

Entwicklung eines PbTk-Modells für Wirbeltiere

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Wolfgang Larisch
geb. am 02.02.1985 in Gera

Gutachter

1: Prof. Dr. Kai-Uwe Goss - Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2: Prof. Dr. Sabine Attinger - Universität Potsdam

Eingereicht am 21.05.2018
Verteidigt am 11.01.2019

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Wolfgang LARISCH, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit, „Entwicklung eines PbTk-Modells für Wirbeltiere “ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Weiterhin erkläre ich:

- Diese Arbeit wurde vollständig oder hauptsächlich während meiner Kandidatur für die Erlangung eines akademischen Grades an dieser Universität durchgeführt.
- Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht.
- Wo ich von der Arbeit anderer zitiert habe, ist die Quelle immer gegeben. Mit Ausnahme solcher Zitate ist dieses Werk ausschließlich meine eigene Arbeit.
- In Bereichen, die auf gemeinsamen Arbeiten mit anderen basieren, habe ich genau dargelegt, was von anderen getan wurde und was ich selbst beigetragen habe.
- Das die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war und das ich mich mit dem Thema der Dissertation an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Unterschrift:

Datum:

„Die Freiheit des Menschen liegt nicht darin, dass er tun kann, was er will, sondern, dass er nicht tun muss, was er nicht will“

Jean-Jacques Rousseau

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Zusammenfassung

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie, Physik und Mathematik

Doktor der Naturwissenschaften

Entwicklung eines PbTk-Modells für Wirbeltiere

von Wolfgang LARISCH

In dieser Arbeit wird ein neu entwickeltes Modell zur Beschreibung von Aufnahme, Verteilung, Metabolisation und Elimination (ADME) von ungeladenen Substanzen in Wirbeltieren vorgestellt. Dabei ist die Besonderheiten dieses Modells eine physikalisch und chemisch korrekte Beschreibung der einzelnen ADME Prozesse. Dies steht im Kontrast zu der Verwendung der meisten alternativen Modelle, da diese ihren Fokus vor allem auf die möglichst einfache, schnelle und korrekte vorhersage von Konzentrationen legen (interne Konzentrationen sowie Gesamtkonzentrationen) und nicht auf eine detaillierte Prozessbeschreibung.

Daher wurden verschiedene Anforderungen an die Entwicklung gestellt: So sollten alle Prozesse mechanistisch so genau wie möglich abgebildet und voneinander separiert beschrieben sein. Die notwendigen Parameter für die Physiologie und Substanzeigenschaften sollen separat voneinander definiert oder eingelesen werden können. Verschiedene Parameter sollen sich auch während der Simulation verändern können und der Programmcode muss so strukturiert sein, dass nachfolgende Entwicklungen eingearbeitet und bestehende Prozesse dabei nicht beeinflusst werden. Die zugrunde liegende Modellstruktur muss sich an dem aktuellen Wissensstand im Bereich der toxikokinetischen Modellierung orientieren und die Qualität sowie die Genauigkeit der Ergebnisse muss mit denen der aktuellen, verfügbaren Modelle vergleichbar sein.

Dies ergibt ein überaus komplexes Modell, mit einer Vielzahl an Parametern. Ist solch eine hohe Komplexität nicht erforderlich oder soll ein einfacheres Modell in gesicherten Randbedingungen auf Richtigkeit geprüft werden, kann ein im Ansatz komplexeres Modell, wie dieses, heruntergebrochen werden. Ein simpleres Modell jedoch an ein komplexeres Problem anzupassen gestaltet sich im Allgemeinen schwieriger. Diese Komplexität und Variabilität wird jedoch mit einem erhöhten Programmieraufwand und einer längeren Rechenzeit erkauft.

Eine erste Validierung dieses Modells und seiner enthaltenen Prozessbeschreibungen für die Aufnahme in Fischen via Kiemen (über kontaminiertes Wasser) und Magen-Darm-Trakt (über kontaminierte Nahrung) wurde erfolgreich durchgeführt. Dabei wurden bereits erste Erkenntnisse zu verschiedenen Prozessen gewonnen und diese dargestellt. So konnte unter anderem eine genaue mechanistische Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Aufnahmeeffizienz erstellt werden. Auch die Auswirkung des zeitlichen Verlaufs der Verdauung und allem voran das Vorhandensein eines Mizellen-Bildners im Magen-Darm-Trakt mit ihren Auswirkungen auf eine etwaige Aufnahme werden diskutiert.

Die parallel zu dieser Arbeit verlaufende Forschung zur Verteilung und Permeation von ionischen Substanzen, der *in vitro* - *in vivo* Extrapolation für Metabolismusraten sowie dem aktiven Transport wurde in der Entwicklung berücksichtigt, wenn auch noch nicht validiert. In diesem Zusammenhang ermöglicht die Übertragbarkeit des Modells auf andere Spezies für die Zukunft ein breites Anwendungs- und Forschungsspektrum.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Kai-Uwe Goss, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Gruppe zu schreiben. Ich bedanke mich für die exzellente Betreuung, Diskussionen und die Unterstützung, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben und meinen Wissenstand erheblich erweiterten.

