Dosierungen, AUCL ⁴ (mg x Stunde/l)						
Über 100 Wochen	0	0,041	0,72	15,8	417	1064
k.A. keine Angabe						
¹ p ≤ 0,05						
² entspricht den in anderen Studien der Arbeitsgruppe (Daniel et al., 1992; DeAngelo et al., 1991, 1996; DeAngelo und Daniel, 1990, 1992; Richmond et al., 1991, 1995; Snyder et al., 1995 c) als hyperplastische Knoten bezeichneten Veränderungen						
³ in einer Skala von 0 bis 4 (0 = keine Veränderungen, 1 = ≤ 25 %, 2 = 25 bis 50 %, 3 = 50 bis 75 %, 4 = 100 % der Leberschnitte wiesen Foci nekrotischer Hepatozyten mit entzündlichen Zellinfiltraten auf)						
⁴ Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve in der Leber nach Barton et al. (1999; siehe Kapitel 7.1)						

Ende Tabelle 10

Wie Tabelle 10 zeigt, war zu Versuchsende die Inzidenz von Tieren mit Leberkarzinomen tendenziell ab der untersten geprüften Dosis von 0,05 g/l (8 mg/kg Körpergewicht/Tag) und signifikant ab einer Dosis von 1 g/l (168 mg/kg Körpergewicht/Tag) erhöht. Die Werte für die Multiplizität der Karzinome lag dosisabhängig und signifikant in allen Dosisgruppen über dem Wert der Kontrolle. Die Aktivität der Cyanid-insensitiven Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase als Maß für die Peroxisomenproliferation korrelierte nicht mit den Tumorinzidenzen; sie war nur in der mit 3,5 g/l behandelten Gruppe und in dieser auch nur bei den nach 26 Wochen befundeten Tieren signifikant erhöht. Die Labeling-Indices von nicht proliferativ verändertem Lebergewebe der mit Dichloressigsäure behandelten Tiere lagen im Bereich der bei den Kontrollen gemessenen Werte. Ab 1 g/l kam es zu deutlichen nekrotischen Veränderungen, die aber nicht streng zeit- und dosisabhängig

waren. Im Dosisbereich unter 1 g/l wurden nekrotische Leberveränderungen nur im geringen Ausmaß und auch nicht zu allen Befundungszeitpunkten festgestellt. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase war bei der Befundung nach 26 Wochen dosisabhängig in allen Dosisgruppen, signifikant aber nur in der oberen Dosisgruppe erhöht und lag nach 52 Wochen im Bereich der Kontrollen. Im Dosisbereich von 0,5 bis 2 g/l bestand nach 30 Versuchstagen eine Erhöhung der Aktivität der Alaninaminotransferase. Eine Hypertrophie der Hepatozyten (von den Autoren als Zytomegalie bezeichnet) und zytoplasmatische Vakuolisierung verbunden mit einer massiven Glykogenanreicherung in den Zellen war dosisabhängig und signifikant in allen Dosisgruppen vorhanden. Carter et al. (1998) berichteten ohne weitere Angaben in einem Abstract von immunhistochemischen Messungen proliferativer und apoptotischer Zellen, die sie am prämalig veränderten Lebergewebe im Vergleich zum angrenzenden normalen Lebergewebe der Tiere dieser Studie (DeAngelo et al., 1999) vorgenommen haben. Der Prozentsatz proliferativer Zellen war in veränderten Foci, hyperplastischen Knoten und in Adenomen negativ korrelierend mit der Dosis erhöht. Nach 100 Versuchswochen konnte keine dosisabhängige Suppression der Zellproliferation in normalem Lebergewebe und veränderten Foci festgestellt werden. Apoptotische Zellen waren in den Adenomen der Kontrollen, nicht aber in den Adenomen der mit Dichloressigsäure behandelten Tiere erhöht (siehe auch Kapitel 7.7 - Untersuchungen zur Frage, inwieweit durch Dichloressigsäure induzierte biochemische und morphometrische Veränderungen für die kanzerogene Wirkung von Bedeutung sind). Barton et al. (1999; siehe Kapitel 7.1) schätzten mit einem Toxikokinetikmodell ab, dass die Tiere während der Behandlungsphase AUCL-Werte (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve in der Leber) von 0 (Kontrolle), 0,041, 0,72, 15,8, 417 bzw. 1064 mg x Stunde/l hatten. Unter Berücksichtigung der Dosisabhängigkeit der Karzinominzidenzen, die tendenziell in allen Dosisgruppen und signifikant ab 1 g/l erhöht waren, und der Multiplizität der Karzinome, die bereits ab der untersten geprüften Dosis dosisabhängig und signifikant über den Werten der Kontrolle lag, diskutierten die Autoren, dass in dieser Studie kein no observed effect level (NOEL) erreicht wurde (Carter et al., 1998; Barton et al., 1999; DeAngelo et al., 1999).

Weibliche B6C3F1-Mäuse wurden, beginnend im Alter von 7 bis 8 Wochen, über 217, 360 oder 576 Tage mit 2, 6,67 bzw. 20 mmol (ca. 0,26, 0,86 bzw. 2,6 g) Dichloressigsäure/l Trinkwasser (eingestellt mit NaOH auf

einen pH-Wert von 6,5 bis 7,5) behandelt. Weitere Tiere wurden über insgesamt 360 bzw. 576 Tage intermittierend so mit 20 mmol/l behandelt (24 Tage Gabe von Dichloressigsäure, 48 Tage ohne Gabe des Stoffes), dass die applizierte Stoffmenge der kontinuierlichen Verabreichung von 6,67 mmol/l entsprach. In einem angegliederten Initiations-Promotionstest erhielten Mäuse im Alter von 15 Tagen einmalig 25 mg N-Methyl-N-nitrosoharnstoff/kg Körpergewicht intraperitoneal als Initiator und dann über 31 oder 52 Wochen (217 oder 360 Tage) die oben genannten Dichloressigsäure-Mengen im Trinkwasser. Bei einem Teil der N-Methyl-N-nitrosoharnstoff-initiierten Tiere, die mit 20 mmol/l behandelt wurden, wurde die Dichloressigsäure-Applikation nach 31 Wochen beendet und eine 21-wöchige Recovery-Periode angeschlossen. Kontrollgruppen wurden mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff und/oder 20 mmol NaCl/l Trinkwasser behandelt. Die Befundung umfasste nur Trinkwasser- und Futtermittelverbrauch, Körpergewichtsentwicklung, makroskopische und histopathologische Leberveränderungen sowie immunhistochemische Leberparameter. Nur in den mit 20 mmol/l behandelten Dosisgruppen war der Trinkwasserverbrauch anfänglich reduziert und die Körpergewichtsentwicklung ab der 27. bzw. 35. Versuchswoche retardiert. Bei allen mit Dichloressigsäure behandelten Tieren kam es linear dosisabhängig zu einer Erhöhung der relativen Lebergewichte und einer Vakuolisierung der Hepatozyten. Ohne Initiation mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff wiesen die über 31 Wochen mit Dichloressigsäure behandelten Tiere in der Leber weder Foci veränderter Zellen noch Tumoren auf. Die Inzidenzen proliferativer Veränderungen nach einer Applikationsdauer von 360 bzw. 576 Tagen sind in der folgenden Tabelle 11 dargestellt.

Anfang Tabelle 11

Tabelle 11. Hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure bei weiblichen B6C3F1-Mäusen nach oraler Gabe im Trinkwasser über 360 bzw. 576 Tage (Pereira, 1996)				
Behandlungsgruppen (mmol/l)	befundete Tiere (N)	Foci veränderter Zellen ¹	Adenome	Karzinome
	(% und Anzahl der Tiere mit Veränderungen/Anzahl der befundeten Tiere)			
Behandlung über 360 Tage				
20,0	20	40 (8/20) ²	35 (7/20) ²	5 (1/20)
20,0 intermittierend	15	0	0	0
6,67	20	5 (1/20)	15 (3/20)	0
2,0	40	0	0	0
NaCl-Kontrolle	40	0	2,5 (1/40)	0

Tabelle 11. Hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure bei weiblichen B6C3F1-Mäusen nach oraler Gabe im Trinkwasser über 360 bzw. 576 Tage (Pereira, 1996)

Behandlungsgruppen (mmol/l)	befundete Tiere (N)	Foci veränderter Zellen ¹	Adenome	Karzinome
	(% und Anzahl der Tiere mit Veränderungen/Anzahl der befundeten Tiere)			
Behandlung über 576 Tage				
20,0	19	89,5 (17/19) ²	84,2 (16/19) ²	26,3 (5/19) ²
20,0 intermittierend	34	41,2 (14/34) ²	8,8 (3/34)	2,9 (1/34)
6,67	28	39,3 (11/28) ²	25,0 (7/28) ²	3,6 (1/28)
2,0	50	14,0 (7/50)	6,0 (3/50)	0
NaCl-Kontrolle	90	11,1 (10/90)	2,2 (2/90)	2,2 (2/90)
¹ Foci veränderter Zellen, von den Autoren als proliferative Veränderung bewertet, bestanden aus 6 oder mehr Zellen, hatten eine erhöhte Mitoserate und komprimierten das umliegende Gewebe leicht. Die Abgrenzung gegenüber Adenomen erfolgte durch ihre Größe (Durchmesser < 1 mm) und das Ausmaß der Gewebekompression. Sehr wahrscheinlich sind die hier als Foci veränderter Zellen bezeichneten Veränderungen mit den als hyperplastische Knoten von den Autoren in den oben beschriebenen Ratten- und Mäusestudien bezeichneten Veränderungen identisch (siehe oben; Daniel et al., 1992; DeAngelo et al., 1991, 1996, 1999; DeAngelo und Daniel, 1990, 1992; Richmond et al., 1991, 1995; Snyder et al., 1995 c). ² p ≤ 0,05				

Ende Tabelle 11

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, wiesen nach 360 Tagen nur die kontinuierlich mit 20 mmol/l behandelten Tiere eine signifikante Erhöhung der Foci veränderter Zellen sowie der Adenome auf. Nach einer Behandlungsdauer von 576 Tagen waren bei den kontinuierlich und intermittierend mit 20 mmol/l und den mit 6,67 mmol/l behandelten Gruppen die Inzidenzen der Foci veränderter Zellen signifikant erhöht, während eine signifikante Erhöhung der Karzinome nur in der kontinuierlich mit 20 mmol/l behandelten Gruppe festgestellt wurde. Die Adenominzidenzen waren nur in den kontinuierlich mit 20 oder 6,67 mmol/l behandelten Gruppen signifikant erhöht. Zwischen den niedrigen Karzinominzidenzen der kontinuierlich mit 6,67 mmol/l und der intermittierend mit 20 mmol/l behandelten Gruppen (beide Gruppen erhielten dieselbe Gesamtdosis) bestand kein signifikanter Unterschied. Die Gabe des Tumorigeninitiators N-Methyl-N-nitrososulfonamid führte dazu, dass bei Applikation von 20 mmol Dichloressigsäure/l nach 31 Wochen bereits 80 % der Tiere Foci veränderter Zellen und 50 % Adenome sowie nach 52 Wochen 50 % der Tiere Foci veränderter Zellen und 73,1 % Adenome aufwiesen. Die Gesamtinzidenz der Veränderungen (Foci veränderter Hepatozyten, Adenome und Karzinome) sowie die Zahl der Veränderungen/Tier nach 52 Wochen unterschieden sich nicht signifikant von

den Zahlen nach 31 Wochen. Jedoch nahmen sowohl die Inzidenz als auch die Zahl der veränderten Foci/Maus mit Dauer der Applikation ab und die entsprechenden Werte für Adenome zu, woraufhin die Autoren diskutierten, dass die Foci veränderter Zellen möglicherweise einer Progression zu Adenomen unterliegen. Auffallend war, dass bei der mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff initiierten, mit 20 mmol/l behandelten Gruppe, die 21 Wochen nachbeobachtet wurde, die Inzidenzen und auch die Multiplizität der Veränderungen gegenüber den Werten nach 31 Wochen ohne Recovery-Periode stark abgenommen hatten und nicht mehr signifikant erhöht waren. Mittels hochauflösender Kernspinresonanztomographie wurde von einer anderen Arbeitsgruppe die Rückbildungsfähigkeit von durch Dichloressigsäure induzierten Tumoren in Untersuchungen an der männlichen B6C3F1-Maus bestätigt (siehe unten; Miller et al., 2000). Die Autoren hielten es für möglich, dass die Regression der Foci veränderter Zellen und der Tumoren nach Beendigung der Dichloressigsäure-Verabreichung auf die Aktivierung der Apoptose, die durch Dichloressigsäure unterdrückt wird, beruht (siehe auch Kapitel 7.7 - Untersuchung zur Frage, inwieweit durch Dichloressigsäure induzierte biochemische und morphometrische Veränderungen für die kanzerogene Wirkung von Bedeutung sind; Snyder et al., 1995 a, b, c). In den Gruppen, die signifikante Erhöhungen der Foci- bzw. Tumorinzidenzen aufwiesen, war auch die Anzahl der jeweiligen Veränderungen/Tier gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für alle Veränderungen (Foci veränderter Zellen plus Tumoren) folgte ohne und mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff-Vorbehandlung einer Funktion 2. Ordnung. Nahezu alle in den N-Methyl-N-nitrosoharnstoff-initiierten Gruppen festgestellten Foci veränderter Zellen und Tumoren sowie 80 bzw. 90 % dieser Veränderungen in den beiden oberen kontinuierlich behandelten Dosisgruppen waren eosinophil, während in der intermittierend behandelten Gruppe 43 % eosinophil und 56 % basophil waren. Die eosinophilen Veränderungen waren fast alle immunhistochemisch gegenüber Glutathion-S-Transferase π (GST- π) positiv. Die Veränderungen nur mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff initiierten Tiere waren überwiegend basophil und GST- π -negativ. Eine stichprobenartige immunhistochemische Befundung von Foci veränderter Zellen und Tumoren der N-Methyl-N-nitrosoharnstoff-initiierten und mit 20 mmol Dichloressigsäure/l behandelten Gruppe ergab, dass diese Veränderungen positiv nicht nur gegenüber GST- π , sondern auch gegenüber TGF- α , c-jun, c-myc, CYP 2E1 und CYP 4A1 und negativ gegenüber c-fos und TGF- β waren. Ein Verlust der Heterozygotie

im Chromosom 6 (polymorphe Loci D6mit1, D6mit9, D6mit204 und D6mit323) und damit der Ausfall von Tumorsuppressorgenen konnte bei der Sequenzanalyse der durch Polymerasen-Kettenreaktion amplifizierten Tumor-DNA nicht festgestellt werden (Tao et al., 1996). Nach vorheriger Gabe von Bromdesoxyuridin wurde die Hepatozytenproliferation in allen kontinuierlich behandelten Dosisgruppen an jeweils 10 Tieren mit Auswertung von 2000 Hepatozyten/Tier nach den ersten 5, 12 bzw. 33 Behandlungstagen gemessen. Nach einer anfänglichen signifikanten dosisabhängigen Erhöhung der Proliferation unterschied sich diese nach 12 und nach 33 Tagen nicht mehr von der Kontrolle. Die Autoren diskutierten, dass Dichloressigsäure aufgrund der Befunde als Tumorpromotor betrachtet werden muss, die Tumorgenese wohl aber nicht im Zusammenhang mit der Vakuolisierung der Hepatozyten (unterschiedliche Dosis-Wirkungskurven) und auch nicht mit der Peroxisomenproliferation steht (peroxisomenproliferationsbedingte Tumoren sind basophil; Pereira, 1994, 1996; Pereira und Phelps, 1996; Tao et al., 1996; Latendresse und Pereira, 1997).

Nochmals bestätigt wurden die Befunde des oben dargestellten Initiations-Promotionstestes in einer Folgestudie der Autoren, in der eigentlich die Untersuchung der synergistischen Wirkungen von Di- und Trichloressigsäure im Vordergrund stand. Wiederum nach einer Initiation mit 25 mg N-Methyl-N-nitrosoharnstoff/kg Körpergewicht im Alter von 15 Tagen wurden weibliche B6C3F1-Mäuse in dieser Studie ab einem Alter von 6 Wochen mit 7,8, 15,6 oder 25,0 mmol (ca. 1,0, 2,0 oder 3,2 g) Dichloressigsäure/l Trinkwasser über 44 Wochen behandelt. Ca. 30 Wochen nach Beginn der Verabreichung von Dichloressigsäure war die Körpergewichtsentwicklung in den beiden oberen Dosisgruppen retardiert. Das relative Lebergewicht war linear dosisabhängig in allen Gruppen erhöht. Bei den mit 25 mmol/l behandelten Tieren waren Inzidenz und Multiplizität der Foci veränderter Leberzellen und der Leberadenome signifikant erhöht. Wie in der vorangegangenen Studie waren diese proliferativen Veränderungen fast ausschließlich eosinophil und GST- π -positiv. In den mit 15,6 bzw. 7,8 mmol Dichloressigsäure/l behandelten Gruppen unterschieden sich die Inzidenzen der Foci veränderter Leberzellen und der Lebertumoren nicht signifikant von den entsprechenden Werten der Kontrolle (Kramer et al., 1996; Pereira et al., 1997).

Ohne vorherige Gabe von N-Methyl-N-nitrosoharnstoff erhielten 25 weibliche B6C3F1-Mäuse/Gruppe, beginnend im Alter von 28 Tagen, 0,5 oder 3,5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser (neutralisiert mit NaOH auf einen pH-

Wert von 6,9 bis 7,1) über 104 Wochen. Die 39 Kontrolltiere wurden mit 1,5-prozentiger neutralisierter Essigsäure behandelt. Die Tiere nahmen durchschnittlich Dosierungen von 0 (Kontrollen), 94 bzw. 438 mg/kg Körpergewicht/Tag auf. In der oberen Dosisgruppe war die Körpergewichtsentwicklung retardiert, das relative Lebergewicht um mehr als 250 % erhöht und die Leberkarzinominzidenz von 2,6 % (0,05 Tumoren/Tier) in der Kontrollgruppe auf 92 % (2,96 Tumoren/Tier) angestiegen. Die mit 0,5 g/l behandelte untere Dosisgruppe unterschied sich in der Körpergewichtsentwicklung, dem relativen Lebergewicht und der Leberkarzinominzidenz (4 %, 0,04 Tumoren/Tier) nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Weitere Befundungen wurden mit Ausnahme der unten dargestellten Charakterisierung der Tumoren hinsichtlich H-ras-Protoonkogenen nicht durchgeführt bzw. mitgeteilt (Schroeder et al., 1997).

Ebenfalls primär zur Untersuchung der Lebertumoren hinsichtlich einer Aktivierung des H-ras-Protoonkogens (siehe auch Kapitel 7.7 - Untersuchungen zu der Aktivierung von Protoonkogenen und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen) wurden auch männliche B6C3F1-Mäuse, beginnend im Alter von 28 Tagen, über 104 Wochen mit Dichloressigsäure (1 und 3 g/l, neutralisiert mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2, Kontrollgruppe neutralisierte isomolare Essigsäure) behandelt. Die Leberkarzinominzidenzen von 100 % (5,06 Tumoren/Tier) bzw. 70,6 % (1,29 Tumoren/Tier) waren in beiden Dosisgruppen signifikant gegenüber der Kontrolle (19 % (1,0 Tumoren/Tier)) erhöht (keine weiteren Angaben; Ferreira-Gonzalez et al., 1995).

K-ras- und H-ras-Protoonkogene (siehe Kapitel 7.7 - Untersuchungen zu der Aktivierung von Protoonkogenen und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen) wurden auch in den Tumoren männlicher B6C3F1-Mäuse untersucht, die über 76 Wochen 5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser (eingestellt mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 bis 7,5) erhalten hatten und zu 93 % Adenome (4,98/Tier) und zu 74 % Karzinome (1,73/Tier) in der Leber aufwiesen. Die mit normalem Trinkwasser versorgten Kontrollen wurden nach 134 Wochen befundet und hatten zu jeweils 8 % Adenome und Karzinome (keine weiteren Angaben; Anna et al., 1994).

Auch von einer weiteren Arbeitsgruppe, die Dichloressigsäure (analytisch rein) männlichen und weiblichen B6C3F1-Mäusen im Trinkwasser in Konzentrationen von 1 oder 2 g/l über bis zu 52 Wochen verabreichte, wurde die leberkanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure bei der B6C3F1-

Maus bestätigt. Trinkwasser mit 1 g/l erhielten 11 Männchen über 52 Wochen. Mit 2 g/l wurden insgesamt 50 männliche und 10 weibliche Tiere behandelt. Je 5 Männchen wurden nach 5, 24 bzw. 37 Wochen befundet; 11 Männchen erhielten Dichloressigsäure 37 Wochen lang und wurden anschließend noch 15 Wochen nachbeobachtet (Gesamtversuchsdauer 52 Wochen) und 24 männliche und die 10 weiblichen Tiere erhielten 2 g Dichloressigsäure/l über 52 Wochen. Das Trinkwasser wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2 eingestellt. Entsprechende Kontrollen erhielten das normale Trinkwasser. Die Behandlung hatte keinen Einfluss auf Mortalität, Körpergewichtsentwicklung, Futter- und Wasserverbrauch oder das Nierengewicht. Die Leberveränderungen waren dosisabhängig. Die mit 1 g/l über 52 Wochen behandelten Männchen wiesen als nicht neoplastische Leberveränderungen ein erhöhtes relatives und absolutes Organgewicht, multifokale Nekrosen besonders an der Organoberfläche, häufig mit Lymphozyteninfiltrationen, sowie eine sehr ausgeprägte und gleichmäßig über das Organ verteilte Hypertrophie der Hepatozyten mit einer massiven Glykogenanreicherung in den Zellen (von den Autoren als Zytomegalie bezeichnet) auf. Die vermehrte Glykogenanreicherung wurde nach einer späteren und nur als Abstract publizierten Studie der Autoren auf eine Glykogenabbaustörung und nicht auf eine erhöhte Glykogensynthese zurückgeführt (Kato und Bull, 1995). In den mit 2 g/l behandelten Dosisgruppen wurden qualitativ identische Veränderungen und zusätzlich ab einer Behandlungsdauer von 24 Wochen noch zentrilobuläre basophile Foci Glykogen verarmter Zellen und nach der Gesamtbehandlungsdauer von 52 Wochen noch geringgradige Lipofuszinanreicherungen festgestellt. Lebergewichtserhöhung und Hepatozytenhypertrophie waren in der 15 Wochen nachbeobachteten Gruppe deutlich reversibel. Proliferative Leberveränderungen (hyperplastische Knoten, Adenome und Karzinome) wiesen in der 1 g/l-Dosisgruppe 2/11 Männchen (hyperplastische Leberknoten), in der 37 Wochen mit 2 g/l behandelten und anschließend 15 Wochen nachbeobachteten Gruppe 7/11 Männchen (überwiegend hyperplastische Knoten (keine weiteren Angaben)) und in den 52 Wochen mit 2 g/l behandelten Gruppen 23/24 Männchen (überwiegend hyperplastische Knoten und Karzinome (keine weiteren Angaben)) sowie 3/10 Weibchen (hyperplastische Knoten) auf. Von den insgesamt 35 männlichen und 10 weiblichen Kontrolltieren trug ein Männchen hyperplastische Knoten. Die ungenauen Angaben zur Inzidenz der einzelnen proliferativen Veränderungen beruhen darauf, dass von den insgesamt 120 hepatoproliferativen Einzelveränderungen stichpro-

benartig nur 45 Veränderungen von insgesamt 20 Mäusen histopathologisch befundet wurden. Auffallend war, dass bei den mit 2 g/l behandelten Männchen, die Dichloressigsäure nur über 37 Wochen erhalten hatten und anschließend noch 15 Wochen nachbeobachtet worden waren, überwiegend hyperplastische Knötchen, nur wenige Adenome und keine Karzinome festgestellt wurden, während von den über 52 Wochen mit 2 g Dichloressigsäure/l behandelten Männchen 5/10 befundeten Tieren Karzinome aufwiesen. In einer späteren Studie der Autoren (siehe unten; Miller et al., 2000) wurde mittels hochauflösender Kernspinresonanztomographie bestätigt, dass sich durch Dichloressigsäure induzierte Tumoren der männlichen B6C3F1-Maus zurückbilden können. In einer parallel durchgeführten orientierenden Studie an der Sprague-Dawley-Ratte, in der 3 männliche und 2 weibliche Tiere über 12 Monate mit 5 g Dichloressigsäure (analytisch rein)/l Trinkwasser (neutralisiert auf pH 6,8 bis 7,2 mit NaOH) behandelt worden waren, zeigte sich ebenfalls eine Hypertrophie der Hepatozyten mit Akkumulation von Glykogen, aber in einer viel geringeren Ausprägung als bei der B6C3F1-Maus (Bull et al., 1990, 1993; Washington State University, 1989).

Bereits in den von Pereira und Phelps (1996) bzw. Bull et al. (1990, 1993) und Washington State University (1989) berichteten Studien (siehe oben) wurde festgestellt bzw. wurden Hinweise darauf erhoben, dass sich durch Dichloressigsäure induzierte hyperplastische Knoten und Adenome bei Unterbindung einer weiteren Zufuhr des Stoffes zurückbilden können. Dies wurde mit einer in situ-Befundungsmethode in einer Studie an männlichen B6C3F1-Mäusen bestätigt. Von 30, bei Applikationsbeginn 6 Wochen alten Mäusen, die über 48 Wochen mit 2,0 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser (neutralisiert mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2) behandelt worden waren, entwickelten 10 Tiere insgesamt 13 Lebertumoren. Die Tumoren wurden am lebenden Tier in situ nach Anästhesie mittels Ketaminhydrochlorid (120 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal) und Xylazin (7,2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal) mit Hilfe der hochauflösenden Kernspinresonanztomographie befundet. Nach einer Nachbeobachtungszeit von 2 bis 3 Wochen hatte sich bei 5 der 10 Tiere, die nicht weiter mit Dichloressigsäure behandelt worden waren, die Größe der jeweiligen individuellen Tumoren verringert, während sie sich bei den anderen 5 Tieren, bei denen die Verabreichung des Stoffes kontinuierlich fortgesetzt worden war, erhöht hatte. Das Vorhandensein der Tumoren wurde durch eine anschließende histopathologische Befundung bestätigt (Miller et al., 2000).

Untersuchungen zum Mechanismus der kanzerogenen Wirkung

• Untersuchungen zur peroxisomenproliferativen Wirkung

Dichloressigsäure induziert bei akuter und subakuter Applikation eine Lipidperoxidation und Peroxisomenproliferation (siehe Kapitel 7.2). Nach einer in vitro-Untersuchung bindet Dichloressigsäure in der Leber an den Ligand-aktivierten Transkriptionsfaktor, den „Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α “, und löst damit die Peroxisomenproliferation aus (Zhou und Waxman, 1998). Anfängliche Vermutungen, dass die Bildung von neoplastischen Veränderungen die Konsequenz einer chronischen Gewebeschädigung aufgrund der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmolekülen als Folge der Peroxisomenproliferation ist, bestätigten sich nicht. In Langzeitstudien (siehe Kapitel 7.7 - Langzeitstudien) erforderte die Auslösung einer Peroxisomenproliferation bei der männlichen F344-Ratte und der männlichen B6C3F1-Maus höhere Dosierungen als die Induktion neoplastischer Veränderungen (Herren-Freund et al., 1987; DeAngelo et al., 1996; DeAngelo und Daniel, 1992; DeAngelo und McMillan, 1990; Richmond et al., 1995). Außerdem war die Peroxisomenproliferation nach längerer Applikationsdauer bei der männlichen B6C3F1-Maus nicht mehr festzustellen (DeAngelo und Daniel, 1990; DeAngelo et al., 1991; Richmond et al., 1991) und es ließ sich bei statistischen Auswertungen der Peroxisomenproliferation und der neoplastischen Wirkungen keine eindeutige Korrelation herstellen (Herren-Freund et al., 1987; DeAngelo und McMillan, 1990; DeAngelo et al., 1999).

Wie oben dargestellt, wurde in zahlreichen in vivo-Studien eine peroxisomenproliferative Wirkung von Dichloressigsäure nachgewiesen, die allerdings nicht mit der tumorigenen Wirkung korrelierte. Auch in vitro, in primären Hepatozyten von männlichen Long-Evans-Ratten und männlichen B6C3F1-Mäusen, konnte die Peroxisomenproliferation nachgewiesen werden. Es wurden nach 72-stündiger Inkubation der Zellen in Medien mit 0,1 bis 2,0 bzw. 4,0 mmol Dichloressigsäure/l die Aktivität eines Markerenzym der Peroxisomenproliferation, der Palmitoyl-Coenzym A-Oxidase, und mittels monoklonaler Antikörper die Menge „Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α “-induzierter peroxisomaler bifunktionaler Enzyme gemessen. Ferner wurden mit 2,0 mmol/l inkubierte Hepatozyten lichtmikroskopisch hinsichtlich Peroxisomen befundet. In den Hepatozyten beider Spezies

kam es konzentrationsabhängig in einem in etwa gleichen Ausmaß zu einem Anstieg der Palmitoyl-Coenzym A-Oxidation sowie der Menge an peroxisomalen bifunktionalen Enzymen. Die mit 2,0 mmol Dichloressigsäure/l inkubierten Hepatozyten wiesen deutliche Peroxisomenansammlungen auf (Everhart et al., 1998; Walgren et al., 2000).

Während in Hepatozyten der Maus und der Ratte eine durch Dichloressigsäure induzierte Peroxisomenproliferation in vitro nachgewiesen werden konnte (Everhart et al., 1998; Walgren et al., 2000; siehe oben), war dies in einem Folgeversuch der Autoren in Humanhepatozyten nicht möglich. Es wurden primäre Hepatozyten und Dauerkulturen dieser Hepatozyten, die von 3 männlichen (Alter 56 bis 67 Jahre) und 3 weiblichen (Alter 32 bis 55 Jahre) Spendern stammten, verwendet. In den Hepatozyten war nach 72-stündiger Inkubation mit bis zu 4 mmol Dichloressigsäure/l die Palmitoyl-Coenzym A-Oxidationsrate unter der Nachweisgrenze. Das mittels monoklonaler Antikörper gemessene CYP4A11-Gen, von dem die Autoren annahmen, dass es den „Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α “ aktiviert, war nicht statistisch signifikant auf einen 1,3- bis 1,4fachen Wert der Kontrolle leicht erhöht. Die DNA-Synthese, gemessen als [^3H]-Thymidin-Inkorporation, war nach Inkubation mit bis zu 1 mmol Dichloressigsäure/l in primären Humanhepatozyten signifikant herabgesetzt, in den über mehrere Zellzyklen kultivierten Hepatozyten aber nicht gehemmt (Walgren et al., 2000).

• Untersuchungen zur gentoxischen Wirkung

Vielfach durchgeführte Studien zur Frage, ob die kanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure eine Folge von mutagenen Veränderungen der Erbsubstanz sein könnte, erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse. In der überwiegenden Zahl der Gentoxizitätsteste, die eine Vielzahl von Testsystemen umfassen, wurden weitestgehend negative Befunde erhoben (siehe Kapitel 7.6 und Tabellen 6, 7 und 8). Mehrheitlich diskutierten die Autoren, auch die Arbeitsgruppen, welche positive Befunde hinsichtlich einer gentoxischen Wirkung erhoben haben, dass die gentoxische Wirkung von Dichloressigsäure, falls überhaupt vorhanden, gering und wahrscheinlich keine Voraussetzung für die Ausbildung von tumorigenen Veränderungen durch die Verbindung sei (siehe z. B. Carter et al., 1995; DeAngelo et al., 1991, 1999; ILSI, 1997; Latendresse und Pereira, 1997; Pereira, 1996;

Pereira und Phelps, 1996; Snyder et al., 1995 a, b, c; Stauber und Bull, 1997; Stauber et al., 1998; Tao et al., 1996, 1998, 2000). Untersuchungen zur Aktivierung von Protoonkogenen (siehe Kapitel 7.7 - Untersuchungen zu der Aktivierung von Protoonkogenen und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen) deuten ebenfalls auf einen nicht gentoxischen Mechanismus der Kanzerogenese hin.

- **Untersuchungen zu der Aktivierung von Protoonkogenen und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen**

Das Lebergewebe der männlichen B6C3F1-Mäuse aus dem oben dargestellten 37- bzw. 52-Wochen-Versuch (siehe oben; Bull et al., 1990; Washington State University, 1989) wurde in situ mittels einer Hybridisierungstechnik hinsichtlich der Expression der Protoonkogene c-myc- und c-H-ras in der mRNA untersucht. Dabei zeigte sich, dass nach 52 Wochen in den Karzinomen und präneoplastischen Knötchen im Vergleich zum nicht veränderten Lebergewebe die c-myc-Expression signifikant etwa 3fach erhöht war. Die Expression von c-H-ras war nur im Karzinomgewebe, nicht aber in den präneoplastischen Knötchen signifikant, etwa 4fach gegenüber dem nicht veränderten Lebergewebe erhöht (Nelson et al., 1990).

Zur genaueren Untersuchung, ob die hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure auf einer Aktivierung von ras-Protoonkogenen durch substanzbedingte Mutationen beruht, wurde aus den Tumoren des Versuches von Anna et al. (1994; siehe oben) DNA isoliert und molekulargenetisch (Sequenzanalyse (Southern blot) der durch Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten DNA) hinsichtlich H-ras-, K-ras-, raf- und c-met-Protoonkogenen untersucht. In den Tumoren (Adenome, Karzinome, Adenome plus Karzinome) der mit Dichloressigsäure behandelten Tiere fanden sich nahezu ausschließlich Mutationen im H-ras Codon 61-Protoonkogen. Die Gesamtmutationsrate dieses auch in Spontantumoren der männlichen B6C3F1-Maus auftretenden Protoonkogens (vergleiche Maronpot et al., 1987, 1995) unterschied sich nicht von den in Tumoren der Studienkontrolle und historischen Kontrollen gemessenen Werten (Dichloressigsäure-Gruppe 62 %, Studienkontrolle 69 %, historische Kontrollen 70 %). Bei Aufschlüsselung der Einzelmutationen zeigte sich eine Verschiebung des Mutationsspektrums. Gegenüber den Kontrollen, die überwiegend

CAA → AAA-Mutationen (58 %) und weniger CAA → CGA- (27 %) und CAA → CTA-Mutationen (14 %) aufwiesen, waren in den Tumoren der mit Dichloressigsäure behandelten Tiere CAA → AAA-Mutationen (28 %) reduziert und CAA → CTA-Mutationen (38 %) sowie CAA → CGA-Mutationen (35 %) erhöht. Insgesamt bewerteten die Autoren Mutationen der ras-Protoonkogene als nicht essenziell für die hepatokanzerogene Wirkung von Dichloressigsäure. Sie diskutierten vielmehr, dass Dichloressigsäure einen selektiven Wachstumsvorteil für Zellen mit spontanen Mutationen des Protoonkogens H-ras Codon 61 verursacht (Anna et al., 1994).

Die Befunde von Anna et al. (1994) wurden in einer unabhängigen Untersuchung, in der Lebertumoren von mit 1,0 bzw. 3,5 g Dichloressigsäure/l über 104 Wochen behandelten männlichen B6C3F1-Mäusen hinsichtlich der Aktivierung von ras-Protoonkogenen befundet wurden (siehe Kapitel 7.7 - Langzeitstudien; Ferreira-Gonzalez et al., 1995), weitestgehend bestätigt. Insgesamt wurden 89 hepatozelluläre Karzinome auf K- und H-ras-Mutationen untersucht (32 Spontantumoren bei Kontrolltieren, 33 Tumoren der 3,5 g/l-Gruppe, 13 Tumoren der 1,0 g/l-Gruppe). Die Inzidenzen der Basenmutationen der K- und H-ras-Protoonkogene waren in allen Gruppen ähnlich und betrug bei den Spontantumoren 58 %, in der 1 g/l-Gruppe 46 % und in der 3,5 g/l-Gruppe 50 % (Sequenzanalyse der Polymerase-Kettenreaktion-amplifizierten DNA). Die Autoren stellten dar, dass bei genotoxischen Hepatokanzerogenen in der Regel eine erhöhte Mutationsfrequenz der ras-Protoonkogene festgestellt wird und bei nicht genotoxischen Hepatokanzerogenen diese im Vergleich zu den Kontrollen gleich bleibt oder abnimmt. Neben der Gesamtzahl der Mutationen in K- bzw. H-ras-Protoonkogenen wurde auch deren Spektrum analysiert. Es wurden wiederum nahezu ausschließlich H-ras Codon 61-Mutationen festgestellt, die bei den mit 3,5 bzw. 1,0 g Dichloressigsäure/l behandelten Mäusen zu 21 bzw. 16 % CAA → AAA-Mutationen, zu 50 % (3,5 und 1,0 g/l) CAA → CGA-Mutationen und zu 29 bzw. 34 % CAA → CTA-Mutationen waren. Bei den Spontantumoren der Kontrollen betrug die CAA → AAA-Mutationen 80 % und die CAA → CGA-Mutationen 20 %; CAA → CTA-Mutationen wurden bei den Kontrollen nicht festgestellt. Aufgrund der Verschiebung des Mutationsspektrums im H-ras Codon 61 vermuteten die Autoren, dass eine Aktivierung von ras-Protoonkogenen für die Dichloressigsäure-induzierte Kanzerogenese doch von Bedeutung sein könnte (Ferreira-Gonzalez et al., 1995). Die relative Häufung von CAA → CGA-Mutationen spricht jedoch

nicht für eine mutagene Wirkung von Dichloressigsäure, da gerade diese Mutation als Spontanmutation in den Lebern junger männlicher B6C3F1-Mäuse auftritt und auch in den Elternstämmen der B6C3F1-Mäuse (C3H/He und C57BL/6) bereits bei jungen Tieren nachzuweisen ist. Es wird vielmehr diskutiert, dass die kanzerogene Wirkung von Stoffen, in deren Tumoren eine relative Häufung dieser Mutation auftritt, auf einem nicht genotoxischen Mechanismus beruht, indem die klonale Expansion spontan mutierter Zellen erleichtert wird (vergleiche Moulds und Goodman, 1994). Wie in verschiedenen Studien festgestellt, beeinträchtigt Dichloressigsäure die Apoptose (siehe Carter et al., 1995; Snyder et al., 1995 c) und könnte dadurch die klonale Expansion spontan initiiert Zellen begünstigen.

Bei männlichen B6C3F1-Mäusen, die bis zu 50 Wochen mit 2 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser behandelt worden waren und dann weitere 2 Wochen 0 (Kontrollen), 0,02, 0,5, 1 oder 2 g/l erhielten (Reinheit > 99 %, NaOH-neutralisiert auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2), wurden die Zellproliferationsraten, immunhistochemisch die Onkoproteine c-jun und c-fos und die Färbereigenschaften der proliferativen Veränderungen gemessen. 2 Wochen nach Applikationsbeginn war die Proliferationsrate der Hepatozyten gegenüber der Kontrolle erhöht, nach 4 und 40 Wochen aber deutlich inhibiert. Bei den während der letzten 2 Versuchswochen mit unterschiedlichen Konzentrationen behandelten Tieren zeigte sich, dass in makroskopisch verändertem und c-jun-positivem Lebergewebe die Proliferationsraten dosisabhängig erhöht waren. Die makroskopisch auffälligen Gewebe waren überwiegend immunhistochemisch positiv gegenüber den Onkoproteinen c-jun (hauptsächlich das Zytoplasma) und c-fos (hauptsächlich die Zellkerne), waren basophil und enthielten gegenüber nicht verändertem Gewebe sehr wenig Glykogen. Die Autoren diskutierten, dass c-jun und c-fos, deren Expression auch in Spontantumoren der männlichen B6C3F1-Maus eng mit der Expression von H-ras verknüpft ist, zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren gehören, die die Zellteilung kontrollieren. Die Aktivität dieser Faktoren wird über verschiedene Phosphorylierungsreaktionen geregelt. Sie vermuteten, dass Dichloressigsäure, von der bekannt ist, dass sie über eine Inhibierung der Phosphorylierung die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase hemmt und damit den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aktiviert (siehe Kapitel 7.11 - Pharmakodynamische Wirkungen von Dichloressigsäure), auch an der Regulierung des Zellwachstums beteiligte Kinasen inhibiert (Stauber und Bull, 1997).

In einem Folgeversuch zeigten die Autoren *in vitro*, dass Dichloressigsäure in einem modifizierten Zelltransformationstestsystem (Expansion von „anchorage-independent“ Hepatozyten in einem Weichagar) konzentrationsabhängig positiv wirkte (Inkubation der Hepatozyten männlicher B6C3F1-Mäuse mit 0 bis 2,0 mM über 10 Tage) und dass die transformierten Hepatozyten c-jun-positiv waren. Die Konzentrationsabhängigkeit drückte sich nicht in der Zahl der transformierten Kolonien, sondern nur in der Verminderung der Zeit bis zur Koloniebildung aus. In nicht transformierten Hepatozyten war keine Expression von c-jun feststellbar. Wurden Hepatozyten von mit 0,5 g Dichloressigsäure/l über 2 Wochen vorbehandelten männlichen B6C3F1-Mäusen verwendet, wurde eine deutliche Beschleunigung des nicht kontrollierten Zellwachstums festgestellt, woraus die Autoren schlossen, dass Dichloressigsäure die Wachstums- und Überlebensraten von initiierten Zellen promoviert. Die Autoren vermuteten, dass bei der kurzzeitig nach Dichloressigsäure-Gabe erhöhten Zellproliferation initiierte Zellen klonal expandieren und von der bei fortschreitender Applikation festzustellenden Mitosehemmung nicht betroffen sind (Stauber et al., 1998).

Weibliche B6C3F1-Mäuse haben im Gegensatz zu männlichen Tieren dieses Stammes nur eine sehr niedrige Inzidenz spontaner Lebertumoren, weisen aber in ihren Tumoren den männlichen Tieren entsprechende H-ras Codon 61-Mutationsraten (42 bis 67 %) und -spektren (überwiegend CAA → AAA-Transversionen, weniger CAA → CGA-Transitionen und CAA → CTA-Transversionen) auf. In insgesamt 22 Tumoren von mit 3,5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser über 104 Wochen behandelten weiblichen B6C3F1-Mäusen wurde nur ein Tumor mit einer H-ras Codon 61-Mutation, die eine CAA → CTA-Transversion war, analysiert (Sequenzanalyse der Polymerase-Kettenreaktion-amplifizierten Tumor-DNA). Nach Diskussion der Autoren spricht auch dieser Befund gegen eine kanzerogene Wirkung der Dichloressigsäure aufgrund einer mutationsbedingten Aktivierung des H-ras Codon 61-Protoonkogens (Schroeder et al., 1997).

Bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurde in der eine Stunde nach intraperitonealer Applikation von 1000 mg mit NaOH neutralisierter Dichloressigsäure/kg Körpergewicht isolierten Leber-RNA die Expression eines als IC1 bezeichneten Gens nachgewiesen (Differenzialanalyse nach Polymerase-Kettenreaktion-Amplifikation). Das Gen wies eine 50-prozentige Übereinstimmung mit einer Mausfibroblasten-Wachstumsfaktor-RNA auf. Die Autoren vermuteten, dass dieser Wachstumsfaktor die DNA-Synthese in

Rattenhepatozyten stimuliert und dass die Induktion von IC1 durch Dichloressigsäure über die Erhöhung der hepatozellulären Proliferation an dem nicht gentoxischen Prozess beteiligt ist (Choi und Park, 1996).

Mittels einer Subtraktions-Hybridisierungsmethode wurde im Lebergewebe von männlichen B6C3F1-Mäusen nach Applikation von Dichloressigsäure eine erhöhte Expression von cDNA (cdca2m), die eine 98,7-prozentige Übereinstimmung mit Ratten-S-Adenosylmethionin-synthetase-mRNA und eine 82,4-prozentige Übereinstimmung mit humaner S-Adenosylmethionin-synthetase-mRNA aufwies, gemessen. Im Leberkarzinomgewebe war die Expression von cDNA (cdca2m) deutlich supprimiert (keine weiteren Angaben im englischen Abstract der weitestgehend in Koreanisch abgefassten Arbeit; Shin und Guntaka, 1995).

Gegen einen gentoxischen Mechanismus sprechen auch die Befunde, die in einer Studie erhoben wurden, in der die Menge der methylierten Base 5-Methylcytosin (5MeC) gemessen wurde. Nach Darstellung der Autoren spielt 5MeC eine Rolle bei der Genexpression; eine Hypomethylierung der DNA durch Abnahme der 5MeC-Mengen wird über die Erleichterung der Expression aberranter Gene als nicht gentoxischer epigenetischer Wirkmechanismus einer Tumorpromotion vermutet. Weibliche B6C3F1-Mäuse wurden im Alter von 15 Tagen mit 25 mg N-Methyl-N-nitrosoharnstoff/kg Körpergewicht einmalig intraperitoneal behandelt und erhielten ab einem Alter von 6 Wochen über 43 bzw. 44 Wochen Trinkwasser mit 25 mmol Dichloressigsäure/l (neutralisiert mit NaOH, pH-Wert 6,5 bis 7,5). Einige Tiere erhielten die Dichloressigsäure-Menge über 11 Tage bzw. 44 Wochen ohne eine Vorbehandlung mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff. In den nicht mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff vorbehandelten Gruppen waren die 5MeC-Mengen in der hepatischen DNA nach 11-tägiger Behandlung signifikant reduziert und entsprachen nach 44 Wochen den Werten der Kontrollen. Bei den mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff behandelten Tieren waren die 5MeC-Mengen im nicht veränderten Lebergewebe nicht abweichend von denen der Kontrollen und in den Adenomen dieser Tiere signifikant reduziert. In den Adenomen der Tiere, die nach der N-Methyl-N-nitrosoharnstoff-Gabe 43 Wochen mit Dichloressigsäure behandelt worden waren und nach 44 Wochen befundet wurden, waren die 5MeC-Mengen nicht mehr reduziert. Bereits früher hatte diese Arbeitsgruppe gezeigt (Pereira und Phelps, 1996; siehe Kapitel 7.7 - Langzeitstudien), dass sich durch Dichloressigsäure induzierte Adenome und hyperplastische Knoten nach Beendigung der Stoffapplikation zurückbilden (Ge et al., 1998; Tao et al., 1998).