Ich möchte mich bei all meinen Kollegen bedanken, denjenigen die über die Jahre hinzukamen und denjenigen die weiterzogen. Dazu gehören: Andrea Pfennigsdorff, Satoshi Endo, Trevor Brown, Kai Bittermann, Lukas Linden, Luise Henneberger, Nadine Ulrich, Sophia Krause, Flora Allendorf, Adrea Ebert und Estella Garessus. Vielen Dank für eure Unterstützung, Anleitungen, Meinungen und Anregungen. Ihr habt mir die Arbeit angenehm gemacht und für ein hervorsagendes Miteinander gesorgt.

Am Ende bedanke ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden, die mit jeder Menge Geduld und moralischem Beistand einen nicht zu unterschätzenden Anteil am Erfolg dieser Arbeit hatten.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	iii
Zusammenfassung	vii
Danksagung	ix
1 Motivation	1
2 Vorbetrachtungen	5
2.1 Diffusion und Permeation	5
2.1.1 Brownsche Molekularbewegung	5
2.1.2 Einstein - Smoluchowski - Stokes	5
2.1.3 Fick'sche Gesetze und Permeabilität	6
2.2 Verteilung und Verteilungskoeffizienten	7
2.2.1 Verteilungskoeffizient	7
2.2.2 Multi-Phasen-System	8
2.2.3 pp-LFER Parameter	9
2.3 Vier gekoppelte Kompartimente	10
2.3.1 Aufkommen und Verwendung von vier gekoppelten Kompartimenten	11
2.3.2 Skizze des Lösungswegs	13
2.3.3 Validierung der Gleichungen	16
3 Modell und Validierung	17
3.1 Aufbau des Modells	17
3.1.1 PbTk - Struktur	18
3.1.2 Gastro-Intestinal-Trakt	19
3.1.3 Organ Struktur	20
3.1.4 Austausch zwischen Kompartimenten	21
3.1.5 Träger gebundener Transport	22
3.1.6 Adsorptions- und Desorptionskinetik	24
3.1.7 Berechnungsschleife	24
3.2 Modell Validierung	26
3.2.1 Aufnahme über die Kiemen	27
3.2.2 Aufnahme über den GIT	29
3.3 Programmoberfläche	35
3.3.1 PbTk Main UI	35
3.3.2 Chemical UI	37
3.3.3 Physiology UI	38
3.3.4 Organ UI	39
3.3.5 Blood Distribution UI	42
3.3.6 Wasser UI	43
3.3.7 Nahrungs UI	44

3.3.8	Permeability Tool	45
3.3.9	Progress Bar	46
3.3.10	Data UI	46
3.3.11	ASCII Files	47
3.4	Performance und Code Optimierung	49
4	Diskussion	53
4.1	Wichtige Parameter und Sensitivität	53
4.1.1	Verteilungskoeffizienten	53
4.1.2	Gewebezusammensetzung	55
4.1.3	Ventilation	55
4.1.4	Verdauung	56
4.2	Erkenntnisse aus den bisherigen Simulationen	60
4.2.1	Zeitabhängigkeit der Aufnahmeeffizienz	60
4.2.2	Aufnahme superhydrophober Substanzen – Mizellen gebundener Transport	61
4.3	Vergleich mit anderen Modellen	62
5	Ausblick	65
A	Frequently Asked Questions	67
A.1	Wo finde ich den Quellcode?	67
A.2	Wie kann das Modell ausgeführt werden?	67
A.3	Beim ausführen ertönt nur ein Signalton?	67
B	Curriculum Vitae	69
	Literatur	73

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung des Konzentrationsgradienten in einem Drei-Phasen-System (nach Baker, 1987).	6
2.2	3 Phasen System und Verteilungskoeffizienten.	8
2.3	Der Austausch von Luft zu Blut geschieht durch Diffusion durch das Lungengewebe. Dies lässt sich durch ein Zwei-Kompartiment - Problem beschreiben (Kompartiment A: Luft; Kompartiment B: Blut). Die Diffusion ist dabei symmetrisch in beide Richtungen und nur vom Konzentrationsgradienten abhängig.	11
2.4	Der Austausch von Luft zu Blut geschieht zuerst durch Diffusion in die Lunge und von dort weiter ins Blut. Die Lungen-Zellen-Membranen an den 'Rändern' nehmen hierbei die Rolle der Diffusionsbarrieren ein.	11
2.5	Innerhalb der/des einzelnen Organe/Bluts findet ebenfalls Diffusion zwischen festen und wässrigen Phasen statt. Somit wird es nötig vier verschiedene Kompartimente zu betrachten.	12
2.6	Durch aktiven Transport durch die Zell-Membran in nur eine Richtung erfolgt eine Symmetriebrechung zwischen Kompartiment zwei und Kompartiment drei.	12
2.7	Reversible Folge Kinetiken zwischen vier Kompartimenten (A, B, C, D) mit acht verschiedenen Konstanten (nach Larisch und Goss, 2017).	12
2.8	Reversible Folge-Kinetik zwischen vier Kompartimenten (A, B, C, D) mit vier verschiedenen Konstanten.	14
2.9	Grafik der Ergebnisse des Matlab-ODE45-Aglorithmus mit entsprechenden Anfangsbedingungen.	16
2.10	Grafik der Ergebnisse des ExcelAglorithmus mit entsprechenden Anfangsbedingungen.	16
3.1	Schematische Darstellung der abgebildeten Organe im Modell (nach Larisch, Brown und Goss, 2017). Auf der Abbildung fehlen aus Übersichtsgründen einige inneren Organe (Gonaden, Milz und Knochen). Die Pfeile deuten die Blutflussrichtung an.	18
3.2	: Detaillierte Struktur des Magen Darm Traktes im Zusammenspiel mit der Leber und der Galle (nach Larisch und Goss, 2018a).	20
3.3	Schematik eines Organs (generalliesiert, nach Larisch, Brown und Goss, 2017). Es gibt zwei verschiedenen Kompartimente: den Organ-Blut-Pool und das Organ-Gewebe. Jedes Kompartiment beinhaltet fünf verschiedene Sorptionsphasen (siehe Legende). Der Blutfluss des arteriellen Blut-Systems beeinflusst zunächst nur das Blut im Blut-Pool. Zwischen beiden Kompartimenten finden alle Austauschprozesse über die Endothel-Zellen hinweg statt.	21
3.4	Die Gesamt Permeabilität über die Endothel Zellen ergibt sich aus der reziproken Addition aller Einzel-Permeabilitäten (nach Larisch, Brown und Goss, 2017).	22