In einem Folgeversuch wies die Arbeitsgruppe nach, dass bei weiblichen B6C3F1-Mäusen, die über 5 Tage mit 500 mg Dichloressigsäure (mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 bis 7,5 neutralisiert)/kg Körpergewicht/Tag per Schlundsonde behandelt worden waren, die Promotorregionen der Protoonkogene c-jun und c-myc hypomethyliert sowie die Expression deren mRNA und die Mengen an c-jun- und c-myc-Proteinen erhöht waren. Methionin, 30 Minuten nach jeder Dichloressigsäure-Gabe intraperitoneal appliziert, verhinderte ab einer Menge von 100 mg/kg Körpergewicht dosisabhängig die Hypomethylierung und konsekutiv die Expression der entsprechenden mRNA und Proteine. Die Autoren diskutierten, dass Dichloressigsäure eventuell über eine Depletion von S-Adenosylmethionin zu einer Hypomethylierung der Protoonkogene c-jun und c-myc führt, dadurch die Kontrolle der Zellproliferation und der Apoptose verändert und letztlich als epigenetisches Kanzerogen wirkt (Tao et al., 2000).

- **Untersuchungen zur Frage, inwieweit durch Dichloressigsäure induzierte biochemische und morphometrische Veränderungen für die kanzerogene Wirkung von Bedeutung sind**

In kanzerogenen Dosen führte Dichloressigsäure zu einer starken Glykogenanreicherung in der Leber, wobei aber die initiierten Zellen bzw. die Tumorzellen selbst arm an Glykogen waren. Bei über 2 Wochen mit kanzerogenen Dosen (0,2 bis 2,0 g/l Trinkwasser) behandelten männlichen B6C3F1-Mäusen und der Untersuchung von Tumoren aus Langzeitversuchen (DeAngelo et al., 1999; siehe Kapitel 7.7 - Langzeitstudien) wurde ferner festgestellt, dass sowohl initiierte Zellen als auch Tumorzellen erhöhte Mengen des Insulin-Rezeptor-Proteins aufwiesen, während die entsprechenden Werte im nicht initiierten Lebergewebe und im Serum stark abnahmen. Die Autoren vermuteten, dass diese Unterschiede zur kanzerogenen Wirkung von Dichloressigsäure beitragen (Kato-Weinstein et al., 1998; Lingohr et al., 2001).

In anschließenden in vitro-Untersuchungen an Hepatozyten der B6C3F1-Maus stellten die Autoren fest, dass die durch Dichloressigsäure induzierte Glykogenanreicherung keine Folge eines reduzierten Glykogenabbaus ist, sondern unabhängig von der verfügbaren Insulinmenge über einen Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängigen Mechanismus erfolgt (Lingohr et al., 2002).

Zur genaueren Untersuchung der durch Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %) induzierten hepatozellulären Veränderungen erhielten männliche B6C3F1-Mäuse über 2, 5 und 14 Tage den Stoff in Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 0,3, 1,0 bzw. 2,0 g/l mit dem Trinkwasser (eingestellt auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2 mit NaOH). Die Körper- und Nierengewichte wurden durch die Behandlung nicht verändert. Dosisabhängig war das relative Lebergewicht in der mittleren Dosisgruppe nach 14 Tagen und in der oberen Dosisgruppe nach 5 und 14 Tagen erhöht. Die Hepatozyten waren nach 14 Tagen in den beiden oberen Dosisgruppen vergrößert und wiesen eine starke Glykogenanreicherung auf. In diesen Dosisgruppen kam es ferner zu fokalen Koagulationsnekrosen mit akuten Entzündungen und multiplen Mitosen. Insgesamt war korrelierend mit der Lebergewichtserhöhung die DNA-Konzentration herabgesetzt. Der Anteil [³H]-Thymidin-markierter Zellen (Verabreichung von [³H]-Thymidin 2 Stunden vor der Befundung) war in der oberen Dosisgruppe nach 14 Tagen besonders im Randbereich der nekrotischen Veränderungen stark erhöht. Die Messung der [³H]-Thymidin-Inkorporation in die Gesamtleber-DNA ergab nach 5 Tagen in der oberen Dosisgruppe einen signifikant erhöhten Wert und nach 14 Tagen in der unteren Dosisgruppe einen signifikant herabgesetzten Wert. Soweit befundet, wurden in einem orientierenden Versuch auch bei männlichen und weiblichen Swiss-Webster-Mäusen, die mit 1 bzw. 2 g/l behandelt worden waren, vergleichbare Veränderungen festgestellt. Aus diesen Befunden schlossen die Autoren, dass eine reparative Hyperplasie als Folge nekrotischer Gewebeschäden einen wesentlichen Anteil an der hepatokanzerogenen Wirkung von Dichloressigsäure hat (Sanchez und Bull, 1989, 1990).

Diese Schlussfolgerung steht allerdings nicht im Einklang mit den Befunden einer späteren Studie anderer Autoren. Gruppen von 28 Tage alten männlichen B6C3F1-Mäusen erhielten bis zu 30 Tage 0,5 bzw. 5,0 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser (neutralisiert auf pH 6,8 bis 7,2 mit NaOH, Kontrollen erhielten destilliertes Wasser). Ab 5 Tage vor der jeweiligen Befundung wurden den Tieren über implantierte Minipumpen in vivo insgesamt 200 µCi [³H]-Thymidin verabreicht. In der oberen Dosisgruppe war die Körpergewichtsentwicklung retardiert und die Trinkwasseraufnahme stark reduziert. Bezogen auf den Trinkwasserverbrauch und die Körpergewichte lagen die mittleren täglichen Dosen in Abhängigkeit von der Expositionszeit in der 0,5 g/l-Gruppe zwischen 109 (nach 5 Tagen) und 87 mg/kg Körpergewicht (nach 30 Tagen) und in der 5,0 g/l-Gruppe zwischen 420 (nach 5

Tagen) und 490 mg/kg Körpergewicht (nach 30 Tagen). Alle 5 Tage wurden 5 Tiere jeder Dosisgruppe getötet und jeweils das absolute und das relative Lebergewicht, in Leberschnitten histopathologische Veränderungen, histomorphometrisch die Hepatozytendichte (Cellularity), Zellkerngröße, Anzahl der ein- und mehrkernigen Zellen und die Apoptose (programmierter Zelltod; Zelluntergang, der im Gegensatz zur Nekrose durch genetische Informationen der betroffenen Zelle selbst reguliert wird, mit nachfolgendem Abbau), autoradiographisch die Zellproliferation (Bestimmung des „labeling index“, der Prozentzahl der Zellen mit [³H]-Thymidin-markiertem Zellkern) und im Leberhomogenat die DNA-Dichte und die spezifische [³H]-Thymidin-Aktivität (dpm/μg DNA) bestimmt. Die Behandlung mit Dichloressigsäure führte zu einer signifikanten dosis- und zeitabhängigen Erhöhung der absoluten und der relativen Lebergewichte. In der unteren Dosisgruppe war ab einer Behandlungsdauer von 10 Tagen das relative Lebergewicht erhöht, überschritt aber zu keinem Befundungszeitpunkt 116 % der Kontrolle. In der oberen Dosisgruppe lag am 5. Behandlungstag das relative Lebergewicht 16 % über der Kontrolle und war ab einer Behandlungsdauer von 20 Tagen gegenüber den Kontrollen verdoppelt. Die spezifische [³H]-Thymidin-Aktivität der DNA in der 5 g/l-Gruppe war nach einer anfänglichen starken Reduzierung nach 5 Behandlungstagen (42,8 % der Kontrolle) nach 15 und 20 Behandlungstagen stark erhöht (265 bzw. 245 % der Kontrollen) und entsprach nach 25 und 30 Behandlungstagen der der Kontrollen. Die Autoren diskutierten, dass aus einer erhöhten spezifischen [³H]-Thymidin-Aktivität im Leberhomogenat nicht zwingend auf eine erhöhte Proliferationsrate der Hepatozyten geschlossen werden kann, da z. B. auch Kupffer-Zellen, die eine sehr hohe [³H]-Thymidin-Aktivität aufweisen, gemessen werden und dadurch das Ergebnis verfälscht wird. Der für die Beurteilung der Hepatozytenproliferation geeignetere Parameter ist der „labeling index“ und dieser war nach 5, 10, 20 und 25 Behandlungstagen stark vermindert (nur 8,5 % des Wertes der Kontrolle nach 5 Tagen), nach 30 Tagen war die Reduzierung gegenüber der Kontrolle nicht mehr signifikant. Außerdem waren die Hepatozytendichten und die DNA-Konzentrationen in der Leber reduziert, die Zellkerne zahlreicher einkerniger Zellen stark vergrößert und nach den Autoren vermutlich tetraploid, wiesen die Hepatozyten starke Glykoganreicherungen auf und war die Apoptose stark herabgesetzt. In der 0,5 g/l-Gruppe war ein gleichsinniger Trend für die einzelnen Parameter zu erkennen, doch waren die Veränderungen nicht immer signifikant. Aus den Befunden schlossen die Autoren, dass die

Lebervergrößerung auf eine Hypertrophie und nicht Hyperplasie zurückzuführen ist, die Mitoseaktivität der Hepatozyten durch Dichloressigsäure stark herabgesetzt und nicht, wie von anderen Autoren vermutet (Bull et al., 1990; Sanchez und Bull, 1989, 1990), die Proliferationsrate erhöht wird, sowie Schutzmechanismen, durch die initiierte Zellen abgestoßen werden (Apoptose), unterdrückt werden - Veränderungen, die nach Diskussion der Autoren bei nicht genotoxischen Tumorpromotoren häufig zu beobachten sind (Carter et al., 1991, 1995; DeAngelo und Chavis, 1991; Snyder et al., 1995 a, b, c; siehe auch Kapitel 7.7 - Langzeitstudien, Carter et al., 1998; DeAngelo et al., 1999).

Die inhibierende Wirkung auf die Mitose wurde von der Arbeitsgruppe in einem unabhängigen Experiment an männlichen B6C3F1-Mäusen und F344-Ratten nochmals bestätigt. Im Trinkwasser erhielten die Mäuse 0 (Kontrollen), 0,5, 1, 2 bzw. 3,5 g Dichloressigsäure/l über 5, 15 oder 30 Tage und die Ratten 0 (Kontrollen), 0,05, 0,5 bzw. 1,5 g/l über 5, 10, 15 oder 28 Tage. Die Messung des „labeling index“ nach entsprechender Markierung ergab für die Mäuse der 2 und der 3,5 g/l-Gruppe nach 5 und 15 Tagen und die der 0,5 und der 1 g/l-Gruppe nach 15 Tagen signifikant reduzierte Werte. Nach 30 Tagen wurde bei den Mäusen keine Veränderung des „labeling index“ mehr gemessen. Bei den Ratten war der „labeling index“ in der oberen Dosisgruppe nach 5 und 10 Tagen und in der mittleren Dosisgruppe nach 10 Tagen signifikant reduziert. Zu keinem Zeitpunkt wurde eine Erhöhung des „labeling index“ gemessen. Im Rahmen dieses Versuches wurde außerdem die Aktivität hepatischer Glukokortikoidrezeptoren bei männlichen B6C3F1-Mäusen gemessen, die nach Applikation von Dosen > 0,5 g/l im Zytosol reduziert und in Kernfraktionen erhöht war (keine weiteren Angaben; DeAngelo und Eldrich, 1996; DeAngelo und McFadden, 1995).

Die Cholesterinsynthese (Inkorporation von [2-¹⁴C]-Acetat in das Cholesterin der Hepatozyten) und die DNA-Synthese (Inkorporation von [³H]-Thymidin in die DNA der Hepatozyten) wurden als Marker für die Zellproliferation untersucht. Primäre Kulturen von Hepatozyten der männlichen F344-Ratte wurden mit 1 mM Dichloressigsäure über 48, 60 bzw. 72 Stunden inkubiert. Nach 48 und 72 Stunden war die Cholesterinsynthese in den Kulturen signifikant gesteigert. Die DNA-Synthese lag nach 48 Stunden im Bereich der Kontrollen (DMSO) und war nach 60 und 72 Stunden signifikant erhöht (Reddy et al., 1992).

Die [³H]-Thymidininkorporation in die Leber-DNA wurde bei männlichen B6C3F1-Mäusen, die bis zu 90 Tage 3,5 g Dichloressigsäure/l Trinkwasser erhielten, gemessen. Ferner wurden primäre Hepatozytenkulturen angelegt und in vitro die Effekte des epidermalen Wachstumsfaktors, des Hepatozytenwachstumsfaktors, des sauren Fibroblastenwachstumsfaktors und des Mitose hemmenden transformierenden Wachstumsfaktors β untersucht. Bis zu 20 Tage nach der Applikation unterschied sich die [³H]-Thymidininkorporation der mit Dichloressigsäure behandelten Tiere nicht von den Kontrollen, danach war sie signifikant reduziert. Bezüglich der Wachstumsfaktoren fand sich kein Unterschied zwischen den Lebern der vorher mit Dichloressigsäure behandelten und den Lebern der Kontrolltiere. Die Daten ließen vermuten, dass die Wachstumsfaktoren bei der Kanzerogenese durch Dichloressigsäure nicht beteiligt sind (Tsai und DeAngelo, 1993, 1996).

Dichloressigsäure wurde in vitro hinsichtlich seiner Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation (gap junction intercellular communication) von Clone 9-Rattenhepatozyten untersucht. Nach Darstellung der Autoren kann eine Störung der interzellulären Kommunikation dazu führen, dass das Wachstum initiiert Zellen durch ihre Nachbarzellen nicht mehr kontrolliert und dadurch die klonale Expansion dieser Zellen und letztlich die Tumorbildung begünstigt wird - ein Mechanismus, der bei nicht genotoxischen Karzinogenen von Bedeutung sein soll. Die Konzentrationen betragen 0 (Kontrolle), 5, 10 bzw. 50 mM (ca. 645, 1289 bzw. 6447 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und die Expositionszeiten 1, 4, 6, 24, 48 bzw. 168 Stunden. 5 mM waren ohne Effekt. 10 mM führten bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden und 50 mM bei allen Expositionszeiten zu einer signifikanten Hemmung der interzellulären Kommunikation gegenüber der Kontrolle. Für eine 50-prozentige, 24 Stunden anhaltende Reduktion der interzellulären Kommunikation war eine Konzentration von 41 mM (5285 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erforderlich (Benane et al., 1994, 1996).

Weitere Untersuchungen zu biochemischen, Zell- und Gewebeeffekten von Dichloressigsäure sind im Rahmen des amerikanischen National Toxicology Program projektiert (NTP, 2003).

7.8 Reproduktionstoxizität

In einer Embryotoxizitäts-/Teratogenitätsstudie erhielten Long-Evans-Ratten an den Tagen 6 bis 15 der Trächtigkeit 0, (Kontrolle), 14, 140, 400,

900, 1400, 1900 oder 2400 mg Dichloressigsäure (Reinheit > 99 %)/kg Körpergewicht als wässrige, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellte Lösung oral per Schlundsonde und wurden am 20. Gestationstag befundet. Die Mortalität war in den 3 oberen Dosisgruppen, in denen 1 von 19, 2 von 19 bzw. 5 (ein Tier starb unfallbedingt) von 21 trächtigen Muttertieren starben, erhöht. Im Vergleich zur mit Wasser behandelten Kontrollgruppe war mit Ausnahme der untersten Dosisgruppe die Körpergewichtsentwicklung der Muttertiere in allen Dosisgruppen dosisabhängig retardiert. Die Applikation von Dichloressigsäure führte in allen Dosisgruppen zu einer Erhöhung des relativen Lebergewichts und in den Dosisgruppen ≥ 400 mg/kg Körpergewicht auch zu einer Erhöhung der relativen Gewichte von Nieren und Milz. Der Prozentsatz der Postimplantationsverluste war in den Dosisgruppen ≥ 900 mg/kg Körpergewicht erhöht und die Zahl der lebenden Feten/Wurf in der obersten Dosisgruppe herabgesetzt. Ab einer Dosierung von 400 mg/kg Körpergewicht waren Gewicht und Körperlänge der Feten reduziert. Die Zahl der männlichen Feten im Verhältnis zur Zahl der weiblichen Feten war in der obersten Dosisgruppe signifikant erhöht. Dichloressigsäure induzierte dosisabhängig viszerale Missbildungen, von denen in den Dosisgruppen 140 bis 2400 mg/kg Körpergewicht dosisabhängig 2,6 bis 73 % der Feten betroffen waren. Die weitaus am häufigsten auftretenden Missbildungen betrafen das kardiovaskuläre System und dort fast ausschließlich den Bereich zwischen der aufsteigenden Aorta und dem rechten Ventrikel. Weitere dosisabhängige Veränderungen betrafen das Urogenitalsystem (Hydronephrose) und traten ab Dosierungen von ≥ 1400 mg/kg Körpergewicht auf. Die Inzidenzen skelettaler Missbildungen waren nicht erhöht. Missbildungen traten nur in maternaltoxischen Dosisbereichen auf (maternaler no observed adverse effect level (NOAEL) < 14 mg/kg Körpergewicht (unterste geprüfte Dosis)). Der NOAEL für reproduktionstoxische Effekte betrug 14 mg/kg Körpergewicht (Randall et al., 1991; Roth et al., 1991; Smith et al., 1992).

In einer Folgestudie wurden 7 bis 10 Long-Evans-Ratten/Gruppe mit 1900 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht an den Trächtigkeitstagen 6 bis 8, 9 bis 11 oder 12 bis 15, mit 2400 mg/kg Körpergewicht an den Trächtigkeitstagen 10, 11, 12 oder 13 sowie mit 3500 mg/kg Körpergewicht an den Trächtigkeitstagen 9, 10, 11, 12 oder 13 behandelt. 6 Ratten wurden an den Gestationstagen 6 bis 15 mit 1900 mg/kg Körpergewicht behandelt. Dichloressigsäure (Reinheit ≥ 99 %) wurde wie in der vorangegangenen Stu-

die als wässrige, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellte Lösung oral per Schlundsonde appliziert. In keiner Dosisgruppe kam es bei den Muttertieren zu Körper- oder Organgewichtsveränderungen. Die Feten wurden ausschließlich hinsichtlich Missbildungen des kardiovaskulären Systems befundet. Nach Gabe von 1900 mg/kg Körpergewicht an den Tagen 6 bis 8 traten keine Missbildungen auf. Wurden die Muttertiere an den Gestationstagen 9 bis 11 mit dieser Dosis behandelt, wiesen 7,2 % und nach Gabe an den Gestationstagen 12 bis 15 15,1 % der Feten Missbildungen auf. Eine Behandlung an den Gestationstagen 6 bis 15 mit 1900 mg/kg Körpergewicht führte bei 45 % der Feten zu Missbildungen. Nach Applikation von 2400 mg/kg Körpergewicht an den Gestationstagen 10 oder 12 und von 3500 mg/kg an den Gestationstagen 9, 10 oder 12 wurden bei jeweils nur 2,5 bis 3,6 % der Feten Missbildungen festgestellt, während die Feten der am 11. oder 13. Gestationstag mit einer Einzeldosis behandelten Muttertiere keine pathologischen Befunde am kardiovaskulären System aufwiesen. Als Missbildungen traten vor allem intraventrikuläre Septumdefekte in Höhe der Semilunarklappen auf (Epstein et al., 1992; Roth et al., 1991).

Nur als Abstract wurde publiziert, dass die orale Verabreichung per Schlundsonde von 0 (Kontrollen), 0,23, 0,47, 0,93, 1,9, 3,7, 5,6 oder 7,4 mmol (ca. 30 bis 954 mg) Dichloressigsäure/kg Körpergewicht/Tag an den Gestationstagen 6 bis 15 bei der CD-1-Maus keine signifikanten reproduktionstoxischen Effekte induziert hat. Es schien sich nach Diskussion der Autoren jedoch ein Trend abzuzeichnen, dass in den oberen beiden Dosisgruppen die Geburt verzögert und die perinatale Mortalität erhöht war (keine weiteren Angaben). Die Jungtiere wurden bis zum 6. Tag post partum nachbeobachtet. Jeweils ein Jungtier in der 1,9 und der 7,4 mmol/kg Körpergewicht-Dosisgruppe hatte eine Spina bifida aperta, was von den Autoren als möglicherweise substanzbedingt diskutiert wurde. Die Muttertiere wiesen als einzigen Befund ein gesträubtes Fell auf (keine weiteren Angaben; Narotsky et al., 1996).

Am 9. Gestationstag explantierte Embryonen der CD-1-Maus wurden für 24 bis 26 Stunden in hitzeinaktiviertem Rattenserum mit Dichloressigsäure in Konzentrationen von 734 bis 14680 μM (ca. 95 bis 1893 mg/l) inkubiert. Konzentrationen $\geq 5871 \mu\text{M}$ (ca. 757 mg/l) induzierten Neuralrohrdefekte, höhere Konzentrationen auch Defekte am Herz, den Augen und am Pharynx. Die Bildung freier Radikale war an der Entstehung dieser Defekte nicht beteiligt (Hunter und Rogers, 1995; Hunter et al., 1996).

In einem Folgeversuch an 3 bis 6 im Somitenstadium explantierten Embryonen von CD-1-Mäusen prüfte die Arbeitsgruppe den Einfluss von Dichloressigsäure auf den Zellzyklus und die Apoptose. Es wurden Konzentrationen geprüft, die eine 100-prozentige Embryotoxizität, aber keine erhöhte Embryoethalität induzieren (keine weiteren Angaben). Der Zellzyklus wurde durch die Behandlung mit Dichloressigsäure nicht verändert, allerdings zeigten sich, besonders in der Kopfreion, Hinweise auf tote Zellen. Die Apoptose im Proenzephalon war erhöht. In der Herzregion wurde keine Apoptose festgestellt. Die Autoren vermuteten eine veränderte Apoptose als relevant für die embryotoxische Wirkung von Dichloressigsäure (Ward et al., 1998).

Die Inkubation von am 10. Gestationstag explantierten Embryonen der Sprague-Dawley-Ratte mit 1 bis 10 mM Dichloressigsäure (Reinheit 99 %, 128,95 bis 1289,5 mg/l) für 48 Stunden führte bei den Embryonen konzentrationsabhängig zu Entwicklungsretardierungen sowie ab 2,5 mM (ca. 322 mg/l) auch zu Missbildungen des Herzens und im Kraniofazialbereich (Saillenfait et al., 1995).

In einem in vitro-Fertilitätsversuch mit Oozyten und Spermien der B6D2F1-Maus (C57BL/6 x DBA/2) kam es nach Inkubation mit 100 oder 1000 ppm Dichloressigsäure zu einer konzentrationsunabhängigen Reduzierung der Befruchtungsraten (Kontrolle 87 %, 100 ppm Dichloressigsäure 67,3 %, 1000 ppm Dichloressigsäure 71,8 %; Cosby und Dukelow, 1992).

Wie im Kapitel 7.5 berichtet, hat die subchronische orale Applikation von Dichloressigsäure beim Hund und der Ratte dosisabhängige degenerative Hodenveränderungen, die durch eine makroskopische Verkleinerung des Organs, degenerative Veränderungen des Keimepithels mit Riesenzellbildung, vergrößerten Sertoli-Zellen, atrophischen Samenkanälchen und dem Fehlen von Spermatogonien bzw. Spermien in den Hoden und den Nebenhoden gekennzeichnet waren, verursacht. Histopathologische Hodenveränderungen und eine Atrophie der Prostata wurden beim Hund bereits in der untersten geprüften Dosisgruppe von 12,5 mg/kg Körpergewicht/Tag (Applikation in Gelatine kapseln) festgestellt. Bei der Ratte traten Hodenschäden erst nach Applikation von 500 mg/kg Körpergewicht (Schlundsondenapplikation) auf (siehe Kapitel 7.5; Cicmanec et al., 1991; Bhat et al., 1991; Katz et al., 1981).

Zur genaueren Untersuchung der durch Dichloressigsäure an den Keimdrüsen verursachten Schäden erhielten je 18 bis 19 männliche Long-

Evans-Ratten (Ausgangsalter 100 Tage) 10 Wochen lang täglich 0 (Kontrollen), 31,25, 62,5 oder 125 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht oral per Schlundsonde. Nach der letzten Behandlung wurden die Tiere mit je einem unbehandelten Weibchen verpaart und 5 Tage danach getötet. Die Weibchen wurden am Gestationstag 14 getötet und ihre Uteri untersucht. Die Befundung umfasste die Körpergewichtsentwicklung, die Gewichtsbestimmung von Leber, Nieren, Milz, Hoden, akzessorischen Geschlechtsorganen (Prostata und Samenblasen), Vorhautdrüsen und Nebenhoden, die Menge und Motilität der Spermien sowie die histopathologische Befundung der Hoden und Nebenhoden. Dosisabhängig waren bereits ab der untersten geprüften Dosis von 31,25 mg/kg Körpergewicht die Körpergewichtsentwicklung retardiert, das relative Lebergewicht erhöht sowie die absoluten Gewichte von Präputialdrüsen und Nebenhoden reduziert. Ab 62,5 mg/kg Körpergewicht waren die relativen Gewichte der Präputialdrüsen und der Nebenhoden reduziert, die relativen Gewichte von Nieren und Milz und das absolute Lebergewicht erhöht sowie bei 125 mg/kg Körpergewicht zusätzlich das absolute Gewicht der akzessorischen Geschlechtsorgane reduziert und das relative Hodengewicht erhöht. Die Gesamtmenge der Spermien, ihre Motilität und der Anteil normaler intakter Spermien waren in den beiden oberen Dosisgruppen reduziert. Bei der histopathologischen Befundung zeigte sich in den beiden oberen Dosisgruppen eine Hemmung der Spermio-genese. Es wurden aber weder eine Atrophie der Samenkanälchen, eine Hyper- oder Hypoplasie der Leydig-Zellen noch Veränderungen der Nebenhoden festgestellt. Die Fertilität war in der obersten Dosisgruppe, in der die Zahlen der trächtigen Weibchen und der Implantate/Weibchen reduziert waren, beeinträchtigt (Toth et al., 1992).

In einem weiteren Versuch zur hodentoxischen Wirkung von Dichloressigsäure wurden Gruppen von je 6 bis 8 männlichen Sprague-Dawley-Ratten/Dosis und Befundungszeitpunkt einmal mit 1500 oder 3000, an zwei Tagen mit 1440, an 5 Tagen mit 480 oder 1440, an 9 Tagen mit 160, 480 oder 1440 sowie an 14 Tagen mit 18, 54, 160, 480 oder 1440 mg/kg Körpergewicht/Tag behandelt. Die Verbindung mit einer Reinheit von > 99 % wurde, eingestellt mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5, per Schlundsonde verabreicht. Die einmal behandelten Tiere wurden 2, 14 oder 28 Tage nach der Applikation und die mehrmals behandelten Tiere 24 Stunden nach der letzten Applikation getötet. Die Befundung umfasste das Körpergewicht, das Gewicht der Hoden und Nebenhoden, die Spermienmenge und -motili-

tät, nach spezieller Aufarbeitung der Hoden und Nebenhoden die histopathologische Beurteilung der verschiedenen Stadien der Spermatogenese sowie eine Testosteronbestimmung im Serum. Die Körpergewichtsentwicklung war, außer nach Gabe von 18 oder 54 mg/kg Körpergewicht, dosisabhängig retardiert. Eine behandlungsbedingte Beeinträchtigung der Hodengewichte wurde nicht festgestellt; das Gewicht der Nebenhoden war nur bei den über 14 Tage mit 480 oder 1440 mg/kg Körpergewicht/Tag behandelten Tieren signifikant vermindert. In den durchgeführten Spermioogrammen waren dosisabhängig und in Abhängigkeit von der Applikationsdauer in allen mit Dichloressigsäure behandelten Gruppen die Spermienmenge, -motilität und/oder -reifung reduziert. Die Testosteronmengen im Serum waren in keiner Dosisgruppe verändert. Spermienkopfanomalien traten nach der 14-tägigen Applikation von 480 und 1440 mg/kg Körpergewicht sowie verschmolzene Spermien in den Nebenhoden ab einer 5-tägigen Applikation von Dosen ≥ 160 mg/kg Körpergewicht auf. Selbst 28 Tage nach einer einmaligen Applikation von 1500 mg/kg Körpergewicht war die Spermienreifung noch verzögert (Linder et al., 1997).

7.9 Wirkungen auf das Immunsystem

Die Befundung immunologischer Parameter (Antikörperbildung, verzögerte Hypersensitivität, Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen, Produktion von Prostaglandin PGE₂ und Interleukin IL₂) im Rahmen einer subchronischen Studie an der männlichen Sprague-Dawley-Ratte mit Applikation von bis zu 5000 ppm Dichloressigsäure im Trinkwasser (ca. 345 mg/kg Körpergewicht/Tag) ergab keinen Hinweis auf eine schädigende Wirkung von Dichloressigsäure auf das Immunsystem (siehe Kapitel 7.5; Mather et al., 1990).

In vitro wurden aus der Milz gewonnene Mauslymphozyten mit Dichloressigsäure in Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-4} mol/l für 8 Stunden inkubiert. Den Inkubationsmedien wurden außerdem das T-Zellmitogen Concanavalin A (2 µg/ml) oder das B-Zellmitogen Lipopolysaccharid (100 µg/ml) zugesetzt. Aus einer Wachstumsinhibierung der T-Zellen (die B-Zellen blieben unbeeinflusst) schlossen die Autoren, dass Dichloressigsäure möglicherweise die zelluläre Immunreaktion beeinträchtigen könnte (keine weiteren Angaben; Ueno et al., 1999).

7.10 Neurotoxizität

Dichloressigsäure induzierte bei Ratte und Hund in subchronischen Studien degenerative Veränderungen des ZNS. Selbst die untersten geprüften Dosen von nur 12,5 mg/kg Körpergewicht/Tag beim Hund (Verabreichung in Gelatinekapseln) bzw. von ca. 16 mg/kg Körpergewicht/Tag bei der Ratte (Trinkwasserapplikation in einer spezifischen 12-Wochen-Neurotoxizitätsstudie) verursachten noch nicht reversible degenerative Schädigungen des ZNS. Die dosisabhängigen Schädigungen des ZNS äußerten sich klinisch in einer Paralyse der Hinterextremitäten und histopathologisch in einer Vakuolisierung der markhaltigen weißen Bereiche im Großhirn, Kleinhirn und/oder Rückenmark. Das periphere Nervensystem war, wie auch der Sehnerv, frei von histopathologischen Veränderungen (siehe z. B. Bhat et al., 1991, und Katz et al., 1981, im Kapitel 7.5).

Nachdem insbesondere in den subchronischen Studien am Hund und an der Ratte degenerative Veränderungen des zentralen Nervensystems, in einigen Studien auch eine Paralyse der Hinterextremitäten sowie im Rahmen der Erprobung von Dichloressigsäure zur Behandlung von Stoffwechselkrankheiten bei Probanden eine periphere Neuropathie befundet wurden (siehe Stacpoole et al., 1979, Kurlemann et al., 1995, und Moore et al., 1979, im Kapitel 8), wurde von der amerikanischen Environmental Protection Agency (EPA) in zahlreichen Teilversuchen die neurotoxische Wirkung von Dichloressigsäure (Reinheit $\geq 99\%$, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt) untersucht. Junge und alte Ratten der Stämme Fischer-344 und Long-Evans wurden akut, subchronisch bzw. chronisch per Schlundsonde oder via Applikation im Trinkwasser mit dem Stoff behandelt und umfangreichen „functional observational battery“-Prüfungen und Testen hinsichtlich ihrer motorischen Aktivität unterzogen. Zusätzlich wurden noch klinische Symptome, Körpertemperatur und Gewichtsentwicklung befundet. Der Aufbau und die detaillierten Befunde der einzelnen Studien sind in [Tabelle 12](#) im Anhang zusammengefasst. Bereits nach akuter Schlundsondenapplikation kam es ab einer Dosis von 300 mg/kg Körpergewicht zu einer kurzzeitigen Verminderung der Griffstärke der Hinterextremitäten, einem charakteristischen Symptom der neurotoxischen Wirkung von Dichloressigsäure. Die subchronische und die chronische Applikation von Dichloressigsäure mit dem Trinkwasser führte in allen Teilstudien bis in den untersten geprüften Dosisbereich (ca. 16 mg/kg Körpergewicht/Tag über 12 Wochen bzw. 137 mg/kg Körpergewicht/Tag über 2 Jahre) zu neurologi-

schen Veränderungen, die sich insbesondere in einer Beeinträchtigung des Ganges und einer Schwäche der Hinterextremitäten äußerten. Weitere Befunde waren eine reduzierte Griffstärke der Vorder- und Hinterextremitäten, Haltungsstörungen, erhöhte Extremitätenspreizung bei einem Fall aus 30 cm Höhe, Beeinträchtigung bzw. Ausfall des Stellreflexes und des Pupillenreflexes sowie leichter Tremor. In den oberen Dosisgruppen kam es meist zu einer Körpergewichtsretardierung. Bei Aufnahme vergleichbarer Dosen führte die Applikation im Trinkwasser zu intensiveren Veränderungen als die Applikation per Schlundsonde, waren die Veränderungen bei jungen Tieren (28 bis 30 Tage alt bei Versuchsbeginn) stärker ausgeprägt als bei älteren Tieren (68 bis 80 Tage alt bei Versuchsbeginn) und reagierten F344-Ratten empfindlicher als Long-Evans-Ratten. Die Inzidenz und die Intensität der einzelnen Veränderungen korrelierten mit der Dosishöhe und der Behandlungsdauer. Neurohistopathologische Befundungen, die nur an Einzeltieren einer chronischen Teilstudie durchgeführt wurden, zeigten, dass ein sehr eng begrenzter Bereich des Rückenmarks pathologische Veränderungen aufwies: Im Bereich des Fasciculus gracilis der Hinterstrangbahn des grauen Rückenmarks bestanden eine ausgeprägte Gliosis mit Verlust der myelinisierten Axone und große granuläre Strukturen; die Autoren diskutierten, dass es sich dabei möglicherweise um dystrophische Axone handelt. Das periphere Nervensystem wies keine pathologischen Veränderungen auf und im Bereich des Gehirns war auch keine Vakuolisierung festzustellen. Wie sich bei Tieren, die nach einer 3-monatigen Applikation von 172 mg/kg Körpergewicht/Tag 14 Wochen bzw. nach einer 6-monatigen Applikation von 235 mg/kg Körpergewicht/Tag 18 Monate nachbeobachtet wurden, zeigte, waren die neurologischen Veränderungen nur sehr langsam und auch nicht vollständig reversibel. Ein no observed effect level (NOEL) für die Induktion von neurologischen Veränderungen bei Ratten kann anhand dieser Studien nicht angegeben werden, da auch noch die unterste geprüfte Dosis von nur 16 mg/kg Körpergewicht/Tag, die 12 Wochen lang mit dem Trinkwasser appliziert worden war, pathologische Veränderungen induziert hat (Moser et al., 1999).

Nur in Form eines Abstracts wurde berichtet, dass die bis zu 20-wöchige Verabreichung von Trinkwasser mit 2 g Natriumdichloracetat/l bei männlichen CD-CRL:COBS CD (SD)BR-Ratten im Gehirn und Rückenmark eine ausgedehnte Vakuolisierung des Myelins und dystrophische und degenerative Veränderungen einzelner Axone verursacht hat. Im peripheren Ner-

vensystem kam es nur zu minimalen Schäden. Die Autoren wiesen noch darauf hin, dass diese Schäden möglicherweise durch eine gestörte Energieversorgung der Nerven verursacht werden (keine weiteren Angaben; Spencer et al., 1981)

Zur Untersuchung, ob diese Schäden durch einen durch Dichloressigsäure induzierten Thiamin-Mangel verursacht werden, wurden je 15 männlichen Sprague-Dawley-Ratten 7 Wochen lang 0 (Kontrollen), 50, 1000 bzw. 1100 mg Natriumdichloracetat (> 99-prozentig)/kg Körpergewicht/Tag über das Trinkwasser verabreicht. Weitere Gruppen erhielten die gleichen Dosen plus dreimal wöchentlich 0,6 mg Thiamin (Vitamin B1) intraperitoneal oder die gleiche Thiamin-Dosis täglich oral. Der Thiamin-Status wurde durch Bestimmung der Transketolase-Aktivität verfolgt. 50 mg/kg Körpergewicht bewirkten keine neurotoxischen Symptome (Muskelschwäche der Hinterbeine) und keine Änderung der Transketolase-Aktivität. 1100 mg/kg Körpergewicht hatten dagegen starke Symptome zur Folge und senkten die Enzymaktivität um 25 %. Bei gleichzeitiger Gabe von Thiamin waren die neurologischen Symptome deutlich reduziert und die Transketolase-Aktivität normal. Die Autoren sahen durch die Befunde ihre Meinung bestätigt, dass die neurotoxischen Effekte durch Natriumdichloracetat zumindest teilweise die Folge von Thiamin-Mangel sind, der seinerseits eine Folge der Aktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes durch Dichloressigsäure ist (Stacpoole et al., 1984, 1990).

7.11 Sonstige Wirkungen

Pharmakodynamische Wirkungen von Dichloressigsäure

Dichloressigsäure inhibiert die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase und greift damit in einen zentralen Stoffwechselmechanismus - die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A - ein. Die irreversible Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A unter Bildung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) erfolgt durch das Pyruvat-Dehydrogenase-System, einem mitochondrialen Multi-Enzymkomplex mit Thiamindiphosphat als Coenzym. Die Aktivität des Enzymkomplexes wird über eine reversible Phosphorylierung, katalysiert durch eine Phosphatase und eine Kinase, die ihrerseits in ihren Aktivitäten normalerweise durch das NADH/NAD⁺- und das Acetyl-Coenzym A/Coenzym A-Verhältnis reguliert

werden und beide im Komplex enthalten sind, gesteuert. Hohe NADH- bzw. Acetyl-Coenzym A-Spiegel aktivieren die Kinase, was zur Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Multi-Enzymkomplexes führt (vergleiche Lehrbücher der Biochemie). Dichloressigsäure inhibiert die Kinase und fixiert dadurch den Enzymkomplex in seiner unphosphorylierten katalytisch aktiven Form. Diese Steigerung der Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase durch die Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase wurde in zahlreichen in vitro- und in vivo-Studien gezeigt (siehe Review-Artikel von Crabb et al., 1981; Peer und Graf, 1990; Stacpoole, 1989; Stacpoole et al., 1998 a, b). Da sowohl Pyruvat als auch Acetyl-Coenzym A zentrale Stoffwechselprodukte bzw. -substrate des Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsels sind, beeinflusst Dichloressigsäure über die Hemmung der Pyruvat-Decarboxylase-Kinase zahlreiche intermediäre Stoffwechselvorgänge, worauf wohl eine Vielzahl der toxikodynamischen, aber auch die pharmakodynamischen Wirkungen der Verbindung zurückgeführt werden können (vergleiche Crabb et al., 1981; Stacpoole, 1989; Stacpoole et al., 1998 a, b).

Die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten bei pathologischen Stoffwechselveränderungen aufgrund dieser Wirkung von Dichloressigsäure werden seit vielen Jahren insbesondere von Arbeitsgruppen an der University of Florida in Gainesville, USA, und der Indiana University in Indianapolis, USA, eingehend in vitro, im Tierexperiment und in Probandenstudien untersucht. Die überaus zahlreichen Untersuchungen bzw. Publikationen zu den pharmakodynamischen Eigenschaften von Dichloressigsäure wurden umfassend in den genannten Review-Artikeln beschrieben (siehe Crabb et al., 1981; Stacpoole, 1989; Stacpoole et al., 1998 a, b), sodass im Folgenden nur zusammenfassend auf die Befunde eingegangen wird:

Wirkung von Dichloressigsäure bei Hyperglykämie

Nachdem in einigen Studien in den 60er und Anfang der 70er Jahre eine hypoglykämische Wirkung des Diisopropylammoniumsalzes der Dichloressigsäure festgestellt worden war, wurde in weiteren Studien gezeigt, dass diese Wirkung auf Dichloressigsäure selbst zurückzuführen ist und auf einer Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex beruht (Stacpoole, 1969, 1989). Dichloressigsäure bzw. das Natriumdichloracetat senkt bei Labortieren mit induziertem Diabetes die Glukosewerte im Blut sowie die Ketonurie und erhöht die Überlebensrate

von Tieren mit ketoazidotischem Koma. Bei nicht diabetisierten Tieren hat die Verbindung keine oder nur eine geringe Wirkung auf die Blutzuckerwerte. Es ist gezeigt worden, dass Dichloressigsäure der Hyperglykämie einerseits durch eine beschleunigte Glykolyse und andererseits durch eine Hemmung der Glukoneogenese entgegenwirkt. Die permanente Aktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes aufgrund der fehlenden Regulierung durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase führt zu einem erhöhten Pyruvatbedarf, der durch eine verstärkte Umsetzung der Pyruvatsubstrate Glukose, Alanin und Laktat gedeckt wird. Dies erklärt die ausgeprägte Blutzucker senkende Wirkung von Dichloressigsäure, da einerseits Glukose durch eine Steigerung der Glykolyse verstärkt zu Pyruvat abgebaut und andererseits die Glukoneogenese, deren wesentliche Substrate Laktat und Alanin sind, unterdrückt wird. Des Weiteren wurde vermutet, dass weitere Enzyme der Glukoneogenese aufgrund veränderter NAD^+/NADH -Mengen (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) und Anreicherung des Dichloressigsäure-Metaboliten Oxalessigsäure (Pyruvatcarboxylase) in ihrer Aktivität verändert werden. In klinischen Versuchen an Patienten mit Diabetes mellitus Typ II verringerte Dichloressigsäure die Hyperglykämie sowie die Laktat- und Alaningehalte im Blut signifikant. Bei gesunden Probanden zeigte sich nach kurzzeitiger Applikation von Dichloressigsäure keine Blutzucker senkende Wirkung, aber eine sehr stark senkende Wirkung auf die Laktatwerte im Blut (Brown und Gore, 1996; Diamond et al., 1980; Enser und Whittington, 1983; Park et al., 1983; Pegorier et al., 1978; Stacpoole, 1989, 1997; Stacpoole und Greene, 1992; Stacpoole et al., 1978, 1998 a, b).

Wirkung von Dichloressigsäure bei Laktatazidose

Dichloressigsäure führt zu einem starken Abfall der im Gewebe vorhandenen und im Blutkreislauf zirkulierenden Laktatmengen. Infolge des gesteigerten Pyruvatabbaus durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex wird auch Laktat, als Ausgangsverbindung von Pyruvat, beschleunigt abgebaut.

Die positive Wirkung von Dichloressigsäure bei angeborener oder erworbener generalisierter oder lokal begrenzter metabolischer Azidose als Ergänzung bzw. Ersatz der Kompensation mit Natriumhydrogencarbonat wurde vielfach sowohl im Tierexperiment als auch in Probandenstudien gezeigt. Vor allem bei Patienten, bei denen die Gabe von Natriumbicarbonat nicht oder nicht ausreichend wirksam war, verbesserte die Applikation von Di-

chloressigsäure die Prognose deutlich (Aynsley-Green et al., 1984; Blackshear et al., 1982; Burlina et al., 1993; Coude et al., 1978; Crabb et al., 1981; Fox, 1996; Fox et al., 1996 b; Henderson et al., 1997 b; Irsigler et al., 1979; Jahoor et al., 1994; Kodama et al., 1986; Krishna et al., 1994, 1995, 1996; Kuroda et al., 1986; Ludvik et al., 1991; McCormick et al., 1985; Mc Khann et al., 1980; Naito et al., 1989; Okabe et al., 1986; Saijo et al., 1991; Scheid et al., 1985; Shangraw et al., 1992; Stacpoole, 1989, 1993, 1997; Stacpoole et al., 1983, 1988, 1992, 1997, 1998 a, b; Wargovich et al., 1988). Zurzeit werden weitere klinische Studien, u. a. an Neugeborenen und Kindern mit angeborener Laktatazidose aufgrund diverser Enzymdefekte, an Patienten, die sich einer Lebertransplantation unterziehen müssen, und an Patienten mit Leberzirrhose, Schlaganfall, Herzinfarkt oder Plasmodium falciparum-Infektionen (Malaria), bei denen sich häufig eine gravierende Laktatazidose entwickelt, durchgeführt (Bersin et al., 1994; Fox et al., 1996 b; Marangos et al., 1999; Saitoh et al., 1998; Shangraw et al., 1994 a, b; Shangraw und Fischer, 1996, 1999; Stacpoole et al., 1997; Takanashi et al., 1997; Tóth et al., 1993; Zeman et al., 1998).

Auf sonstige pharmakodynamische Wirkungen von Dichloressigsäure, z. B. bei Ischämie oder Veränderungen des Lipid- oder Lipoproteinstoffwechsels, wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Auch diese Wirkungen wurden von der Arbeitsgruppe um Stacpoole untersucht und in den bereits genannten Reviews umfassend dargestellt (siehe Stacpoole, 1989, 1997; Stacpoole et al., 1998 a, b).

Zytotoxizität von Dichloressigsäure

Die Zytotoxizität von Dichloressigsäure wurde in vitro an HEP G2-Zellen (Linie aus menschlichen Hepatomzellen) durch Messung des Proteingehaltes untersucht. Neben Dichloressigsäure erfolgte die Prüfung von 113 anderen Substanzen mit vielseitiger chemischer Struktur. Gemessen wurde die PI_{50} , d. h. die molare Konzentration, die den Proteingehalt nach 24-stündiger Inkubation um 50 % herabsetzt. Sie betrug für Dichloressigsäure 24 mM sowie vergleichsweise für Essigsäure 57 mM und für Natriumacetat 118 mM (Dierickx, 1989).

Die Zytotoxizität von Dichloressigsäure wurde auch an Leberschnitten männlicher B6C3F1-Mäuse untersucht. Als Parameter dienten der Kalium-

gehalt und die Freisetzung der Enzyme Serum-Laktatdehydrogenase, Alaninaminotransferase und Aspartataminotransferase. Ferner wurde die metabolische Kompetenz der Leberschnitte durch Analyse des 7-Ethoxycoumarin-Metabolismus untersucht. Als EC_{50} -Werte wurden für den Kalium-Gehalt 9360 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 64 mM und für die Serum-Laktatdehydrogenase-Freisetzung 8890 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 69 mM bestimmt (leicht abweichende Angaben in den zwei vorliegenden Publikationen zu dieser Studie). Die Freisetzung der Alaninaminotransferase und der Aspartataminotransferase sowie die metabolische Kompetenz der Leberschnitte wurden durch Dichloressigsäure nicht verändert (Pravecek et al., 1994, 1996).

Sprague-Dawley-Ratten und B6C3F1-Mäuse wurden in vivo mit Clofibrat (Peroxisomenproliferator) vorbehandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde die Zytotoxizität von Dichloressigsäure (> 99-prozentig) in vitro an Leberzellsuspensionen geprüft, wobei die Milchsäurefreisetzung und/oder der Trypanblau-Ausschluss als Kriterien für eine zytotoxische Wirkung dienten. Dichloressigsäure zeigte bis zu Konzentrationen von 5,0 mM keine zytotoxischen Eigenschaften. Die Autoren schlossen aus diesen Versuchen, dass die nach hohen Dichloressigsäure-Dosen in vivo beobachteten nekrotischen Bezirke in der Leber nicht durch Zytotoxizität bedingt sind (Bruschi und Bull, 1993).