3.5	Bei der Permeation einer hydrophoben Substanz von der Nahrung über den Darm ins Blut kann an zwei Stellen ein zusätzlicher Transportprozess parallel zur Diffusion die gesamte Permeation beschleunigen: beim Überqueren der darm-seitigen ABL durch Gallen-Mizellen und beim Überqueren der blut-seitigen ABL durch das Blutprotein Albumin (nach Larisch und Goss, 2018a).	23
3.6	Drei-Kompartiment-Prozess - Permeation zwischen Kompartiment eins und zwei und Ad/Desorption zwischen Kompartiment zwei und drei (nach Larisch, Brown und Goss, 2017).	24
3.7	Schema der Berechnungs-Schleifen für eine Iteration (nach Larisch, Brown und Goss, 2017).	25
3.8	Aufnahmeeffizienz über $\log K_{OW}$ (nach Larisch, Brown und Goss, 2017). Blau: McKim et al. Grün: Simulationsergebnisse.	28
3.9	Zeitabhängigkeit der Aufnahmeeffizienz für vier verschiedene Substanzen (nach Larisch, Brown und Goss, 2017).	28
3.10	Werte aus Adolfsson-Erici et al. 2012 im Vergleich mit den Simulationen des Modells (nach Larisch, Brown und Goss, 2017). Oben: Pentachlorobenzen (PCB), Unten: Hexachlorobenzen (HCB)	30
3.11	Simulation des Experiments nach Adoflson-Errici et al. Vergleich des Konzentrationsverlaufs mit und ohne Wachstum (Larisch, Brown und Goss, 2017).	30
3.12	Plot des Beschleunigungsfaktors über die Löslichkeit.	31
3.13	Verbesserter Fit für spätere Extrapolation.	32
3.14	Plot der Löslichkeit über die Anzahl in der Substanz enthaltener Kohlenstoffatome (nach SI - Larisch und Goss, 2018a).	32
3.15	Nahrungsvolumen über die Zeit in den drei Darm-Abschnitten des Modelles. Blau: Darm-Abschnitt eins , Rot: Darm-Abschnitt zwei und Grün: Darm-Abschnitt drei.	33
3.16	Konzentrationen in verschiedenen Organen (nach Larisch und Goss, 2018a). Punkte: Daten aus Nichols et al. 2004 (Nichols u. a., 2004b), Linien : Simulationsdaten.	34
3.17	HCB in Regenbogenforellen, gemessen in drei Verschieden Laboren (nach Larisch und Goss, 2018a).	35
3.18	Darstellung der Benutzeroberfläche des PbTk Main UI.	36
3.19	Darstellung der Benutzeroberfläche des Chemical UI.	37
3.20	Darstellung der Benutzeroberfläche des Physiology UI.	38
3.21	Darstellung der Benutzeroberfläche des Organ UI.	40
3.22	Panel ‚Growing‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.	40
3.23	Panel ‚Blood-Organ‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.	41
3.24	Panel ‚Metabolsim‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.	41
3.25	Panel ‚Excretion‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.	41
3.26	Panel ‚Injection‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.	42
3.27	Darstellung der speziellen Benutzeroberfläche des GIT.	42
3.28	Darstellung der Benutzeroberfläche des Blood Distribution UI.	43
3.29	Darstellung der Benutzeroberfläche des Wasser UI.	43
3.30	Darstellung der Benutzeroberfläche des Nahrungs UI.	44
3.31	Darstellung der Benutzeroberfläche des Permeability Tools.	45
3.32	Fortschrittsbalken der Simulation. Wird dieses Fenster während einer laufenden Rechnung geschlossen wird das Programm beendet.	46
3.33	Darstellung der Benutzeroberfläche des Data UI.	47