Beeinflussung der Darmflora

Die Verabreichung von Dichloressigsäure im Trinkwasser (1 g/l) über 5 Wochen führte bei männlichen Fischer-344-Ratten zu Veränderungen der Darmflora, die nach Diskussion der Autoren die Bioaktivierung von Promutagenen und Prokanzerogenen verändern könnte. Als Maß für die Veränderung der Darmflora wurden die Aktivitäten diverser Enzyme (beta-Glucuronidase, beta-Galaktisidase, beta-Glukosidase, Nitroreduktase, Azoreduktase und Dechlorinase) im Blinddarm, Dünndarm sowie im Dickdarm gemessen (George et al., 2000).

8 Erfahrungen beim Menschen

Zu den Befunden zur Toxiko- bzw. Pharmakokinetik, zum Metabolismus und zur Toxiko- bzw. Pharmakodynamik von Dichloressigsäure beim Menschen, die ausschließlich im Rahmen der Erforschung der Verbindung als

Therapeutikum bei diversen Stoffwechselerkrankungen erhoben wurden, liegen umfassende und aktuelle Review-Arbeiten vor (vergleiche Henderson et al., 1997 a; Peer und Graf, 1990; Stacpoole, 1989; Stacpoole et al., 1998 a, b). Darüber hinaus wird im Folgenden nur auf einige toxikologisch besonders relevante Punkte eingegangen:

Toxikokinetik und Metabolismus

Einzelne der Studien, in denen pharmakokinetische Parameter von Dichloressigsäure beim Menschen bestimmt worden sind, sind exemplarisch in [Tabelle 13](#) im Anhang zusammengefasst. Ausführlich wird nachfolgend auf eine Studie eingegangen, bei der sich wie im Tierexperiment gezeigt hat, dass sich die Verstoffwechslung und Ausscheidung von Dichloressigsäure bei wiederholter Applikation gegenüber der einmaligen Applikation deutlich verändert:

Freiwillige männliche und weibliche Versuchspersonen (18 bis 45 Jahre) erhielten entweder einmalig oder mehrmals 50 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht intravenös oder oral in Gelatine kapseln. Die intravenöse Zufuhr erfolgte 30 Minuten lang mittels einer Infusionspumpe. Nach einmaliger oraler Gabe von 50 mg/kg Körpergewicht betrug z. B. die maximale Plasmakonzentration nach ca. einer Stunde etwa 90 µg/ml und war nach ca. 12 Stunden gegen Null abgefallen. Die maximale Plasmakonzentration nach einmaliger intravenöser Zufuhr von 50 mg/kg Körpergewicht über 30 Minuten betrug bei Injektionsende z. B. 170 µg/ml und war nach 9 Stunden auf Null abgefallen. Aus der Gesamtheit der Daten nach oraler Gabe errechnete sich eine maximale Spitzenkonzentration von 111,7 µg/ml nach 1,24 Stunden, ein Verteilungsvolumen von 19,9 l, eine Plasma-Clearance von 102,13 ml/Minute und eine renale Clearance von 42,87 bis 53,00 ml/Stunde (zwei verschiedene Methoden). Bei der Bioverfügbarkeit und Ausscheidung (nur Oxalat im Urin gemessen) bestand zwischen oraler und intravenöser Zufuhr kein signifikanter Unterschied. Weiteren Versuchspersonen wurden 50 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht bis zu 4-mal verabreicht, wobei die Abstände zwischen den einzelnen Applikationen 2 bis 8 Wochen betragen. Bei Probanden, die im Abstand von 2 Wochen insgesamt zweimal behandelt worden waren, verlängerte sich die Plasmahalbwertszeit von 1,75 Stunden nach der ersten Applikation auf 2,65 Stunden nach der zweiten Applikation. Bei Probanden, bei denen das Intervall

zwischen den zwei Applikationen 4 Wochen betrug, war die Plasmahalbwertszeit von 2,28 auf 3,9 Stunden verlängert. Individuell bestanden große Unterschiede. Zwei Probanden wiesen bei einer zweimaligen Behandlung mit einem Intervall von 8 Wochen keine Verlängerung der Plasmahalbwertszeit auf. Nach nochmaliger Behandlung dieser Probanden nach 6 bzw. 6 und 2 Wochen war auch bei ihnen die Plasmahalbwertszeit verlängert. Bereits in einer früheren Studie hatten die Autoren festgestellt, dass bei wiederholter Applikation die Halbwertszeit deutlich ansteigt. Bei Probanden, die im Abstand von jeweils 2 Stunden 50 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht per Infusion erhalten hatten, erhöhte sich die Halbwertszeit von 63,3 Minuten (Spanne 15,0 bis 112,2 Minuten) nach der ersten Applikation auf 374,0 Minuten (Spanne 37,8 bis 1386,0 Minuten) nach der fünften Applikation (Curry et al., 1985, 1991).

Diese Verlängerung der Plasmahalbwertszeit bei wiederholter Applikation zeigte sich auch in frühen klinischen Erprobungen der Verbindung zur Behandlung von Laktatazidose (Stacpoole et al., 1983).

Eine dermale Aufnahme von Dichloressigsäure scheint beim Menschen möglich zu sein. Probanden, die sich für 30 Minuten in chloriertem Schwimmbadwasser mit einer mittleren Dichloressigsäure-Konzentration von 484 µg/l (Spanne 52 bis 647 µg/l) aufgehalten hatten, schieden innerhalb von 3 Stunden mit dem Urin Dichloressigsäure-Mengen aus, die sich mit einer eventuellen oralen Aufnahme des Schwimmbadwassers während des Aufenthalts in den Schwimmbecken nicht erklären ließen. Die Autoren schätzten ab, dass ca. 6 µg Dichloressigsäure über die Haut aufgenommen worden waren (Kim und Weisel, 1998).

Wie in den in vitro-Versuchen mit Rattenleberzytosol (siehe Kapitel 7.1; Cornett et al., 1997; Gonzalez-Leon et al., 1997 b; James et al., 1997) konnte auch mit Humanleberzytosol eine vom Glutathiongehalt abhängige Metabolisierung zu Glyoxylsäure und Oxalsäure in vitro nachgewiesen werden (James et al., 1997).

Toxikodynamische Wirkungen

Auch die Erfahrungen zur Wirkung von Dichloressigsäure beim Menschen beschränken sich auf die an Probanden im Rahmen der klinischen Erprobung der Verbindung erhobenen Befunde:

Im Rahmen kurzzeitiger Applikationen von Dichloressigsäure in Probandenstudien sind bisher keine relevanten Nebenwirkungen festgestellt worden (siehe hierzu Übersichtsartikel von Stacpoole et al., 1998 a, b, sowie Peer und Graf, 1990). Eine Langzeittherapie mit Dichloressigsäure bei chronischen Erkrankungen ist allerdings aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen kontraindiziert (siehe unten; Stacpoole et al., 1979; Moore et al., 1979; Kurlemann et al., 1995). Als Akuttherapeutikum zur Kompensation kurzzeitiger Entgleisungen des Säure-Basen-Haushaltes aufgrund einer lokal begrenzten akuten Sauerstoffunterversorgung ist Dichloressigsäure patentiert und wird klinisch weiterhin noch untersucht (siehe Kapitel 7.11 - Wirkung von Dichloressigsäure bei Laktatazidose).

Die Erprobung von Dichloressigsäurenatriumsalz zur Langzeittherapie einer Hypercholesterinämie, bei der ein 21-jähriger Patient mit schwerer familiärer Hypercholesterinämie täglich oral 50 mg Natriumdichloracetat/kg Körpergewicht erhalten hatte, musste aufgrund der sich einstellenden schwerwiegenden neurologischen Nebenwirkungen nach 16 Wochen abgebrochen werden. Unter der Behandlung mit Natriumdichloracetat normalisierten sich die Lipoprotein-Konzentrationen im Plasma zwar deutlich, es entwickelte sich aber parallel eine Polyneuropathie, die durch Schwäche der Fazial-, Finger- und unteren Extremitätenmuskulatur gekennzeichnet war. Außerdem waren die tiefen Sehnenreflexe abgeschwächt und die Nervenleitgeschwindigkeit vermindert. Die neurologischen Befunde stehen im Einklang mit den auch im Tierversuch festgestellten Veränderungen. Die Behandlung wurde abgebrochen und Dichloressigsäure als ungeeignet für eine Langzeittherapie bewertet. Nach Absetzung der Natriumdichloracetat-Gaben besserten sich die neurologischen Befunde des Patienten allmählich innerhalb von 6 Monaten (Stacpoole et al., 1979; Moore et al., 1979).

Auch die Dauerbehandlung einer 13-jährigen Patientin, bei der sich aufgrund eines so genannten mitochondrialen Komplex I-Defizits eine ausgeprägte Laktatazidose mit konsekutiver metabolischer Enzephalopathie entwickelt hatte, mit Dichloressigsäure musste aufgrund der sich einstellenden neurologischen Nebenwirkungen abgebrochen werden. Anfänglich wurde die Patientin dreimal täglich mit 80 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht behandelt. Dies führte zu normalen Laktatwerten, die auch noch im normalen Level blieben, als die Dosis nach 8 Wochen auf 60 mg/kg Körpergewicht reduziert wurde. Nach weiterer Absenkung der Dosierungen auf 25 mg/kg Körpergewicht stiegen die Laktatwerte wieder deutlich an und er-

reichten auch bei erneuter Dosissteigerung auf 50 mg/kg Körpergewicht die Normalwerte nicht nochmals. Bis auf eine deutlich verbesserte Konzentrationsfähigkeit veränderte sich der klinische Zustand der Patientin, der auch noch 100 mg Thiamin/Tag verabreicht worden waren, nicht. In der 20. Behandlungswoche stellten sich Nebenwirkungen der Behandlung ein; der Gang der Patientin wurde schlüpfend und die tiefen Sehnenreflexe waren reduziert. In der 24. Behandlungswoche waren Achilles- und Patellarsehnenreflex reduziert, die Nervenleitgeschwindigkeit des Tibialnervs vermindert und die des Peronealnervs nicht messbar; evoziertes Potenzial sowie die Nervenleitgeschwindigkeit des Wadennervs waren unbeeinträchtigt. Die Behandlung wurde abgebrochen. Durchschnittlich wurden während der gesamten Behandlungsdauer von 24 Wochen 55,8 mg Dichloressigsäure/kg Körpergewicht dreimal pro Tag verabreicht. Unter Beibehaltung der Thiamin-Verabreichung normalisierten sich Gang und Nervenleitgeschwindigkeiten der Patientin innerhalb von 6 Monaten wieder (Kurlemann et al., 1995).

9 Einstufungen und Grenzwerte

Von der US-EPA wurde Dichloressigsäure als mögliches Humankanzero-gen klassifiziert (Klasse B2; EPA, 2001; ILSI, 1997).

Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MAK-Kommission) hat Dichloressigsäure und ihr Natriumsalz in der MAK- und BAT-Werte-Liste 2005 auf Anregung der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie in den „Gelben Seiten“ zur Überprüfung der Krebs erzeugenden Wirkung aufgeführt (DFG, 2005).

10 Arbeitsmedizinische Empfehlungen

Allgemeine arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen in Anlehnung an die BG-Vorschrift „Arbeitsmedizinische Vorsorge“ (BGV A4) unter Beachtung der ätzenden, neurotoxischen und kanzerogenen Wirkung.

**Tabelle 4. Pharmakokinetische Parameter von Natriumdichloracetat beim Versuchstier
(Darstellung in Anlehnung an Stacpoole et al., 1998 a)**

Spezies, Stamm, Geschlecht ¹	Dosis (mg/kg Körpergewicht), Applikationsart	C _{max} (µg/ml)	t _½ (Stunde)	V _d (ml/kg)	Cl (ml/kg/Minute)	Literatur
Ratte, Sprague-Dawley, männlich (230 g)	50 einmalig bzw. wiederholt oral	-	0,6 bzw. 3,0	-	-	Yan et al., 1997
Ratte, Sprague-Dawley, männlich (632 g)	50 wiederholt oral	-	10,1	-	-	Yan et al., 1997
Ratte, Sprague-Dawley, 3 Männchen	100 (¹⁴ C-NaDCA), einmalig intravenös	120 - 164	2,1 - 4,4	701 - 1080	1,84 - 5,94 (Plasma)	Lukas et al., 1980
Hund, Beagle, 2 Männchen	100 (¹⁴ C-NaDCA), einmalig intravenös	447 und 508	17,1 und 24,6	249 und 262	0,123 und 0,168 (Plasma)	Lukas et al., 1980
¹ soweit angegeben - nicht angegeben NaDCA Natriumdichloracetat C _{max} maximale Konzentration im Plasma bzw. Blut t _½ Halbwertszeit im Plasma bzw. Blut V _d Verteilungsvolumen Cl Clearance						

Tabelle 5. Untersuchungen zur akuten Toxizität von Dichloressigsäure bzw. Natriumdichloracetat						
Spezies, Stamm, Geschlecht ¹	Zufuhrweg	Dosis (mg/kg Körperge- wicht)	Verbindung, Reinheit ¹	Effekt	Nachbe- obachtung	Literatur
Ratte	oral	> 5000	NaDCA	LD ₅₀	k.A.	Traina et al., 1977
Ratte	oral	4480	NaDCA	LD ₅₀ , Narkose	6 Tage	Woodard et al., 1941
Es wurde mit NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 7 eingestellte Dichloressigsäure geprüft.						
Ratte	oral	2820	DCA	approximative LD ₅₀	14 Tage	Smyth et al., 1951
Maus, B6C3F1, männlich, weiblich	oral	5697 - 7500	NaDCA, > 99 %	LD ₅₀	14 Tage	Meier et al., 1997
Es wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellte Dichloressigsäure geprüft.						
Maus	oral	5520	k.A.	LD ₅₀ , Narkose	6 Tage	Woodard et al., 1941
Es wurde mit NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 7 eingestellte Dichloressigsäure geprüft.						
Maus	oral	> 5000	NaDCA	LD ₅₀	k.A.	Traina et al., 1977
Maus, ICR männlich, weiblich	oral	ca. 4844 (32,1 mmol)	NaDCA	LD ₅₀	7 Tage	Yount et al., 1982
Maus, B6C3F1, männlich	oral	4562 - 6610, 5-mal im Ab- stand von 24 Stunden	NaDCA, > 99 %	LD ₅₀	14 Tage	Meier et al., 1997
Es wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellte Dichloressigsäure geprüft.						
Maus, B6C3F1, weiblich	oral	6610 - 7500, 5-mal im Ab- stand von 24 Stunden	NaDCA, > 99 %	LD ₅₀	14 Tage	Meier et al., 1997
Es wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellte Dichloressigsäure geprüft.						
Hund	oral	1000	NaDCA	nicht letal	k.A.	Traina et al., 1977
Kaninchen	dermal	ca. 798 (0,51 ml)	DCA	LD ₅₀	14 Tage	Smyth et al., 1951
Ratte	inhalativ (Inhalations- Risiko-Test)	8 Stunden Exposition ge- genüber einer bei Raum- temperatur angereicherten bzw. gesättigten Atmosphä- re	DCA	keine erhöhte Mor- talität	k.A.	Smyth et al., 1951
Ratte	intravenös	> 2200	NaDCA	LD ₅₀	k.A.	Traina et al., 1977
Maus	intravenös	2852	NaDCA	LD ₅₀	k.A.	Traina et al., 1977
Hund	intravenös	> 1000	NaDCA	LD ₅₀	k.A.	Traina et al., 1977
¹ soweit angegeben NaDCA Natriumdichloracetat DCA Dichloressigsäure k.A. keine Angaben						

Anfang Tabelle 12

Tabelle 12. Neurotoxische Wirkungen von Dichloressigsäure nach akuter, subchronischer und chronischer oraler Applikation per Schlundsonde oder im Trinkwasser bei der Ratte (Moser et al., 1999)					
Stamm, Geschlecht, Alter zu Versuchsbeginn und Anzahl der Tiere	Dosis ¹ (mg/kg Körpergewicht/Tag)	Applikationsart, Behandlungsdauer	Befundungstermine nach Applikationsbeginn	Befunde bei Prüfung der FOB (Functional observational battery) und der motorischen Aktivität	Sonstige Befunde
Teilversuch 1, Long-Evans, männlich, weiblich, 76 bis 89 Tage, 9 bis 10 Tiere/Gruppe	100, 300, 1000, 2000	Schlundsonde, einmalig	4, 24, 168, 336 Stunden	100 mg/kg Körpergewicht: ohne Befund; ≥ 300 mg/kg Körpergewicht: nach 4 Stunden reduzierte Griffstärke der hinteren Extremitäten der Männchen um 20 bis 24 %; ≥ 1000 mg/kg Körpergewicht: reduzierte motorische Aktivität; alle Befunde nach 168 Stunden reversibel	Körpergewichtsreduzierung in allen Dosisgruppen nach 24 Stunden
Teilversuch 2, Long-Evans, männlich, 80 Tage, 9 bis 10 Tiere/Gruppe	30, 100, 300, 1000	Schlundsonde, 10 Wochen, Behandlung an 5 Tagen/Woche	2, 4, 7, 11 Wochen	≤ 100 mg/kg Körpergewicht: ohne Befund; ≥ 300 mg/kg Körpergewicht: ab Woche 7 abnormaler Gang (Score 2 bei einer Skala bis 4); 1000 mg/kg Körpergewicht: ab Woche 2 bis Woche 7 bei 30 bis 50 % der Tiere Tremor, Muskelhypotonie bei 40 % der Tiere in Woche 7, progressiv verminderte Griffstärke der Vorderextremitäten (maximal in Woche 11 um 30 %); Gangstörungen in der 300 mg/kg Körpergewicht-Gruppe in Woche 11 (eine Woche nach Applikationsende) leicht reversibel	≥ 100 mg/kg Körpergewicht: retardierte Körpergewichtsentwicklung; Körpergewicht in Woche 11 88, 79 bzw. 78 % der Kontrolle, nach 4 Wochen Tod eines Tieres der obersten Dosisgruppe

Tabelle 12. Neurotoxische Wirkungen von Dichloressigsäure nach akuter, subchronischer und chronischer oraler Applikation per Schlundsonde oder im Trinkwasser bei der Ratte (Moser et al., 1999)

Stamm, Geschlecht, Alter zu Versuchsbeginn und Anzahl der Tiere	Dosis ¹ (mg/kg Körpergewicht/Tag)	Applikationsart, Behandlungsdauer	Befundungstermine nach Applikationsbeginn	Befunde bei Prüfung der FOB (Functional observational battery) und der motorischen Aktivität	Sonstige Befunde
Teilversuch 3, F344, männlich, 28 Tage, 18 Tiere/Gruppe (Kontrolle 24 Tiere)	137, 235 (2,5 → 2 → 1,5 g/l bzw. 3,5 → 2,5 → 0)*	Trinkwasser, 104 bzw. 27 Wochen*	1, 2, 3, 3,5, 4,5, 5,5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 Monate	≥ 137 mg/kg Körpergewicht: ab der ersten Befundung progressiv abnormaler Gang (bis Score 4 bei einer Skala bis 4), verminderte Griffstärke der Vorder- bzw. der Hinterextremitäten (auf 45 bzw. 23 % der Kontrolle), eingeschränkter Stellreflex, Tremor, inhibierte Pupillenreaktion auf Licht, abnormale Extremitätenhaltung bei Aufnahme am Schwanz bei 23/24 Tieren der oberen und 8/24 Tieren der unteren Dosisgruppe, verstärkte Extremitätenspreizung bei Fall aus 30 cm Höhe; Befunde der oberen Dosisgruppe während des 18-monatigen behandlungsfreien Intervalls nicht oder nur partiell reversibel; die neurohistologische Befundung von 3 Tieren/Gruppe zeigte im Bereich der Fasciculus gracilis der Hinterstrangbahn des grauen Rückenmarks eine ausgeprägte Gliosis mit Verlust der myelinisierten Axone und große granuläre Strukturen, die von den Autoren tentativ als dystrophische Axone interpretiert wurden; das periphere Nervensystem wies keine pathologischen Veränderungen auf und im Bereich des Gehirns war auch keine Vakuolisierung festzustellen	keine erhöhte Mortalität, retardierte Körpergewichtsentwicklung (in der oberen Dosisgruppe erst 18 Monate nach Applikationsende reversibel, in der unteren Dosisgruppe während des ersten Jahres Körpergewichtsretardierung, danach Körpergewichtsabnahme auf 72 % der Kontrolle bei Versuchsende, Augentrübung (behandelte Gruppen 90 bis 100 %, Kontrolle 46 %)

* Aufgrund der Toxizität wurde die obere geprüfte Konzentration von 3,5 g/l nach 6 Wochen auf 2,5 g/l herabgesetzt und die Behandlung nach weiteren 21 Wochen ganz ausgesetzt. Die untere Konzentration von anfänglich 2,5 g/l wurde nach 6 Wochen auf 2 g/l und nach weiteren 4 Wochen auf 1,5 g/l herabgesetzt, die bis zum Studienende nach insgesamt 104 Wochen beibehalten wurde. Die eingesetzten Tiere waren Satellitengruppen der in Kapitel 7.7 dargestellten Kanzerogenesestudie von DeAngelo et al., 1996.

Tabelle 12. Neurotoxische Wirkungen von Dichloressigsäure nach akuter, subchronischer und chronischer oraler Applikation per Schlundsonde oder im Trinkwasser bei der Ratte (Moser et al., 1999)

Stamm, Geschlecht, Alter zu Versuchsbeginn und Anzahl der Tiere	Dosis ¹ (mg/kg Körpergewicht/Tag)	Applikationsart, Behandlungsdauer	Befundungstermine nach Applikationsbeginn	Befunde bei Prüfung der FOB (Functional observational battery) und der motorischen Aktivität	Sonstige Befunde
Teilversuch 4, F344, männlich, 30 Tage, 9 bis 10 Tiere/Gruppe	162, 308 (2 bzw. 4 g/l)*	Trinkwasser, 12 bzw. 3 Wochen*	3, 6, 9, 12, 17 Wochen	162 mg/kg Körpergewicht: progressiv abnormaler Gang (bis Score 3 bei einer Skala bis 4), eingeschränkter Stellreflex, Tremor, verminderte Griffstärke der Hinter- und der Vorderextremitäten (auf 35 bzw. 78 % der Kontrolle), reduzierte motorische Aktivität (auf 46 % der Kontrolle), abnormale Extremitätenhaltung bei Aufnahme am Schwanz bei 78 % der Tiere, keine Reversibilität der Befunde 5 Wochen nach Applikationsende; 308 mg/kg Körpergewicht: Befunde nach 3 Wochen (am Behandlungsende) in etwa identisch mit denen in der niedrigeren Dosisgruppe nach 12 Wochen erhobenen, Befunde während der 14-wöchigen Nachbeobachtungszeit nicht (Gangstörungen) oder nur sehr langsam reversibel (veränderte Extremitätenhaltung bei Aufnahme am Schwanz)	Körpergewichtsretardierung (maximal 84 bzw. 74 % der Körpergewichtszunahme der Kontrolle in der unteren bzw. oberen Dosisgruppe)
* Aufgrund der Toxizität wurde die obere Dosisgruppe nur 3 Wochen behandelt.					
Teilversuch 5a, F344, männlich, 28 bis 29 Tage, 12 Tiere/Gruppe	16, 66, 172 (0,2, 0,75 bzw. 2 g/l)	Trinkwasser, 12 Wochen	3, 6, 9, 13, 16, 19, 23, 27 Wochen	≥ 16 mg/kg Körpergewicht: progressiv abnormaler Gang (dosisabhängig bis Score von ca. 1,7, ca. 2,1 bzw. ca. 2,7 bei einer Skala bis 4), dosisabhängig beeinträchtigter Stellreflex; ≥ 66 mg/kg Körpergewicht: reduzierte motorische Aktivität (auf 69 bzw. 52 % der Kontrolle), verstärkte Extremitätenspreizung bei Fall aus 30 cm Höhe; 172 mg/kg Körpergewicht: Tremor, verminderte Griffstärke der Vorder- und der Hinterextremitäten (um 21 bzw. 28 % gegenüber der Kontrolle), abnormale Extremitätenhaltung bei Aufnahme am Schwanz bei 42 % der Tiere, fehlender Pupillenreflex bei 42 % der Tiere; Befunde während der 14-wöchigen Nachbeobachtungszeit nicht oder nur langsam reversibel, Gangstörungen in der niedrigen Dosisgruppe langsamer reversibel als in der mittleren Dosisgruppe	in der obersten Dosisgruppe Körpergewichtsretardierung (Körpergewicht bei Applikationsende 83 % der Kontrolle), nicht reversibel innerhalb von 14 Wochen nach Applikationsende

Tabelle 12. Neurotoxische Wirkungen von Dichloressigsäure nach akuter, subchronischer und chronischer oraler Applikation per Schlundsonde oder im Trinkwasser bei der Ratte (Moser et al., 1999)					
Stamm, Geschlecht, Alter zu Versuchsbeginn und Anzahl der Tiere	Dosis ¹ (mg/kg Körpergewicht/Tag)	Applikationsart, Behandlungsdauer	Befundungstermine nach Applikationsbeginn	Befunde bei Prüfung der FOB (Functional observational battery) und der motorischen Aktivität	Sonstige Befunde
Teilversuch 5b, F344, männlich, 28 bis 29 Tage, 9 Tiere/Gruppe	zu Beginn 246, später 176*	Schlundsonde, 12 Wochen, Behandlung an 5 Tagen/Woche	3, 6, 9, 13, 16, 19, 23, 27 Wochen	progressiv abnormaler Gang (maximal Score von ca. 2,5 bei einer Skala bis 4), nur bei 2/9 Tieren Tremor, keine Veränderung der Griffstärke, gering verminderte motorische Aktivität; alle Befunde reversibel (Gangstörungen z. B. bis Woche 19)*	10 Wochen nach Applikationsende reversible Körpergewichtsretardierung, (Körpergewicht bei Applikationsende 86 % der Kontrolle)
* Durchschnittliche Dosis in mg/kg Körpergewicht/Tag basierend auf den 5 Applikationen/Woche. Die Dosis wurde in 2-Wochen-Intervallen der mit dem Trinkwasser aufgenommenen Menge der oberen Dosisgruppe im Teilversuch 5a angepasst. Insgesamt signifikant schwächer ausgeprägt und schneller reversible Befunde als die mit einer entsprechenden Dosis über das Trinkwasser im Teilversuch 5a behandelten Tiere.					
Teilversuch 6a, Long-Evans, männlich, 28 bis 29 Tage, 9 bis 10 Tiere/Gruppe	17, 88, 192 (0,2, 1 bzw. 2 g/l)	Trinkwasser, 13 Wochen	3, 6, 9, 13 Wochen	≥ 17 mg/kg Körpergewicht: dosisabhängig progressiv abnormaler Gang (maximal Score von ca. 1,8, ca. 2,2 bzw. ca. 2,5 bei einer Skala bis 4); ≥ 88 mg/kg Körpergewicht: dosisunabhängig verminderte Griffstärke der Hinterextremitäten auf ca. 80 bzw. ca. 81 % der Kontrolle; 192 mg/kg Körpergewicht: Tremor (10 bis 20 % der Tiere), Muskelhypotonie (10 bis 20 % der Tiere), fehlender Pupillenreflex bei 20 % der Tiere, keine Beeinträchtigung der motorischen Aktivität, des Stellreflexes, der Griffstärke der Vorderextremitäten, keine Veränderung der Extremitätenspreizung bei Fall aus 30 cm Höhe, keine veränderte Extremitätenhaltung bei Aufnahme am Schwanz	≥ 88 mg/kg Körpergewicht: Körpergewichtsretardierung (Körpergewicht bei Versuchsende 84 bzw. 73 % der Kontrolle)

Tabelle 12. Neurotoxische Wirkungen von Dichloressigsäure nach akuter, subchronischer und chronischer oraler Applikation per Schlundsonde oder im Trinkwasser bei der Ratte (Moser et al., 1999)					
Stamm, Geschlecht, Alter zu Versuchsbeginn und Anzahl der Tiere	Dosis ¹ (mg/kg Körpergewicht/Tag)	Applikationsart, Behandlungsdauer	Befundungstermine nach Applikationsbeginn	Befunde bei Prüfung der FOB (Functional observational battery) und der motorischen Aktivität	Sonstige Befunde
Teilversuch 6b, F344, männlich, 28 bis 29 Tage 9 bis 10 Tiere/Gruppe	16, 89, 173 (0,2, 1 bzw. 2 g/l)	Trinkwasser, 13 Wochen	3, 6, 9, 13 Wochen	≥ 16 mg/kg Körpergewicht: dosisabhängig progressiv abnormaler Gang (maximal Score von ca. 1,8, ca. 2,1 bzw. ca. 3,3 bei einer Skala bis 4); 173 mg/kg Körpergewicht: verminderte Griffstärke der Hinterextremitäten auf 60 % der Kontrolle, Tremor (20 bis 50 % der Tiere), Muskelhypotonie (20 bis 70 % der Tiere), fehlender Pupillenreflex bei 70 % der Tiere, reduzierte motorische Aktivität (57 % der Kontrolle), beeinträchtigter Stellreflex, reduzierte Griffstärke der Vorderextremitäten (ca. 80 % der Kontrolle), um 26 % erhöhte Extremitätenspreizung bei Fall aus 30 cm Höhe, veränderte Extremitätenhaltung bei Aufnahme am Schwanz bei 50 % der Tiere*	173 mg/kg Körpergewicht: Körpergewichtsretardierung (Körpergewicht bei Versuchsende 81 % der Kontrolle)
* Im Vergleich zu den im Teilversuch 6a identisch behandelten Ratten des Stammes Long-Evans reagierten die F344-Ratten signifikant empfindlicher.					
Teilversuch 7a, Long-Evans, männlich, 68 bis 69 Tage, 9 bis 10 Tiere/Gruppe	23, 122, 220 (0,25, 1,25 bzw. 2,5 g/l)	Trinkwasser, 8 Wochen	2, 5, 8, 10 Wochen	23 mg/kg Körpergewicht: ohne Befund; ≥ 122 mg/kg Körpergewicht: progressiv abnormaler Gang, reduzierte Griffstärke der Hinterextremitäten (85 bzw. 65 % der Kontrolle); 220 mg/kg Körpergewicht: nur zu Versuchsende reduzierte Griffstärke der Vorderextremitäten (80 % der Kontrolle) und reduzierte motorische Aktivität (65 % der Kontrolle), keine erhöhte Extremitätenspreizung bei Fall aus 30 cm Höhe, beeinträchtigter Stellreflex bei 33 % der Tiere, keine veränderte Körperhaltung bei Aufnahme am Schwanz und keine Beeinträchtigung des Pupillenreflexes; Beeinträchtigung des Ganges und der Griffstärke 2 Wochen nach Behandlungsende nicht reversibel	≥ 122 mg/kg Körpergewicht: Körpergewichtsretardierung (Körpergewicht maximal auf 81 bis 84 bzw. 71 % der Kontrolle reduziert)

Tabelle 12. Neurotoxische Wirkungen von Dichloressigsäure nach akuter, subchronischer und chronischer oraler Applikation per Schlundsonde oder im Trinkwasser bei der Ratte (Moser et al., 1999)

Stamm, Geschlecht, Alter zu Versuchsbeginn und Anzahl der Tiere	Dosis ¹ (mg/kg Körpergewicht/Tag)	Applikationsart, Behandlungsdauer	Befundungstermine nach Applikationsbeginn	Befunde bei Prüfung der FOB (Functional observational battery) und der motorischen Aktivität	Sonstige Befunde
Teilversuch 7b, F344, männlich, 28 bis 29 Tage, 9 bis 10 Tiere/Gruppe	18, 91, 167 (0,25, 1,25 bzw. 2,5 g/l)	Trinkwasser, 13 Wochen	2, 5, 8, 10 Wochen	18 mg/kg Körpergewicht: zeitweise abnormaler Gang; ≥ 91 mg/kg Körpergewicht: progressiv abnormaler Gang (stärker als bei den parallel im Teilversuch 7a geprüften Long-Evans-Ratten), reduzierte Griffstärke der Hinterextremitäten (85 bzw. 65 % der Kontrolle); 167 mg/kg Körpergewicht: zu allen Testterminen reduzierte Griffstärke der Vorderextremitäten (ca. 85 % der Kontrolle), reduzierte motorische Aktivität (60 % der Kontrolle), um 40 % erhöhte Extremitätenspreizung bei Fall aus 30 cm Höhe, beeinträchtigter Stellreflex bei 40 % der Tiere, veränderte Extremitätenhaltung bei Aufnahme am Schwanz bei 50 % der Tiere, fehlender Pupillenreflex bei 60 % der Tiere; Beeinträchtigung des Ganges und der Griffstärke 2 Wochen nach Behandlungsende nicht reversibel*	167 mg/kg Körpergewicht: Körpergewichtsretardierung (Körpergewicht maximal auf 81 bis 84 % der Kontrolle reduziert)
* Im Vergleich zu den in Teilversuch 7a identisch behandelten Ratten des Stammes Long-Evans war die Beeinträchtigung der Griffstärke bei den F344-Ratten signifikant stärker ausgeprägt.					
¹ Angaben der Dosen in mg/kg Körpergewicht/Tag bei Applikation im Trinkwasser unter Berücksichtigung von Körpergewicht und Flüssigkeitsverbrauch					

Ende Tabelle 12

Tabelle 13. Pharmakokinetische Parameter von Natriumdichloracetat beim Menschen

Probanden	Dosis (mg/kg Körpergewicht), Applikationsart	C _{max} (µg/ml)	AUC (µg/ml/Stunde)	t _½ (Stunde)	V _d (ml/kg)	Cl (ml/kg/Minute)	Literatur
2 gesunde männliche Probanden (42 und 38 Jahre, ca. 70 kg)	10 ¹⁴ C-NaDCA, einmalige Infusion über 20 Minuten	19,9 und 24,7	15,46 und 14,35	0,33 und 0,36	308 und 366	10,86 und 11,76 (Plasma)	Lukas et al., 1980
2 gesunde männliche Probanden (52 und 26 Jahre, 80 und 83 kg)	20 ¹⁴ C-NaDCA, einmalige Infusion über 20 Minuten	57,3 und 74,9	59,85 und 93,61	0,41 und 0,61	186 und 195	3,53 und 5,58 (Plasma)	Lukas et al., 1980
16 gesunde Probanden (15 männlich, 1 weiblich, 25 bis 45 Jahre)	1 bis 50 NaDCA, einmalige Infusion über 30 Minuten	dosisabhängig linear von ca. 5 bis ca. 100 bis 30 mg/kg Körpergewicht, ab 35 mg/kg Körpergewicht dosisüberproportional auf ca. 300 ansteigend	keine Angabe	0,27 bis 0,84 (mittlerer Wert ca. 0,5), kein dosisabhängiger Trend	keine Angabe	0,57 bis 0,08 l/kg/Stunde mit dem Trend, bei Dosierungen > 20 mg/kg Körpergewicht abzunehmen	Wells et al., 1980
13 Patienten mit schwerer Malaria (27 ± 8 Jahre, 54 ± 5,8 kg)	46 NaDCA, einmalige Infusion über 30 Minuten	78 ± 23	261 ± 155	2,3 ± 1,8	750 ± 350	320 ± 160	Krishna et al., 1994
11 Patienten mit schwerer Malaria (32 ± 10 Jahre, 57 ± 10 kg)	46 NaDCA, zweimalige Infusion über 30 Minuten im Abstand von 12 Stunden	103 ± 26 (106 ± 28 nach der ersten Gabe)	keine Angabe	4,4 ± 2 (3,4 ± 2,2 nach der ersten Gabe)	440 ± 200	130 ± 27	Krishna et al., 1996
9 Kinder mit schwerer Malaria (39 ± 10 Monate, 11,7 ± 3,4 kg)	50 NaDCA, einmalige Infusion über 10 Minuten	170 ± 52	378 ± 65	1,8 ± 0,4	323 ± 97	161 ± 50	Krishna et al., 1995
NaDCA	Natriumdichloracetat						
C _{max}	maximale Konzentration im Plasma bzw. Blut						
AUC	Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve						
t _½	Halbwertszeit im Plasma bzw. Blut						
V _d	Verteilungsvolumen						
Cl	Clearance						

Literatur

- Anderson, W.B., Board, P.G., Gargano, B., Anders, M.W.
Inactivation of glutathione transferase zeta by dichloroacetic acid and other fluorine-lacking α -haloalkanoic acids
Chem. Res. Toxicol., 12, 1144 - 1149 (1999)
- Anna, C.H., Maronpot, R.R., Pereira, M.A., Foley, J.F., Malarkey, D.E., Anderson, M.W.
Ras proto-oncogene activation in dichloroacetic acid-, trichloroethylene- and tetrachloroethylene-induced liver tumors in B6C3F1 mice
Carcinogenesis, 15 (10), 2255 - 2261 (1994)
- Austin, E.W., Okita, J.R., Okita, R.T., Larson, J.L., Bull, R.J.
Modification of lipoperoxidative effects of dichloroacetate and trichloroacetate is associated with peroxisome proliferation
Toxicology, 97, 59 - 69 (1995)
- Austin, E.W., Parrish, J.M., Kinder, D.H., Bull, R.J.
Lipid peroxidation and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine from acute doses of halogenated acetic acids
Fundam. Appl. Toxicol., 31, 77 - 82 (1996)
- Aynsley-Green, A., Weindling, A.M., Soltész, G., Ross, B., Jenkins, P.A.
Case report - dichloroacetate in the treatment of congenital lactic acidosis
J. Inherited Metab. Dis., 7, 26 (1984)
- Barton, H.A., Bull, R., Schultz, I., Andersen, M.E.
Dichloroacetate (DCA) dosimetry: interpreting DCA-induced liver cancer dose response and the potential for DCA to contribute to trichloroethylene-induced liver cancer
Toxicol. Lett., 106, 9 - 21 (1999)
- Benane, S.G., Blackman, C.F., House, D.E.
Effect of dichloroacetic acid, trichloroacetic acid and chloral hydrate on intercellular communication in clone 9 rat hepatocyte cells
In Vitro Cell. Develop. Biol. Animal, 30A, (3 Part 2), 99, Referat V-1019 (1994)
- Benane, S.G., Blackman, C.F., House, D.E.
Effect of perchloroethylene and its metabolites on intercellular communication in clone 9 rat liver cells
J. Toxicol. Environ. Health, 48, 427 - 437 (1996)
- Bersin, R.M., Wolfe, C., Kwasman, M., Lau, D., Klinski, C., Tanaka, K., Khorrami, P., Henderson, G.N., De Marco, T., Chatterjee, K.
Improved hemodynamic function and mechanical efficiency in congestive heart failure with sodium dichloroacetate
J. Am. Coll. Cardiol., 23, 1617 - 1624 (1994)
- Bhat, H.K., Kanz, M.F., Campbell, G.A., Ansari, G.A.S.
Ninety day toxicity study of chloroacetic acids in rats
Fundam. Appl. Toxicol., 17, 240 - 253 (1991)
- Blackshear, P.J., Fang, L.S.T., Axelrod, L.
Treatment of severe lactic acidosis with dichloroacetate
Diabetes Care, 5, 391 - 394 (1982)

- Brown, J.A., Gore, D.C.
In vivo metabolic response of glucose to dichloroacetate in humans
J. Surg. Res., 61, 391 - 394 (1996)
- Bruschi, S.A., Bull, R.J.
In vitro cytotoxicity of mono-, di-, and trichloroacetate and its modulation by hepatic peroxisome proliferation
Fundam. Appl. Toxicol., 21, 366 - 375 (1993)
- Bull, R.J., Sanchez, I.M., Nelson, M.A., Larson, J.L., Lansing, A.J.
Liver tumor induction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate
Toxicology, 63, 341 - 359 (1990)
- Bull, R.J., Templin, M., Larson, J.L., Stevens, D.K.
The role of dichloroacetate in the hepatocarcinogenicity of trichloroethylene
Toxicol. Lett., 68, 203 - 211 (1993)
- Burlina, A.B., Milanesi, O., Biban, P., Bordugo, A., Garavaglia, B., Zacchello, F., DiMauro, S.
Beneficial effect of sodium dichloroacetate in muscle cytochrome C oxidase deficiency
Eur. J. Pediatr., 152, 537 - 541 (1993)
- Carpenter, C.P., Smyth, H.F., jr.
Chemical burns of the rabbit cornea
Am. J. Ophthalmol., 29, 1363 - 1372 (1946)
- Carter, J.H., Carter, H.W., DeAngelo, A.B., Daniel, F.B.
Morphometric evaluation of short term effects of chloroacetic acids on hepatomegalia in the male B6C3F1 mouse
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 32, 84 (1991)
- Carter, J.H., Carter, H.W., DeAngelo, A.B.
Biochemical, pathologic and morphometric alterations induced in male B6C3F1 mouse liver by short-term exposure to dichloroacetic acid
Toxicol. Lett., 81, 55 - 71 (1995)
- Carter, H.W., Carter, J.H., Richmond, R.E., DeAngelo, A.B., Nesnow, S.
Dichloroacetic acid alters cell proliferation and cell death (apoptosis) in premalignant hepatic lesions in B6C3F1 male mice
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 39, 22, Abstract 149 (1998)
- Chang, L.W., DeAngelo, A.B., Daniel, F.B.
Evaluation of DNA strand breaks (SB) by chloroacetic acids (CAs) and chloroacetaldehydes (CADs) in vivo and in vitro
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 30, 146, Referat 578 (1989)
- Chang, L.W., Daniel, F.B., DeAngelo, A.B.
Analysis of DNA strand breaks induced in rodent liver in vivo, hepatocytes in primary culture, and a human cell line by chlorinated acetic acids and chlorinated acetaldehydes
Environ. Mol. Mutagen., 20, 277 - 288 (1992)
- Choi, S.Y., Park, O.J.
Differential display analysis of gene expression induced under DCA treatment in rat liver
J. Biochem. Mol. Biol., 29, 272 - 275 (1996)

- Cicmanec, J.L., Condie, L.W., Olson, G.R., Wang, S.R.
90-day toxicity study of dichloroacetate in dogs
Fundam. Appl. Toxicol., 17, 376 - 389 (1991)
- Clariant GmbH & Co. KG
Sicherheitsdatenblatt gemäß 2001/58/EG Dichloressigsäure D (2003)
- Cornett, R., Yan, Z., Henderson, G., Stacpoole, P.W., James, M.O.
Cytosolic biotransformation of dichloroacetic acid (DCA) in the Sprague-Dawley rat
Fundam. Appl. Toxicol., 36, 318, Abstract 1616 (1997)
- Cornett, R., James, M.O., Henderson, G.N., Cheung, J., Shroads, A.L., Stacpoole, P.W.
Inhibition of glutathione S-transferase ζ and tyrosine metabolism by dichloroacetate: a potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity
Biochem. Biophys. Res. Commun., 262, 752 - 756 (1999)
- Cosby, N.C., Dukelow, W.R.
Toxicology of maternally ingested trichloroethylene (TCE) on embryonal and fetal development in mice and of TCE metabolites on in vitro fertilization
Fundam. Appl. Toxicol., 19, 268 - 274 (1992)
- Coude, F.X., Saudubray, J.M., DeMaugre, F., Marsac, C., Leroux, J.P., Charpentier, C.
Dichloroacetate as treatment for congenital lactic acidosis
N. Engl. J. Med., 299, 1365 - 1366 (1978)
- Crabb, D.W., Yount, E.A., Harris, R.A.
The metabolic effects of dichloroacetate
Metabolism, 30, 1024 - 1039 (1981)
- Curry, S.H., Chu, P.I., Baumgartner, T.G., Stacpoole, P.W.
Plasma concentrations and metabolic effects of intravenous sodium dichloroacetate
Clin. Pharmacol. Ther., 37 (1), 89 - 93 (1985)
- Curry, S.H., Lorenz, A., Chu, P.I., Limacher, M., Stacpoole, P.W.
Disposition and pharmacodynamics of dichloroacetate (DCA) and oxalate following oral DCA doses
Biopharm. Drug Dispos., 12, 375 - 390 (1991)
- Daniel, F.B., DeAngelo, A.B., Stober, J.A., Olson, G.R., Page, N.P.
Hepatocarcinogenicity of chloral hydrate, 2-chloroacetaldehyde, and dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse
Fundam. Appl. Toxicol., 19, 159 - 168 (1992)
- Davidson, I.W.F., Beliles, R.P.
Consideration of the target organ toxicity of trichloroethylene in terms of metabolite toxicity and pharmacokinetics
Drug Metab. Rev., 23, 493 - 599 (1991)
- Davis, M.E.
Effect of chloroacetic acids on the kidneys
Environ. Health Perspect., 69, 209 - 214 (1986 a)
- Davis, M.E.
Comparison of subacute toxicities of dichloroacetate and trichloroacetate in female rats
Toxicologist, 6, 161 (1986 b)

- DeAngelo, A.B., Chavis, C.
Early changes in liver DNA synthesis and hepatocyte turnover during dichloroacetic acid (DCA) and trichloroacetic acid (TCA) carcinogenesis
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 32, 84, Referat 504 (1991)
- DeAngelo, A.B., Daniel, F.B.
The comparative carcinogenicity of dichloroacetic (DCA) and trichloroacetic (TCA) acid in the male B6C3F1 mouse
Toxicologist, 10, 148, Referat 592 (1990)
- DeAngelo, A.B., Daniel, F.B.
An evaluation of the carcinogenicity of the chloroacetic acids in the male F344 rat
Toxicologist, 12, 206, Referat 756 (1992)
- DeAngelo, A.B., Eldrich, S.
Early dose related inhibition of hepatocyte proliferation by dichloroacetic acid (DCA) in the male B6C3F1 mouse and F344 rat
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 37, 507, Abstract 3466 (1996)
- DeAngelo, A.B., McFadden, A.L.
Dichloroacetic acid (DCA) alterations of hepatic glucocorticoid receptor binding activity (GR) in male B6C3F1 mice
Toxicologist, 15, 314, Referat 1683 (1995)
- DeAngelo, A.B., McMillan, L.P.
Carcinogenicity of chlorinated acetic acids
Water Chlorination, 6, 193 - 199 (1990)
- DeAngelo, A.B., Herren-Freund, S., Pereira, M.A., Schults, N.E., Klaunig, J.E.
Species sensitivity to the induction of peroxisome proliferation by trichloroethylene and its metabolites
Toxicologist, 6, 113, Referat 459 (1986)
- DeAngelo, A.B., Daniel, F.B., McMillan, L., Wernsing, P., Savage, R.E., Jr.
Species and strain sensitivity to the induction of peroxisome proliferation by chloroacetic acids
Toxicol. Appl. Pharmacol., 101, 285 - 298 (1989)
- DeAngelo, A.B., Daniel, F.B., Stober, J.A., Olson, G.R.
The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse
Fundam. Appl. Toxicol., 16, 337 - 347 (1991)
- DeAngelo, A.B., Daniel, F.B., Most, B.M., Olson, G.R.
The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male Fischer 344 rat
Toxicology, 114, 207 - 221 (1996)
- DeAngelo, A.B., George, M.H., House, D.E.
Hepatocarcinogenicity in the male B6C3F1 mouse following a lifetime exposure to dichloroacetic acid in the drinking water: dose-response determination and modes of action
J. Toxicol. Environ. Health, part A, 58, 485 - 507 (1999)
- Dekant, W., Metzler, M., Henschler, D.
Novel metabolites of trichloroethylene through dechlorination reactions in rats, mice and humans
Biochem. Pharmacol., 33, 2021 - 2027 (1984)