3.34	Gesamtüberblick des Matlab Profiler. Gesamt verwendete Zeit pro Funktion und die Eigenzeit werden dargestellt und lassen sich vergleichen. Dieses Beispiel zeigt eine Simulation für 30 virtuelle Minuten bevor der Programcode verbessert wurde.	50
3.35	Matlab-Profiler in der Funktionen-Darstellung. Sehr Zeitintensive Zeilen werden automatisch Rot dargestellt.	50
4.1	Grafik ist identisch mit 3.16. Hier soll auf den Konzentrationsunterschied (speziell die Konzentrations-Überschätzung) im Simulationsverlauf zwischen Blut und Muskeln hingewiesen werden.	54
4.2	Nichols et al. (Nichols et al. 1990). (A) Fat-tissue concentration, and (B) arterialblood concentration.	56
4.3	Einfluss der Ventilationsrate auf die Aufnahme bei einer Exposition über die Kiemen.	57
4.4	Aufnahme von Hexachlorobenzene über die Nahrung. Aufgetragen sind die Wasserphasen-Konzentrationen in den drei Darm-Abschnitten (jeweils mit I, II oder III gekennzeichnet) für die Nahrung (oben), das Darm-Gewebe (mitte) und das Blut innerhalb des Darms sowie des gesamten venösen Blutes (unten).	57
4.5	Simulationen mit Verdauung mit 96% Verdauungseffizienz und 80% Verdauungseffizienz. Die Aufenthaltszeit der Nahrung im Darm betrug jeweils 24 h.	58
4.6	Nahrungs-Menge über die Zeit in den 3 Darmabschnitten des Modells. Blau : Darmabschnitt I , Rot : Darmabschnitt II und Grün : Darmabschnitt III.	59
4.7	Wasserphasenkonzentrationen in Nahrung, Darmgewebe und Darmblut für die drei Darmabschnitte: Blau - Darmabschnitt I , Rot - Darmabschnitt II und Grün - Darmabschnitt III.	59
4.8	Aufnahmeeffizienz über die Zeit mit Daten aus den Veröffentlichungen Nichols et al.(Nichols u. a., 1990).	60
4.9	Gemessene Aufnahmeeffizienz nach einer Stunde für verschiedene Substanzen über einen breiten log K_{OW} Bereich. Der Verlauf der Daten suggeriert eine (falsche -) Abhängigkeit vom log K_{OW} (eingezeichnete Line).	61
4.10	Logarithmische Darstellung der Gesamtkonzentrationen der einzelnen Substanzen im jeweiligen Fisch. Die Punkte stellen die gemessenen Werte dar. Die durchgezogenen Linien sind die Simulationsergebnisse.	62

*Diese Arbeit widme ich meinem Großvater, Dietrich Schille,
der wie kein anderer meinen Weg im Leben geprägt hat.*

Kapitel 1

Motivation

In Pharmakologie und Toxikologie haben sich computerbasierte Modelle zu einem wichtigen Hilfsmittel für die erfolgreiche Quantifizierung und Extrapolation der Toxikokinetik in Organismen entwickelt (Barton, Kaiser und Russell, 2007; Jager u. a., 2011). Computermodelle bieten nicht nur eine zeit- und kosteneffiziente Simulation der chemischen Absorption, Distribution, Metabolisation und Elimination im zeitlichen Verlauf (ADME), sondern bringen zusätzlich ethische Vorteile durch die Reduktion und Optimierung von Tierversuchen (Stadnicka, Schirmer und Ashauer, 2012).

Allgemein können dabei zwei toxikokinetische Modellgruppen unterschieden werden: das Ein-Kompartiment-Modell, welches eine homogene Verteilung einer Chemikalie im Lebewesen annimmt und das Multi-Kompartiment-Modell, in welchem die Akkumulation in spezifischen Organen und Geweben berücksichtigt wird (Stadnicka, Schirmer und Ashauer, 2012). Während Ein-Kompartiment-Modelle meist auf simpler Kurvenanpassung basieren, ist das Multi-Kompartiment-Modell wesentlich detaillierter und komplexer. Es beschreibt einen Organismus unter Verwendung von mehreren anatomischen, physiologischen und biochemischen Komponenten (*engl.: Physiologically based Toxicokinetic - PbTk*) in denen Organe und Gewebe als individuelle Kompartimente abgegrenzt sind (Bertelsen u. a., 1998; Nichols u. a., 1990). Diese Art von Modellen wird für anspruchsvollere Aufgaben benötigt, wie zB. die *in vitro* - *in vivo* Extrapolation bei der intrinsische Parameter zum Abbau oder zur Toxikodynamik von Chemikalien auf einen Gesamtorganismus extrapoliert werden müssen. Insbesondere, wenn die genauen toxikokinetischen Prozesse in einem Organismus analysiert werden sollen, sind komplexere Modelle unerlässlich (Bessemis u. a., 2014). Da spezies- und entwicklungspezifische Parameter zusammen mit physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanz in die Modellstruktur eingefügt werden, ermöglicht ein solches PbTk-Modell zudem die Extrapolation auf verschiedene Spezies und Expositionsszenarien (Hayton und Barron, 1990; Bertelsen u. a., 1998; Schmitt, 2008).