- Dekant, W., Schulz, A., Metzler, M., Henschler, D.
Absorption, elimination and metabolism of trichloroethylene: a quantitative comparison between rats and mice
Xenobiotica, 16, 143 - 152 (1986)
- DeMarini, D.M., Perry, E., Shelton, M.L.
Dichloroacetic acid and related compounds: induction of prophage in *E. coli* and mutagenicity and mutation spectra in *Salmonella* TA100
Mutagenesis, 9, 429 - 437 (1994)
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe)
MAK- und BAT-Werte Liste 2005
Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2005)
- Diamond, M.P., Rollings, R.C., Erlendson, L., Williams, P.E., Lacy, W.W., Rabin, D., Cherrington, A.D.
Dichloroacetate - its in vivo effects on carbohydrate metabolism in the conscious dog
Diabetes, 29, 702 - 709 (1980)
- Dierickx, P.J.
In vitro binding of acetic acid and its chlorinated derivatives by the soluble glutathione S-transferases from rat liver
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 44, 327 - 330 (1984)
- Dierickx, P.J.
Cytotoxicity testing of 114 compounds by the determination of the protein content in HEP G2 cell cultures
Toxicology, 3 (3), 189 - 193 (1989)
- Enser, M., Whittington, F.M.
The actions of dichloroacetic acid on blood glucose, liver glycogen and fatty acid synthesis in obese-hyperglycaemic (*ob/ob*) and lean mice
Horm. Metabol. Res., 15, 225 - 229 (1983)
- EPA (United States Environmental Protection Agency)
IRIS (Integrated Risk Information System) summary dichloroacetic acid (CASNR 79-43-6) (2001)
via Internet <http://www.epa.gov/iriswebp/iris/subst/0654.htm>
- Epstein, D.L., Nolen, G.A., Randall, J.L., Christ, S.A., Read, E.J., Stober, J.A., Smith, M.K.
Cardiopathic effects of dichloroacetate in the fetal Long-Evans rat
Teratology, 46, 225 - 235 (1992)
- Erdinger, L., Kirsch, F., Sonntag, H.G.
Irritierende Wirkung von Nebenprodukten der Schwimmbadwasserdesinfektion
Zentralbl. Hyg. Umweltmed., 200, 491 - 503 (1997/98)
- Everhart, J.L., Kurtz, D.T., McMillan, J.M.
Dichloroacetic acid induction of peroxisome proliferation in cultured hepatocytes
J. Biochem. Mol. Toxicol., 12, 351 - 359 (1998)

- Ferreira-Gonzalez, A., DeAngelo, A.B., Nasim, S., Garrett, C.T.
Ras oncogene activation during hepatocarcinogenesis in B6C3F1 male mice by dichloroacetic and trichloroacetic acids
Carcinogenesis, 16, 495 - 500 (1995)
- Fisher, J.W., Mahle, D., Abbas, R.
A human physiologically based pharmacokinetic model for trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and free trichloroethanol
Toxicol. Appl. Pharmacol., 152, 339 - 359 (1998)
- Fox, A.W.
Reduction of elevated blood lactate using twice-daily dichloroacetate
United States Patent, Patent Number 5,587,397 (1996)
- Fox, A.W., Yang, X., Murli, H., Lawlor, T.E., Cifone, M.A., Reno, F.E.
Absence of mutagenic effects of sodium dichloroacetate
Fundam. Appl. Toxicol., 32, 87 - 95 (1996 a)
- Fox, A.W., Sullivan, B.W., Buffini, J.D., Neichin, M.L., Nicora, R., Hoehler, F.K., O'Rourke, R., Stoltz, R.R.
Reduction of serum lactate by sodium dichloroacetate, and human pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships
J. Pharmacol. Exp. Ther., 279, 686 - 693 (1996 b)
- Fuscoe, J.C., Afshari, A.J., George, M.H., DeAngelo, A.B., Tice, R.R., Salman, T., Allen, J.W.
In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay
Environ. Mol. Mutagen. 27, 1 - 9 (1996)
- Ge, R., Tao, L., Kramer, P.M., Pereira, M.A.
DNA hypomethylation in liver and tumors from dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-treated female B6C3F1 mice
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 39, 483, Abstract 3284 (1998)
- George, S.E., Nelson, G.M., Swank, A.E., Brooks, L.R., Bailey, K., George, M., DeAngelo, A.
The disinfection by-products dichloro-, dibromo-, and bromochloroacetic acid impact intestinal microflora and metabolism in Fischer 344 rats upon exposure in drinking water
Toxicol. Sci., 56, 282 - 289 (2000)
- Giller, S., Le Curieux, F., Erb, F., Marzin, D.
Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water
Mutagenesis, 12, 321 - 328 (1997)
- Gonzalez-Leon, A., Bull, R.J.
Continuous treatment with dichloroacetate in drinking water alters its metabolism in rats but not in mice
Fundam. Appl. Toxicol., Vol. 30, 217, Abstract 1108 (1996)
- Gonzalez-Leon, A., Schultz, I.R., Bull, R.J.
Species differences in the toxicokinetics of dichloroacetate and trichloroacetate in F344 rats and B6C3F1 mice after prolonged administration in drinking water
Fundam. Appl. Toxicol., 36, 33, Abstract 168 (1997 a)

- Gonzalez-Leon, A., Schultz, I.R., Xu, G., Bull, R.J.
Pharmacokinetics and metabolism of dichloroacetate in the F344 rat after prior administration in drinking water
Toxicol. Appl. Pharmacol., 146, 189 - 195 (1997 b)
und: Erratum
Toxicol. Appl. Pharmacol., 148, 194 (1998)
- Gordon, V.C., Mirhashemi, S., Wei, R.
Evaluation of the corrositex method to determine the corrosivity potential of surfactants, surfactant-based formulations, chemicals, and mixtures
in: Salem, H., Katz, S.A. (eds.)
Adv. Anim. Altern. Saf. Efficacy Test, 309 - 329 (1998)
- Greenberg, M.S., Burton, G.A., jr., Fisher, J.W.
Physiologically based pharmacokinetic modeling of inhaled trichloroethylene and its oxidative metabolites in B6C3F1 mice
Toxicol. Appl. Pharmacol., 154, 264 - 278 (1999)
- Gu, B., Song, L., Jiang, Y., Wen, A., Wang, J.
Pharmacokinetics of intravenously administered sodium dichloroacetate in rabbits
J. Med. Coll. PLA, 9 (4), 306 - 308 (1994)
- Harrington-Brock, K., Smith, T.W., Parker, L.M., Moore, M.M.
Genotoxic effects of by-products of the chlorination of drinking water
Environ. Mol. Mutagen., 19 (Suppl. 20), 24 (1992)
- Harrington-Brock, K., Doerr, C.L., Moore, M.M.
Mutagenicity of three disinfection by-products: di- and trichloroacetic acid and chloral hydrate in L5178Y/TK⁺-3.7.2C mouse lymphoma cells
Mutat. Res., 413, 265 - 276 (1998)
- Henderson, G.N., Curry, S.H., Derendorf, H., Wright, E.C., Stacpoole, P.W.
Pharmacokinetics of dichloroacetate in adult patients with lactic acidosis
J. Clin. Pharmacol., 37, 416 - 425 (1997 a)
- Henderson, G.N., Yan, Z., James, M.O., Davydova, N., Stacpoole, P.W.
Kinetics and metabolism of chloral hydrate in children: identification of dichloroacetate as a metabolite
Biochem. Biophys. Res. Commun., 235, 695 - 698 (1997 b)
- Herbert, V., Gardner, A., Colman, N.
Mutagenicity of dichloroacetate (DCA), an ingredient of the „cancer cure“ pangamic acid („vitamin B₁₅“)
Blood, 52, Suppl. 1, 252, Referat 534 (1978)
- Herbert, V., Gardner, A., Colman, N.
Dichloroacetate a mutagen?
N. Engl. J. Med., 300, 625 (1979 a)
- Herbert, V., Gardner, A., Colman, N.
Evidence for possible lack of safety for human consumption of dichloroacetate, a „sister compound“ and frequent ingredient of the non-vitamin „B₁₅“ (pangamate)
Am. J. Clin. Nutr., 32, 952 (1979 b)

- Herbert, V., Gardner, A., Colman, N.
Evidence for possible lack of safety for human consumption of dichloroacetate, a „sister compound“ and frequent ingredient of the non-vitamin „B₁₅“ (pangamate)
Clin. Res., 27, 551A (1979 c)
- Herbert, V., Gardner, A., Colman, N.
Mutagenicity of dichloroacetate, an ingredient of some formulations of pangamic acid (trade-named „vitamin B₁₅“)
Am. J. Clin. Nutr., 33, 1179 - 1182 (1980)
- Herren-Freund, S.L., Pereira, M.A., Khoury, M.D., Olson, G.
The carcinogenicity of trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid, in mouse liver
Toxicol. Appl. Pharmacol., 90, 183 - 189 (1987)
- Hunter, E.S., Rogers, E.H.
Free radicals do not mediate dichloroacetic acid-induced defects in whole embryo culture
Teratology, 51 (3), 172, Referat 61 (1995)
- Hunter, E.S., Rogers, E.H., Schmid, J.E., Richard, A.
Comparative effects of haloacetic acids in whole embryo in culture
Teratology, 54, 57 - 64 (1996)
- ILSI (International Life Sciences Institute), Health and Environmental Sciences Institute
An evaluation of EPA's proposed guidelines for carcinogen risk assessment using chloroform and dichloroacetate as case studies: report on an Expert Panel
ISBN 1-57881-002-7 (1997)
- Irsgler, K., Brändle, J., Kaspar, L., Kritz, H., Lageder, H., Regal, H.
Treatment of biguanide-induced lactic acidosis with dichloroacetate - 3 case histories
Arzneimittelforschung, 29, 555 - 559 (1979)
- Jahoor, F., Zhang, X., Frazer, E.
Mechanisms by which dichloroacetate lowers lactic acid levels: the kinetic interrelationships between lactate, pyruvate, alanine, and glucose
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 205 (1), 44 - 51 (1994)
- James, M.O., Jayanti, V.M., Henderson, G.N., Stacpoole, P.W.
In vivo and in vitro metabolism of [¹⁴C]-dichloroacetic acid (DCA) in the male Sprague-Dawley rat
Toxicologist, 15, 261, Referat 1396 (1995)
- James, M.O., Cornett, R., Yan, Z., Henderson, G.N., Stacpoole, P.W.
Glutathione-dependent conversion to glyoxylate, a mayor pathway of dichloroacetate biotransformation in hepatic cytosol from humans and rats, is reduced in dichloroacetate-treated rats
Drug Metab. Dispos., 25, 1223 - 1227 (1997)
- James, M.O., Yan, Z., Cornett, R., Jayanti, V.M.K.M., Henderson, G.N., Davydova, N., Katovich, M.J., Pollock, B., Stacpoole, P.W.
Pharmacokinetics and metabolism of [¹⁴C]dichloroacetate in male Sprague-Dawley rats - identification of glycine conjugates, including hippurate, as urinary metabolites of dichloroacetate
Drug. Metab. Dispos., 26, 1134 - 1143 (1998)

JETOC (Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & Information Center, Japan)
Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation system of the industrial safety and health law (1996)

Kandala, J.C., Nambiar, A., DeAngelo, A.B., Mass, M.J., Guntaka, R.V.
Suppression of NADH dehydrogenase subunit 4 mRNA expression in rat liver tumors induced by dichloroacetic acid
Environ. Sci., 5, 35 - 47 (1997)

Kato, J., Bull, R.J.
Effects of dichloroacetic acid on control of glycogen metabolism in male B6C3F1 mice
Toxicologist, 15, 314, Referat 1684 (1995)

Kato, M., Saito, H., Isoda, S., Nakazawa, H.
Structure-activity relationships of halogenated by-products detected in chlorinated water and related mutagenic activities
Environ. Mutagen. Res., 21, 23 - 29 (1999)

Kato-Weinstein, J., Lingohr, M.K., Orner, G.A., Thrall, B.D., Bull, R.J.
Effects of dichloroacetate on glycogen metabolism in B6C3F1 mice
Toxicology, 130, 141 - 154 (1998)

Katz, R., Diener, R., Thompson, S.
CGS 7937A (sodium dichloroacetate): 30-day intravenous administration to dogs
Unpublished Toxicology/Pathology Report No. 7-77, Sec. C, p-52, Ciba-Geigy Pharmaceuticals Division, Summit, New Jersey (1977)
zitiert in: Katz et al. (1981)

Katz, R., Tai, C.N., Diener, R.M., McConnell, R.F., Semonick, D.E.
Dichloroacetate, sodium: 3-month oral toxicity studies in rats and dogs
Toxicol. Appl. Pharmacol., 57, 273 - 287 (1981)

Ketcha, M.M., Stevens, D.K., Warren, D.A., Bishop, C.T., Brashear, W.T.
Conversion of trichloroacetic acid to dichloroacetic acid in biological samples
J. Anal. Toxicol., 20, 236 - 241 (1996)

Kim, H., Weisel, C.P.
Dermal absorption of dichloro- and trichloroacetic acids from chlorinated water
J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol., 8, 555 - 575 (1998)

Kodama, H., Yamaguchi, S., Okabe, I., Kodama, M., Orii, T., Kamoshita, S.
Renal effects of dichloroacetate in vivo
Clin. Chim. Acta, 160, 265 - 271 (1986)

Koenig, G., Lohmar, E., Rupprich, N.
Chloroacetic acids - dichloroacetic Acid
in: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry
6th ed.
Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (2001)

Kohan, M.J., Huggins-Clark, G.
Mutagenicity of chlorinated and brominated acetic acids
Environ. Mol. Mutagen., 31 (Suppl. 29), 36, Referat P37 (1998)

- Kramer, P.M., Latendresse, J.R., Pereira, M.A.
Promotion by mixtures of dichloroacetic and trichloroacetic acid of methylnitrosourea-initiated carcinogenesis in B6C3F1 mouse liver
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 37, 159, Referat 1099 (1996)
- Krishna, S., Supanaranond, W., Pukrittayakamee, S., Karter, D., Supputamongkol, Y., Davis, T.M.E., Holloway, P.A., White, N.J.
Dichloroacetate for lactic acidosis in severe malaria: a pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment
Metabolism, 43, 974 - 981 (1994)
- Krishna, S., Agbenyega, T., Angus, B.J., Bedu-Addo, G., Ofori-Amanfo, G., Henderson, G., Szwandt, I.S.F., O'Brien, R., Stacpoole, P.W.
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dichloroacetate in children with lactic acidosis due to severe malaria
Q. J. Med., 88, 341 - 349 (1995)
- Krishna, S., Supanaranond, W., Pukrittayakamee, S., Kuile, F.T., Ruprah, M., White, N.J.
The disposition and effects of two doses of dichloroacetate in adults with severe falciparum malaria
Br. J. Clin. Pharmacol., 41, 29 - 34 (1996)
- Kurlemann, G., Paetzke, I., Möller, H., Masur, H., Schuierer, G., Weglage, J., Koch, H.G.
Therapy of complex I deficiency: peripheral neuropathy during dichloroacetate therapy
Eur. J. Pediatr., 154, 928 - 932 (1995)
- Kuroda, Y., Ito, M., Toshima, K., Takeda, E., Naito, E., Hwang, T.J., Hashimoto, T., Miyao, M., Masuda, M., Yamashita, K., Adachi, T., Suzuki, Y., Nishiyama, K.
Treatment of chronic congenital lactic acidosis by oral administration of dichloroacetate
J. Inherited Metab. Dis., 9, 244 - 252 (1986)
- Larson, J.L., Bull, R.J.
Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice
Toxicol. Appl. Pharmacol., 115, 268 - 277 (1992 a)
- Larson, J.L., Bull, R.J.
Species differences in the metabolism of trichloroethylene to the carcinogenic metabolites trichloroacetate and dichloroacetate
Toxicol. Appl. Pharmacol., 115, 278 - 285 (1992 b)
- Latendresse, J.R., Pereira, M.A.
Dissimilar characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-initiated foci and tumors promoted by dichloroacetic acid or trichloroacetic acid in the liver of female B6C3F1 mice
Toxicol. Pathol., 25, 433 - 440 (1997)
- Leavitt, S.A., Ross, J.A.
Dichloroacetic acid is mutagenic in Big Blue transgenic B6C3F1 mouse liver
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 38, 125, Referat 835 (1997)
- Leavitt, S.A., DeAngelo, A.B., George, M.H., Ross, J.A.
Assessment of the mutagenicity of dichloroacetic acid in lacI transgenic B6C3F1 mouse liver
Carcinogenesis, 18, 2101 - 2106 (1997)

- Lide, D.R., Frederikse, H.P.R. (eds.)
 CRC handbook of chemistry and physics
 77th ed., p. 3-7
 CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo (1996)
- Liebsch, M., Döring, B., Donnelly, T.A., Logemann, P., Rheins, L.A., Spielmann, H.
 Application of the human dermal model skin² ZK 1350 to phototoxicity and skin corrosivity testing
 Toxicol. in Vitro, 9, 557 - 562 (1995)
- Lin, E.L.C., Mattox, J.K., Daniel, F.B.
 Tissue distribution, excretion, and urinary metabolites of dichloroacetic acid in the male Fischer 344 rat
 J. Toxicol. Environ. Health, 38, 19 - 32 (1993)
- Linder, R.E., Klinefelter, G.R., Strader, L.F., Suarez, J.D., Roberts, N.L.
 Spermatotoxicity of dichloroacetic acid
 Reprod. Toxicol., 11, 681 - 688 (1997)
- Lingohr, M.K., Thrall, B.D., Bull, R.J.
 Effects of dichloroacetate (DCA) on serum insulin levels and insulin-controlled signaling proteins in livers of male B6C3F1 mice
 Toxicol. Sci., 59, 178 - 184 (2001)
- Lingohr, M.K., Bull, R.J., Kato-Weinstein, J., Thrall, B.D.
 Dichloroacetate stimulates glycogen accumulation in primary hepatocytes through an insulin-independent mechanism
 Toxicol. Sci., 68, 508 - 515 (2002)
- Lipscomb, J.C., Mahle, D.A., Brashear, W.T., Barton, H.A.
 Dichloroacetic acid: metabolism in cytosol
 Drug Metab. Dispos., 23, 1202 - 1205 (1995)
- Ludvik, B., Peer, G., Berzlanovich, A., Stifter, S., Graf, H.
 Effects of dichloroacetate and bicarbonate on haemodynamic parameters in healthy volunteers
 Clin. Sci., 80, 47 - 51 (1991)
- Lukas, G., Vyas, K.H., Brindle, S.D., Le Sher, A.R., Wagner, W.E., Jr.
 Biological disposition of sodium dichloroacetate in animals and humans after intravenous administration
 J. Pharm. Sci., 69 (4), 419 - 421 (1980)
- Marangos, P.J., Turkel, C.C., Dziewanowska, Z.E., Fox, A.W.
 Dichloroacetate and cerebral ischaemia therapeutics
 Expert Opin. Invest. Drugs, 8, 373 - 382 (1999)
- Maronpot, R.R., Haseman, J.K., Boorman, G.A., Eustis, S.E., Rao, G.N., Huff, J.E.
 Liver lesions in B6C3F1 mice: the National Toxicology Program, experience and position
 Arch. Toxicol., Suppl. 10, 10 - 26 (1987)
- Maronpot, R.R., Anna, C.H., Devereux, T.R., Lucier, G.W., Butterworth, B.E., Anderson, M.W.
 Considerations concerning the murine hepatocarcinogenicity of selected chlorinated hydrocarbons
 Prog. Clin. Biol. Res., 391, 305 - 323 (1995)

- Mather, G.G., Exon, J.H., Koller, L.D.
Subchronic 90 day toxicity of dichloroacetic and trichloroacetic acid in rats
Toxicology, 64, 71 - 80 (1990)
- Matsuda, H., Ose, Y., Nagase, H., Sato, T., Kito, H., Sumida, K.
Mutagenicity of ozonation and chlorination products from p-hydroxybenzaldehyde
Sci. Total Environ., 103, 141 - 149 (1991)
- McCormick, K., Viscardi, R.M., Robinson, B., Heining, J.
Partial pyruvate decarboxylase deficiency with profound lactic acidosis and hyperammonemia: responses to dichloroacetate and benzoate
Am. J. Med. Genet., 22, 291 - 299 (1985)
- Mc Khann, G., Francois, B., Evrard, P.
Long term use of low doses of dichloroacetate in a child with congenital lactic acidosis
Pediatr. Res., 14, 167 (1980)
- Meier, J. (ohne Jahreszahl)
zitiert in: DeAngelo und McMillan (1990)
- Meier, J.R., Stewart, B.E., Blazak, W.F.
Genotoxicity studies of sodium dichloroacetate and sodium trichloroacetate
Environ. Sci., 5, 95 - 108 (1997)
- Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A., Bull, R.J., Schultz, I.R.
The extent of dichloroacetate formation from trichloroethylene, chloral hydrate, trichloroacetate, and trichloroethanol in B6C3F1 mice
Toxicol. Sci., 45, 33 - 41 (1998)
- Merdink, J.L., Stenner, R.D., Stevens, D.K., Parker, J.C., Bull, R.J.
Effect of enterohepatic circulation on the pharmacokinetics of chloral hydrate and its metabolites in F344 rats
J. Toxicol. Environ. Health, Part A, 56, 357 - 368 (1999)
- Miller, J.H., Minard, K., Wind, R.A., Orner, G.A., Sasser, L.B., Bull, R.J.
In vivo MRI measurements of tumor growth induced by dichloroacetate: implications for mode of action
Toxicology, 145, 115 - 125 (2000)
- Moore, G.W., Swift, L.L., Rabinowitz, D., Crofford, O.B., Oates, J.A., Stacpoole, P.W.
Reduction of serum cholesterol in two patients with homozygous familial hypercholesterolemia by dichloroacetate
Atherosclerosis, 33, 285 - 293 (1979)
- Moser, V.C., Phillips, P.M., McDaniel, K.L., MacPhail, R.C.
Behavioral evaluation of the neurotoxicity produced by dichloroacetic acid in rats
Neurotoxicol. Teratol., 21, 719 - 731 (1999)
- Moulds, B.A., Goodman, J.I.
Spontaneous mutation at codon 61 of the Ha-ras gene in the nascent liver of B6C3F1, C3H/He and C57BL/6 mice
Mutat. Res., 311, 1 - 7 (1994)