Für zukünftige Forschungsthemen, wie ionische Substanzen und deren Verteilungsverhalten, die *in vitro* - *in vivo* Extrapolation von Metabolismusraten oder eine differenzierte Betrachtung von aktiven Transportmechanismen sind detaillierte PbTk-Modelle mit einer möglichst genauen, mechanistischen Beschreibung aller Prozesse notwendig. Nur so können die Einflüsse der verschiedenen Prozesse aufeinander abgeschätzt und somit sichergestellt werden, dass neue Prozesse korrekt und unabhängig beschrieben sind.

Die meisten bestehenden Modelle, sowohl für Menschen als auch Tiere, sind leider weit weg von einem korrekten physikalisch-chemischen Verständnis. Das viel genutzte Modell von Nichols (für Fische) verwendet zB. einen $\log K_{OW}$ Ansatz, um die Verteilung in das Gewebe über den Lipid-Anteil zu beschreiben (Nichols

u. a., 1993). Mittels reiner Lipid-Verteilung können jedoch nur unpolare Substanzen korrekt erfasst werden und alle polaren bleiben außen vor (Endo, Brown und Goss, 2013). Andere Modelle, wie das für den Menschen entwickelte PkSim[®], benutzen zwar mehrere sorptive Phasen, die Verteilungskoeffizienten für diese Phasen werden jedoch nur aus gefitteten Beziehungen des logarithmischen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{OW}$) berechnet und enthalten somit eine hohe Ungenauigkeit (Endo, Brown und Goss, 2013). Bei vielen bekannten Modellen werden zudem verschiedene gemischte Parameter benutzt. Dies kann zu Fehlern führen, da sowohl bei der Abschätzung bzw. dem notwendigen Fit eines solchen Parameters, als auch der Extrapolation zu anderen Szenarien, die eigentlichen Prozesszusammenhänge nicht abgebildet werden. Betrachtet man zB. die Aufnahmeeffizienz einer Substanz über die Kiemen eines Fisches, so beinhaltet diese sowohl die physiologischen Eigenschaften wie Kiemengröße, Oberfläche und Membrandicke, als auch die Eigenschaften der Substanz wie Diffusions- und Verteilungskoeffizienten. Das ein einzelner Parameter dieses komplexe Zusammenspiel abbilden kann, ist schwer vorstellbar. Ihn auf andere Szenarien zu extrapolieren, ohne die Zusammenhänge zu kennen, muss zwangsläufig zu Fehlern führen. Hinzu kommt, dass solche gemischten (*engl.: Lumped*) Parameter im Nachhinein nicht mehr aufgetrennt und somit einzelne, enthaltene Prozesse nicht mehr separat betrachtet werden können (Larisch und Goss, 2017; Brown u. a., 1997). Der aktive Transport als nahezu eigenständiges Forschungsthema wird in aktuellen Modellen wie PkSim[®] leider falsch abgebildet oder kann, wie in den Nichols-Modellen und deren Derivaten, gar nicht abgebildet werden.

Da keines der bestehenden Modelle dem notwendigen Anspruch an Genauigkeit, physiologischen Detail und Prozess Abbildung genügt, wurde die Entwicklung eines eigenständigen PbTk-Modells für notwendig erachtet. Dabei wurde auf verschiedene Eigenschaften des Modells besonderen Wert gelegt. So sollen alle Prozesse explizit getrennt und physikalisch so genau wie möglich abgebildet werden. Auf gemischte oder gefittete Parameter soll, wenn möglich, vollständig verzichtet werden. Die Verteilung in mehrere verschiedene Sorptions-Phasen soll möglichst genau, d.h. mit einem guten Vorhersage-Modell beschrieben werden. Dazu wird das pp-LFER-Modell Verwendung finden, da es wesentlich bessere Vorhersagen der Verteilungskoeffizienten abliefern als $\log K_{OW}$ basierte Modelle (Endo, Brown und Goss, 2013). Die gesamte Modell-Struktur soll variabel angelegt sein, um möglichst viele Szenarien abbilden zu können. So sollen einzelne Organe ab- und zu- schaltbar sowie der Detailgrad der einzelnen Organe variable sein, um es an spezielle Probleme anpassen zu können. Durch eine Trennung der Eingabe von physikalisch-chemischen und biologisch-physiologischen Parametern ist es möglich Substanzen oder Spezies zu wechseln, ohne dass das Modell an sich angepasst werden muss. Notwendige Parameter, die Informationen von beidem (chemisch und biologisch) benötigen, werden intern berechnet. So zum Beispiel die Permeabilität von Membranen, die sich aus der Dicke und Zusammensetzung auf der biologischen und der Diffusivität (wiedergegeben durch den Diffusionskoeffizienten) auf der chemischen Seite berechnet. Mit einem solchen Modell lassen sich daher gezielte Prozessanalysen bewerkstelligen.