Naito, E., Kuroda, Y., Toshima, K., Takeda, E., Saijo, T., Kobashi, H., Yokota, I., Ito, M.
Effect of sodium dichloroacetate on human pyruvate metabolism
Brain Dev., 11, 195 - 197 (1989)

Narayanan, L., Moghaddam, A.P., Taylor, A.G., Sudberry, G.L., Fisher, J.W.
Sensitive high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of low levels of dichloroacetic acid and its metabolites in blood and urine
J. Chromatography, 729, 271 - 277 (1999)

Narotsky, M.G., Hamby, B.T., Best, D.S., Hunter, E.S.
In vivo developmental effects of dibromoacetic acid (DBA) and dichloroacetic acid (DCA) in mice
Teratology, 53, 96 - 97 (1996)

Nelson, M.A., Bull, R.J.
Induction of strand breaks in DNA by trichloroethylene and metabolites in rat and mouse liver in vivo
Toxicol. Appl. Pharmacol., 94, 45 - 54 (1988)

Nelson, M.A., Bull, R.J., Springer, D.L.
Dichloroacetate (DCA) induced DNA strand breaks appear before peroxisome proliferation
Toxicologist, 8, 167, Referat 665 (1988)

Nelson, M.A., Lansing, A.J., Sanchez, I.M., Bull, R.J., Springer, D.L.
Dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-induced DNA strand breaks are independent of peroxisome proliferation
Toxicology, 58, 239 - 248 (1989)

Nelson, M.A., Sanchez, I.M., Bull, R.J., Sylvester, S.R.
Increased expression of c-myc and c-H-ras in dichloroacetate and trichloroacetate-induced liver tumors in B6C3F1 mice
Toxicology, 64, 47 - 57 (1990)

NTP (National Toxicology Program)
Management Status Report (2003)

Okabe, I., Kodama, H., Shimoizumi, H., Kamoshita, S., Miyabayashi, S.
Treatment of lactic acidosis: effects of dichloroacetate on lactate and pyruvate levels in the cerebrospinal fluid
Eur. J. Pediatr., 145, 159 (1986)

Ono, Y., Somiya, I., Kawamura, M.
The evaluation of genotoxicity using DNA repairing test for chemicals produced in chlorination and ozonation processes
Wat. Sci. Tech., 23, 329 - 338 (1991)

Park, R., Radosevich, P.R., Leach, W.J., Seto, P., Arieff, A.I.
Metabolic effects of dichloroacetate in diabetic dogs
Am. J. Physiol., 245, E94 - E101 (1983)

Peer, G., Graf, H.
Natrium-Dichloroazetat - eine Substanz mit vielfältigem therapeutischen Potential
Wiener Klin. Wochenschr., 102, 65 - 68 (1990)

- Pegorier, J.P., Ferré, P., Leturque, A., Girard, J.
The metabolic effects of sodium dichloroacetate in the suckling newborn rat
Diabetologia, 15, 459 - 463 (1978)
- Pereira, M.A.
Characterization of methylnitrosourea (MNU)-initiated foci and tumors in B6C3F1 mice promoted by dichloroacetic acid (DCA) or trichloroacetic acid (TCA)
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 35, 168, Referat 1006 (1994)
- Pereira, M.A.
Carcinogenic activity of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid in the liver of female B6C3F1 mice
Fundam. Appl. Toxicol., 31, 192 - 199 (1996)
- Pereira, M.A., Phelps, J.B.
Promotion by dichloroacetic acid and trichloroacetic acid of N-methyl-N-nitrosourea-initiated cancer in the liver of female B6C3F1 mice
Cancer Lett., 102, 133 - 141 (1996)
- Pereira, M.A., Li, K., Kramer, P.M.
Promotion by mixtures of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid of N-methyl-N-nitrosourea-initiated cancer in the liver of female B6C3F1 mice
Cancer Lett., 115, 15 - 23 (1997)
- Pravecek, T.L., Channel, S.R., Dean, K.W., Hancock, B.L., Schmidt, W.J.
Cytotoxic and metabolic analysis of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid using precision cut liver slices
Toxicologist, 14 (1), 32, Referat 35 (1994)
- Pravecek, T.L., Channel, S.R., Schmidt, W.J., Kidney, J.K.
Cytotoxicity and metabolism of dichloroacetic and trichloroacetic acid in B6C3F1 mouse liver tissue
In Vitro Toxicol., 9, 261 - 269 (1996)
- Randall, J.L., Christ, S.A., Nolen, G.A., Read, E.J., Smith, M.K.
Developmental effects of dichloroacetic acid in the Long-Evans rats. II. Establishment of no adverse effect level
Teratology, 43, 454, Referat P123 (1991)
- RBM (Istituto di Ricerche Biomediche „Antoine Marxer“ S.p.A., Ivrea, Italien)
Study of the capacity of the test article dichloroacetic acid to induce gene mutation in V79 Chinese hamster lung cells
unveröffentlichter Bericht Exp. No. 930589 (1994 a)
im Auftrag der Chemie-Wirtschaftsförderungs-Gesellschaft (CWFG), Frankfurt/Main
- RBM (Istituto di Ricerche Biomediche „Antoine Marxer“ S.p.A., Ivrea, Italien)
Study of the capacity of the test article dichloroacetic acid to induce chromosome aberrations in V79 Chinese hamster lung cells
unveröffentlichter Bericht Exp. No. 930590 (1994 b)
im Auftrag der Chemie-Wirtschaftsförderungs-Gesellschaft (CWFG), Frankfurt/Main

- Reddy, T.V., Chang, L.W., DeAngelo, A.B., Pereira, M.A., Daniel, F.B.
Effect of nongenotoxic environmental contaminants on cholesterol and DNA synthesis in cultured primary rat hepatocytes
Environ. Sci., 1 (4), 179 - 189 (1992)
- Richmond, R.E., DeAngelo, A.B., Potter, C.L., Daniel, F.B.
The role of hyperplastic nodules in dichloroacetic acid-induced hepatocarcinogenesis in B6C3F1 male mice
Carcinogenesis, 12 (8), 1383 - 1387 (1991)
- Richmond, R.E., Carter, J.H., Carter, H.W., Daniel, F.B., DeAngelo, A.B.
Immunohistochemical analysis of dichloroacetic acid (DCA)-induced hepatocarcinogenesis in male Fischer (F344) rats
Cancer Lett., 92, 67 - 76 (1995)
- Roth, A.C., Crocker, W., Wessendarp, T.K., Smith, M.K., Gordon, D.A.
Dose related absorption and distribution of dichloroacetate (DCA) in pregnant Long-Evans rats
Teratology, 43, 428, Referat P36 (1991)
- Saijo, T., Naito, E., Ito, M., Takeda, E., Hashimoto, T., Kuroda, Y.
Therapeutic effect of sodium dichloroacetate on visual and auditory hallucinations in a patient with MELAS
Neuropediatrics, 22, 166 - 167 (1991)
- Saillenfait, A.M., Langonné, I., Sabaté, J.P.
Developmental toxicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene and four of their metabolites in rat whole embryo culture
Arch. Toxicol., 70, 71 - 82 (1995)
- Saito, H., Isoda, S., Kato, M., Nagaoka, N.
Mutagenic activity of indoor swimming pool water
Environ. Mut. Res. Commun., 17, 169 - 177 (1995)
- Saitoh, S., Momoi, M.Y., Yamagata, T., Mori, Y., Imai, M.
Effects of dichloroacetate in three patients with MELAS
Neurology, 50, 531 - 534 (1998)
- Salman, T., Fuscoe, J., Deangelo, A., Tice, R.
In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay
CMB, 3, 725 - 736 (1996)
- Sanchez, I.M., Bull, R.J.
Hepatotoxic effects of dichloroacetate (DCA) and trichloroacetate (TCA) in B6C3F1 mice
Toxicologist, 9, 212, Referat 845 (1989)
- Sanchez, I.M., Bull, R.J.
Early induction of reparative hyperplasia in the liver of B6C3F1 mice treated with dichloroacetate and trichloroacetate
Toxicology, 64, 33 - 46 (1990)
- Scheid, J., Abu-Romeh, S., Tannen, R.L.
Effect of Na dichloroacetate (DCA) in hypoxic lactic acidosis in rats
Kidney Int., 27, 152 (1985)

- Schroeder, M., DeAngelo, A.B., Mass, M.J.
Dichloroacetic acid reduces Ha-ras codon 61 mutations in liver tumors from female B6C3F1 mice
Carcinogenesis, 18, 1675 - 1678 (1997)
- Schultz, I.R., Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A., Bull, R.J.
Comparative toxicokinetics of chlorinated and brominated haloacetates in F344 rats
Toxicol. Appl. Pharmacol., 158, 103 - 114 (1999)
- Shangraw, R.E., Fisher, D.M.
Pharmacokinetics of dichloroacetate in patients undergoing liver transplantation
Anesthesiology, 84, 851 - 858 (1996)
- Shangraw, R.E., Fisher, D.M.
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dichloroacetate in patients with cirrhosis
Chin. Pharm. Ther., 66, 380 - 390 (1999)
- Shangraw, R.E., Jahoor, F., Wolfe, R.R.
Mechanism of plasma lactate reduction by dichloroacetate in humans
FASEB J., 6, A1519, Referat 3377 (1992)
- Shangraw, R.E., Rabkin, J.M., Lopaschuk, G.D.
Dichloroacetate activates hepatic pyruvate dehydrogenase in humans undergoing liver transplantation
Anesthesiology, 81 (Suppl.), A277 (1994 a)
- Shangraw, R.E., Winter, R., Hromco, J., Robinson, S.T., Gallaher, E.J.
Amelioration of lactic acidosis with dichloroacetate during liver transplantation in humans
Anesthesiology, 81, 1127 - 1138 (1994 b)
- Shin, B.A., Guntaka, R.V.
Mechanism of induction of liver tumors by non-genotoxic chemicals
J. Korean Soc. Microbiol., 30, 367 - 374 (1995)
- Smith, M.K., Randall, J.L., Read, E.J., Stober, J.A.
Developmental toxicity of dichloroacetate in the rat
Teratology, 46, 217 - 223 (1992)
- Smyth, H.F., Jr., Carpenter, C.P., Weil, C.S.
Range-finding toxicity data: list III
J. Ind. Hyg. Toxicol, 31, 60 - 62 (1949)
- Smyth, H.F., Jr., Carpenter, C.P., Weil, C.S.
Range-finding toxicity data: list IV
Arch. Ind. Hyg. Occup. Med., 4, 119 - 122 (1951)
- Snyder, R.D., Carter, H.W., Carter, J.H., DeAngelo, A.B.
Early effect of dichloroacetic acid (DCA) on spontaneous apoptosis in the male B6C3F1 mouse liver
Toxicologist, 15, 314, Referat 1682 (1995 a)
- Snyder, R.D., Carter, H.W., Carter, J.H., Pullman, J.L., DeAngelo, A.B.
Effects of dichloroacetic acid (DCA) on apoptosis in normal preneoplastic and neoplastic liver in the male B6C3F1 mouse
Anticancer Res., 15, 1727, Referat 251 (1995 b)

- Snyder, R.D., Pullman, J., Carter, J.H., Carter, H.W., DeAngelo, A.B.
In vivo administration of dichloroacetic acid suppresses spontaneous apoptosis in murine hepatocytes
Cancer Res., 55, 3702 - 3705 (1995 c)
- Spencer, P.S., Bischoff, M.C., Stacpoole, P.W.
Differential neurotoxicity of dichloroacetate and 2,5-hexanedione: implications for the pathogenesis of gamma-diketone neuropathy
Toxicologist, 1, 51, Referat 186 (1981)
- Stacpoole, P.W.
Review of the pharmacologic and therapeutic effects of diisopropylammonium dichloroacetate (DIPA)
J. Clin. Pharmacol., 9, 282 - 291 (1969)
- Stacpoole, P.W.
The pharmacology of dichloroacetate
Metabolism, 38, 1124 - 1144 (1989)
- Stacpoole, P.W.
Lactic acidosis
Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 22, 221 - 245 (1993)
- Stacpoole, P.W.
Lactic acidosis and other mitochondrial disorders
Metabolism, 46, 306 - 321 (1997)
- Stacpoole, P.W., Greene, Y.J.
Dichloroacetate
Diabetes Care, 15, 785 - 791 (1992)
- Stacpoole, P.W., Moore, G.W., Kornhauser, D.M.
Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia
N. Engl. J. Med., 298, 526 - 530 (1978)
- Stacpoole, P.W., Moore, G.W., Kornhauser, D.M.
Toxicity of chronic dichloroacetate
N. Engl. J. Med., 300, 372 (1979)
- Stacpoole, P.W., Harman, E.M., Curry, S.H., Baumgartner, T.G., Misbin, R.I.
Treatment of lactic acidosis with dichloroacetate
N. Engl. J. Med., 309, 390 - 396 (1983)
- Stacpoole, P.W., Harwood, H.J., Jr., Curry, S.H., Schneider, M., Cockrill, A., Sauberlich, H.E.
Induction of thiamine deficiency by dichloroacetate
Clin. Res., 32, 236A (1984)
- Stacpoole, P.W., Lorenz, A.C., Thomas, R.G., Harman, E.M.
Dichloroacetate in the treatment of lactic acidosis
Ann. Int. Med., 108, 58 - 63 (1988)

Stacpoole, P.W., Harwood, H.J., Jr., Cameron, D.F., Curry, S.H., Samuelson, D.A., Cornwell, P.E., Sauberlich, H.E.

Chronic toxicity of dichloroacetate: possible relation to thiamine deficiency in rats
Fundam. Appl. Toxicol., 14, 327 - 337 (1990)

Stacpoole, P.W., Wright, E.C., Baumgartner, T.G., Bersin, R.M., Buchalter, S., Curry, S.H., Duncan, C.A., Harman, E.M., Henderson, G.N., Jenkinson, S., Lachin, J.M., Lorenz, A., Schneider, S.H., Siegel, J.H., Summer, W.R., Thompson, D., Wolfe, C.L., Zorovich, B.,

A controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of lactic acidosis in adults
N. Engl. J. Med., 327, 1564 - 1569 (1992)

Stacpoole, P.W., Barnes, C.L., Hurbanis, M.D., Cannon, S.L., Kerr, D.S.

Treatment of congenital lactic acidosis with dichloroacetate
Arch. Dis. Childhood, 77, 535 - 541 (1997)

Stacpoole, P.W., Henderson, G.N., Yan, Z., Cornett, R., James, M.O.

Pharmacokinetics, metabolism, and toxicology of dichloroacetate
Drug Metab. Rev., 30, 499 - 539 (1998 a)

Stacpoole, P.W., Henderson, G.N., Yan, Z., James, M.O.

Clinical pharmacology and toxicology of dichloroacetate
Environ. Health Perspect., 106, Suppl. 4, 989 - 994 (1998 b)

Stauber, A.J., Bull, R.J.

Differences in phenotype and cell replicative behavior of hepatic tumors induced by dichloroacetate (DCA) and trichloroacetate (TCA)
Toxicol. Appl. Pharmacol., 144, 235 - 246 (1997)

Stauber, A.J., Bull, R.J., Thrall, B.D.

Dichloroacetate and trichloroacetate promote clonal expansion of anchorage-independent hepatocytes in vivo and in vitro
Toxicol. Appl. Pharmacol., 150, 287 - 294 (1998)

Stevens, D.K., Eyre, R.J., Bull, R.J.

Adduction of hemoglobin and albumin in vivo by metabolites of trichloroethylene, trichloroacetate, and dichloroacetate in rats and mice
Fundam. Appl. Toxicol., 19, 336 - 342 (1992)

Takanashi, J., Sugita, K., Tanabe, Y., Maemoto, T., Niimi, H.

Dichloroacetate treatment in Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA mutation
J. Neurol. Sci., 145, 83 - 86 (1997)

Tamirisa, A.

The evaluation of murine hepatic peroxisome proliferation induced by exposure of chlorinated contaminants of drinking water
Annual Meeting of Science Innovation Exposition, 163, A-112 (1997)

Tao, L., Li, K., Kramer, P.M., Pereira, M.A.

Loss of heterozygosity on chromosome 6 in dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-induced liver tumors in female B6C3F1 mice
Cancer Lett., 108, 257 - 261 (1996)

- Tao, L., Kramer, P.M., Ge, R., Pereira, M.A.
Effect of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid on DNA methylation in liver and tumors of female B6C3F1 mice
Toxicol. Sci., 43, 139 - 144 (1998)
- Tao, L., Yang, S., Xie, M., Kramer, P.M., Pereira, M.A.
Effect of trichloroethylene and its metabolites, dichloroacetic acid and trichloroacetic acid, on the methylation and expression of c-Jun and c-Myc protooncogenes in mouse liver: prevention by methionine
Toxicol. Sci., 54, 399 - 407 (2000)
- Templin, M.V., Parker, J.C., Bull, R.J.
Relative formation of dichloroacetate and trichloroacetate from trichloroethylene in male B6C3F1 mice
Toxicol. Appl. Pharmacol., 123, 1 - 8 (1993)
- Tong, Z., Board, P.G., Anders, M.W.
Glutathione transferase zeta catalyses the oxygenation of the carcinogen dichloroacetic acid to glyoxylic acid
Biochem. J., 331, 371 - 374 (1998 a)
- Tong, Z., Board, P.G., Anders, M.W.
Glutathione transferase zeta-catalyzed biotransformation of dichloroacetic acid and other α -haloacids
Chem. Res. Toxicol., 11, 1332 - 1338 (1998 b)
- Toth, G.P., Kelty, K.C., George, E.L., Read, E.J., Smith, M.K.
Adverse male reproductive effects following subchronic exposure of rats to sodium dichloroacetate
Fundam. Appl. Toxicol., 19, 57 - 63 (1992)
- Tóth, P.P., El-Shanti, H., Eivins, S., Rhead, W.J., Klein, J.M.
Transient improvement of congenital lactic acidosis in a male infant with pyruvate decarboxylase deficiency treated with dichloroacetate
J. Pediatr., 123, 427 - 430 (1993)
- Toxopeus, C., Frazier, J.M.
Kinetics of trichloroacetic acid and dichloroacetic acid in the isolated perfused rat liver
Toxicol. Appl. Pharmacol., 152, 90 - 98 (1998)
- Traina, V., Katz, R., Diener, R., Thompson, S.
CGS 7937A (sodium dichloroacetate): acute and subacute toxicity studies in mice, rats and dogs
Unpublished Toxicology/Pathology Report No. 7-77, Ciba-Geigy Pharmaceuticals Division, Summit, New Jersey (1977)
zitiert in: Katz et al. (1981)
- Tsai, W.H., DeAngelo, A.B.
Responsiveness of hepatocytes from dichloroacetic acid (DCA) or phenobarbital (PB) treated mice to growth factors (GF) in primary culture
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 34, 150, Referat 894 (1993)

- Tsai, W.H., DeAngelo, A.B.
Responsiveness of hepatocytes from dichloroacetic acid or phenobarbital treated mice to growth factors in primary culture
Cancer Lett., 99, 177 - 183 (1996)
- Tzeng, H.F., Blackburn, A.C., Board, P.G., Anders, M.W.
Polymorphism- and species-dependent inactivation of glutathione transferase zeta by dichloroacetate
Chem. Res. Toxicol., 13, 231 - 236 (2000)
- Ueno, H., Oishi, K., Kubota, T., Sayato, Y., Nakamuro, K.
Effects of chlorination by-products on immune response
J. Health Sci., 45, P-25 (1999)
- Völkel, W., Friedewald, M., Lederer, E., Pähler, A., Parker, J., Dekant, W.
Biotransformation of perchloroethene: dose-dependent excretion of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, and N-acetyl-S-(trichlorovinyl)-L-cysteine in rats and humans after inhalation
Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 20 - 27 (1998)
- Voogd, C.E., Jacobs, J.J.J.A.A., van der Stel, J.J.
On the mutagenic action of dichlorvos
Mutat. Res., 16, 413 - 416 (1972)
- Walgren, J.E., Kurtz, D.T., McMillan, J.M.
The effect of the trichloroethylene metabolites trichloroacetate and dichloroacetate on peroxisome proliferation and DNA synthesis in cultured human hepatocytes
Cell Biol. Toxicol., 16, 257 - 273 (2000)
- Ward, K.W., Rogers, E.H., Hunter, E.S.
Pathogenesis of haloacetic acid-induced embryotoxicity in mouse whole embryo culture
Toxicologist, 42 (1-S), 260, Referat 1284 (1998)
- Wargovich, T.J., MacDonald, R.G., Hill, J.A., Feldman, R.L., Stacpoole, P.W., Pepine, C.J.
Myocardial metabolic and hemodynamic effects of dichloroacetate in coronary artery disease
Am. J. Cardiol., 61, 65 - 70 (1988)
- Washington State University, College of Pharmacy
Importance of dichloroacetate and trichloroacetate to the hepatocarcinogenic response to trichloroethylene in B6C3F1 mice
Final Report, U.S. Air Force Grant No. AFOSR-86-0284 (1989)
im Auftrag des Air Force Office of Scientific Research/NL
NTIS AD-A214501
- Waskell, L.
A study of the mutagenicity of anesthetics and their metabolites
Mutat. Res., 57, 141 - 153 (1978)
- Watanabe, K., Sakamoto, K., Sasaki, T.
Comparisons on chemically-induced mutagenicity among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2 uvrA/pKM101: collaborative study I
Mutat. Res., 361, 143 - 155 (1996)

- Wells, P.G., Moore, G.W., Rabin, D., Wilkinson, G.R., Oates, J.A., Stacpoole, P.W.
Metabolic effects and pharmacokinetics of intravenously administered dichloroacetate in humans
Diabetologia, 19, 109 - 113 (1980)
- Woodard, G., Lange, S.W., Nelson, K.W., Calvery, H.O.
The acute oral toxicity of acetic, chloroacetic, dichloroacetic and trichloroacetic acids
J. Ind. Hyg. Toxicol., 23, 78 - 82 (1941)
- Xu, G., Stevens, D.K., Bull, R.J.
Metabolism of bromodichloroacetate in B6C3F1 mice
Drug Metab. Dispos., 23, 1412 - 1416 (1995)
- Yan, Z., James, M.O., Henderson, G.N., Cornett, R., Jayanti, V.K.M.M., Davydova, N., Stacpoole, P.W.
Pharmacokinetics and metabolism of dichloroacetate (DCA) in Sprague-Dawley rats: effect of age and diet
in: Superfund Basic Research Conference, Chapel Hill, NC, February (1997)
zitiert in: Stacpoole et al. (1998 a)
- Yang, H.M., Houser, W.H., Davis, M.E.
Dichloroacetic acid treatment increases hepatic CYP2E1 in male and female rats
Toxicol. Appl. Pharmacol., 141, 382 - 388 (1996)
- Yount, E.A., Felten, S.Y., O'Connor, B.L., Peterson, R.G., Powell, R.S., Yum, M.N., Harris, R.A.
Comparison of the metabolic and toxic effects of 2-chloropropionate and dichloroacetate
J. Pharmacol. Exp. Ther., 222 (2), 501 - 508 (1982)
- Zeman, J., Houstková, H., Dudková, Z., Stratilová, L., Hansíková, H., Konrádová, V., Kmoč, S., Houstek, J.
Sodium dichloroacetate treatment of children with mitochondrial encephalomyopathies
Med. Sci. Monit., 4, 436 - 442 (1998)
- Zhou, Y.C., Waxman, D.J.
Activation and peroxisome proliferator-activated receptors by chlorinated hydrocarbons and endogenous steroids
Environ. Health Perspect., 106, Suppl. 4, 983 - 988 (1998)