Dies ergibt ein überaus komplexes Modell, welches zudem eine Vielzahl an Parametern benötigt, die mitunter nur schwer experimentell bestimmt werden können (Clark, Gobas und Mackay, 1990). Ein im Ansatz so komplexes Modell kann jedoch heruntergebrochen werden, wenn eine hohe Komplexität nicht erforderlich ist oder ein simples Modell in gesicherten Randbedingungen auf Richtigkeit geprüft werden soll.

Die gewünschte Variabilität der einzelnen Parameter (verschiedene Eigenschaften sollen sich auch während einer Simulation noch ändern können) sowie die Möglichkeit auch komplexe Expositionsszenarien abbilden zu können, erfordern dabei eine explizit numerische Umsetzung. Nur so können Parameter (und damit verbunden auch die Exposition) jederzeit beliebig verändert werden, ohne die Modellstruktur anpassen zu müssen. Dies sorgt jedoch für einen erhöhten Programmier- und Rechenaufwand und damit verbunden längere Simulationszeiten als es bei vergleichbaren, rein auf Differentialgleichungen basierenden Modellen der Fall wäre. Dieser Umstand ist jedoch akzeptabel wenn bedacht wird, da es sich in dem hier vorgestellten Modell um ein wissenschaftliches Werkzeug zum besseren Verständnis der einzelnen ADME Prozesse handelt.

Kapitel 2

Vorbetrachtungen

Die in diesem Abschnitt behandelten Prozesse der Diffusion von Molekülen und ihrer Verteilung in verschiedene Medien (Phasen) sind die grundlegenden Mechanismen des in dieser Arbeit vorgestellten Modells. Die Berechnung der Permeation über mehrere Barrieren hinweg sowie die Verteilung zwischen mehreren sorbierenden Phasen sind besondere Merkmale dieses Modells und werden daher im Detail erklärt. Auf etwaige Vorkenntnisse aus Physik und Chemie (wie bspw. der Boltzmann-Verteilung, Definition von Temperatur bzw. Wärme) wird hierbei nicht eingegangen.

2.1 Diffusion und Permeation

2.1.1 Brownsche Molekularbewegung

Betrachten wir die zufällige, thermische Bewegung von Gasmolekülen (Brownsche Molekularbewegung) als ein mechanisches Modell, indem jedes Molekül als einfache Kugel abgebildet wird. Nun lässt sich jeder Kugel eine Temperatur und damit eine mittlere kinetische Energie zuordnen: $\langle E_{Kin} \rangle = \frac{1}{2} \langle \nu^2 \rangle = \frac{1}{2} \langle \nu_x^2 + \nu_y^2 + \nu_z^2 \rangle$

Jede Geschwindigkeitskomponente ($\nu_x^2, \nu_y^2, \nu_z^2$) trägt dabei genau $\frac{k_B T}{2}$ zur mittleren kinetischen Energie bei (Gerthsen, 1966). Hierbei bezeichnet k_B die Boltzmann-Konstante mit $k_B = 1.381 \cdot 10^{-23}$ J/K. Somit ergibt sich insgesamt: $\frac{m}{2} \nu^2 = 3 \frac{k_B T}{2}$. Daraus lässt sich nun durch einfaches Umstellen die mittlere thermische Geschwindigkeit ν_{th} berechnen: $\nu_{th} = \sqrt{\langle \nu^2 \rangle} = \sqrt{3 \frac{k_B T}{m}}$. Man erkennt daran, dass die Bewegungsgeschwindigkeit eines Moleküls mit steigender Temperatur zu-, jedoch mit zunehmender Masse abnimmt. Befinden sich nun einzelne Partikel in einem Medium, werden diese zufällig durch die thermische Bewegung der Moleküle des Mediums angestoßen. Die durch diese Bewegung zustande kommende Lageänderung wird Diffusion genannt.

2.1.2 Einstein - Smoluchowski - Stokes

Einstein erkannte, dass die grundlegende Größe bei der Diffusion (bzw. dem random walk) der Teilchen nicht die mittlere thermische Geschwindigkeit, sondern der Mittelwert des Quadrats der Teilchenverschiebung $\langle \chi(t)^2 \rangle$ nach gegebener Zeit t ist. Er leitete (parallel zu Marian Smoluchowski) die Einstein-Smoluchowski-Beziehung her: $\langle \chi(t)^2 \rangle = 2D * t$. Die Proportionalitätskonstante D ist der Diffusionskoeffizient. Für in Lösung suspendierte Teilchen hat Einstein einen weiteren Ausdruck für den Diffusionskoeffizienten hergeleitet, der als Einstein-Stokes-Gleichung bezeichnet wird: $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$. Diese Beziehung kann man sich so veranschaulichen: Bei einem

(sphärischen) Teilchen (mit Radius r) in Lösung treibt die thermische Energie ($k_B \cdot T$) das Teilchen vorwärts, während es durch die Stokes-Reibung mit dem Lösemittel (Viskosität η) abgebremst wird.

Die effektiv auftretende Diffusion wird bestimmt durch das Verhältnis der Beiträge der Diffusion in alle Raumrichtungen. Da an einen Ort mit höherer Molekülanzahl pro Volumen mehr Moleküle an der Diffusion beteiligt sind, als an einem Ort mit geringeren Molekülanzahl, wird zwangsläufig die effektive Diffusion vom Ort der hohen Konzentration zum Ort der niedrigen Konzentration gerichtet sein (Peter W. Atkins und Paula, 2013). Diese gerichtete Diffusion wird unter anderem in den Fick'schen Gesetzen benutzt, auf die nun im Folgenden eingegangen wird.

2.1.3 Fick'sche Gesetze und Permeabilität

Um die diffusive Permeation eines Moleküls durch eine Membran zu beschreiben, betrachten wir ein Drei-Phasen-System aus einem gut durchmischten Donatormedium, der Membran und einem gut durchmischten Akzeptormedium. Für eine erste Vereinfachung dieser Betrachtung nehmen wir an, dass die Diffusionsgrenzschichten vernachlässigt werden können und keinen signifikanten Widerstand darstellen. Dass dies in der Realität nicht der Fall ist und welche Auswirkungen die Grenzschichten haben, wird in einem späteren Abschnitt diskutiert.

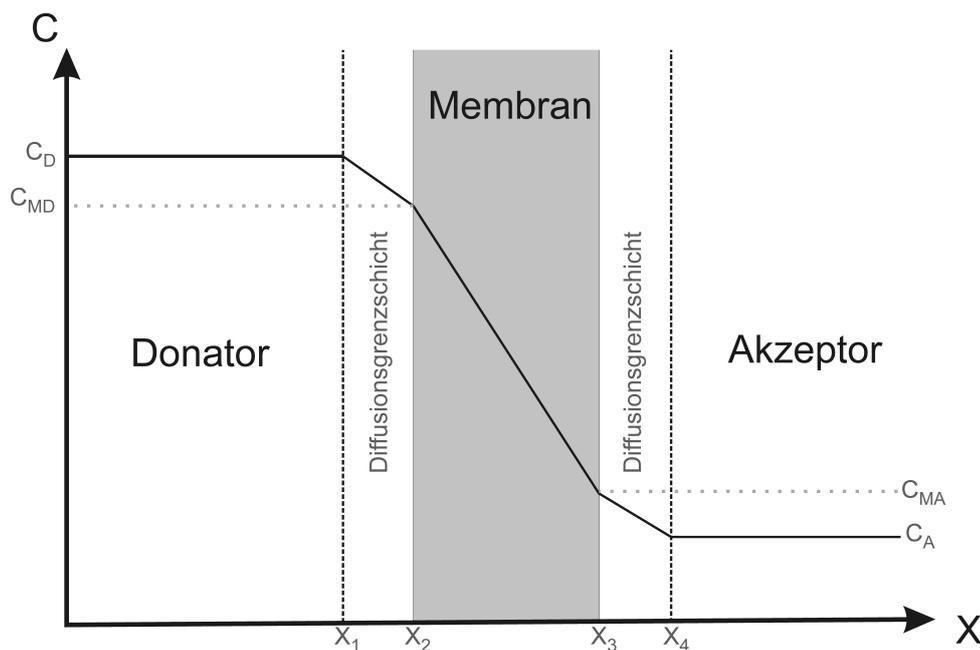


ABBILDUNG 2.1: Schematische Darstellung des Konzentrationsgradienten in einem Drei-Phasen-System (nach Baker, 1987).

Für die gerichtete Diffusion (siehe Abschnitt Diffusion) im stationären Zustand gilt das erste Fick'sche Gesetz: $J = \frac{\partial M}{\partial t} \cdot A = -D \frac{\partial c}{\partial x}$. Hierbei ist J der Massenfluss pro Zeit [$g/cm^2 \cdot s$], dM die Änderung der Masse [g] der betrachteten Moleküle, A die Diffusionsfläche und dc/dx der Konzentrationsgradient entlang der Membrandicke. Für das Drei-Phasen-System bzw. für den Massenfluss durch die Membran nimmt das erste Fick'sche Gesetz folgende Gestalt an: $J = \frac{\partial m_A}{\partial t} \cdot A = D \cdot \frac{C_{MD} - C_{MA}}{h}$.

Hier ist dm_A die Änderung der Masse im Akzeptor-Kompartiment, C_{MD} die Konzentration in der Membran an der Donator/Membran-Grenze [g/cm^3], C_{MA} die Konzentration in der Membran an der Akzeptor/Membran-Grenze [g/cm^3] und h die Membrandicke [cm]. In der Abbildung 2.1 ist die Membrandicke durch $h = x_3 - x_2$ dargestellt.

Die Konzentrationen an den Grenzflächen können wie folgt ausgedrückt werden:

$$c_{MD} = K_{MD} * C_A$$

$$c_{MA} = K_{MA} * C_A$$

Die Verteilungskoeffizienten K_{MA} und K_{MD} beschreiben die Gleichgewichtsverteilung zwischen Membran und Akzeptormedium bzw. Membran und Donormedium. Eine genaue Beschreibung der Verteilungskoeffizienten finden Sie im Abschnitt Verteilungskoeffizienten. Befindet sich im Donor- und im Akzeptorkompartiment das gleiche Medium oder verwendet man das gleiche Bezugssystem (bzw. Referenzphase wie bspw. Wasser), so sind die Verteilungskoeffizienten K_{MA} und K_{MD} identisch und man kann mittels des Zusammenhangs $(C_{MD} - C_{MA}) = K * (C_D - C_A)$ die obige Gleichung umformen zu: $J = \frac{D * K}{h} * (C_D - C_A)$. Hier kann nun $P = \frac{D * K}{h}$, die Permeabilität [cm/sek], abgeleitet werden. Mittels dieser Permeabilität, die von dem Konzentrationsgradienten unabhängig ist, kann nun der Massenfluss bzw. als reziprok der Widerstand $R = 1/P$ einer Membran oder einer beliebigen Schicht berechnet werden.

2.2 Verteilung und Verteilungskoeffizienten

Die Verteilung einer Substanz in verschiedene sorbierende Phasen hängt von den physikalisch-chemischen Eigenschaften sowohl der Substanz als auch der betrachteten Phasen ab. Auch Wasser bzw. Lösemittel werden hier als sorbierende Phasen bezeichnet. Der Begriff Medium ist hiervon zu unterscheiden, da ein Medium mehrere Phasen beinhalten kann. Bspw. wird Blut im Folgenden als Medium bezeichnet, wohingegen das Blut-Albumin oder die Blut-Lipide als sorbierende Phasen benannt sind.

Eine Vorhersage mittels Modelle oder Messung dieser Verteilung kann je nach Komplexität und Beschaffenheit der betrachteten Substanz und Phasen sehr aufwändig sein (Poole u. a., 2009). Vor allem ionische Substanzen stellen hier eine besondere Schwierigkeit sowohl in Messung als auch Vorhersage dar und sind derzeit noch Bestand der aktuellen Forschung. Da ionische Substanzen in dieser Arbeit keine wesentliche Rolle spielen, werden im Folgenden nur neutrale bzw. ungeladene Substanzen betrachtet.

2.2.1 Verteilungskoeffizient

Der Verteilungskoeffizient einer Substanz $K_{i,j}$ zwischen zwei verschiedenen Phasen i und j beschreibt das Verteilungsgleichgewicht, dh. das Verhältnis der Stoffmengen M_i (bzw. Konzentrationen $C_i = M_i/V_i$) im thermodynamischen Gleichgewicht: $K_{i,j} = C_i/C_j = (M_i * V_j)/(V_i * M_j)$. Dies bedeutet nicht, dass kein Austausch mehr stattfindet. Stattdessen ist ein Zustand erreicht, in dem genauso viel Substanz aus

Phase i zu Phase j diffundiert wie umgekehrt. Dabei wird sich die Substanz vermehrt in der Phase aufhalten in der es für sie energetisch günstiger ist, da die aufzubringende Energie, um sie in die ungeeignere Phase zu verschieben, höher ist.

2.2.2 Multi-Phasen-System

Was für die Verteilung zwischen zwei Phasen gilt, muss auch für die Verteilung zwischen mehreren Phasen gelten. Betrachten wir zunächst drei verschiedene Phase, die an die jeweils beiden anderen Phasen angrenzen (Abbildung 2.2). Das Verteilungsverhalten zwischen jeweils zwei Phasen können wir wieder mit dem entsprechenden Verteilungskoeffizienten beschreiben.

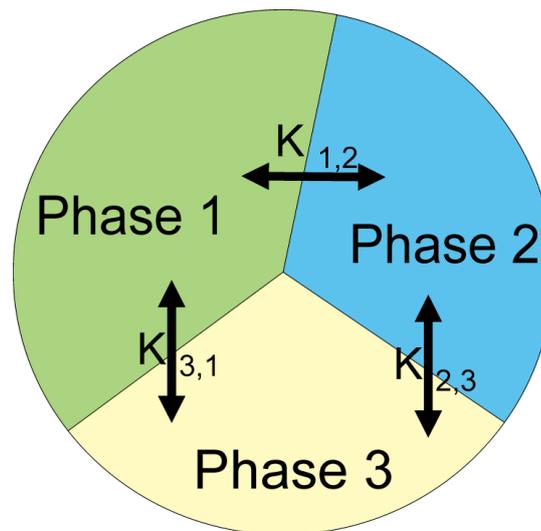


ABBILDUNG 2.2: 3 Phasen System und Verteilungskoeffizienten.

Ist das gesamte System im Gleichgewicht, so müssen die daraus resultierenden Verteilungskoeffizienten ein stabiles System abbilden ($C_1 = K_{1,2} * C_2$; $C_2 = K_{2,3} * C_3$; $C_3 = K_{3,1} * C_1$). Daraus lässt sich ableiten, dass alle drei Koeffizienten ineinander umgerechnet werden können:

$$C_1 = K_{1,2} * C_2 = K_{1,2} (K_{2,3} * C_3) = K_{1,2} (K_{2,3} * (K_{3,1} * C_1))$$

$$\Rightarrow 1 = K_{1,2} * K_{2,3} * K_{3,1} \text{ bzw. } K_{1,2} = \frac{K_{3,2}}{K_{3,1}} \text{ da } K_{i,j} = \frac{1}{K_{j,i}} \text{ gilt.} \quad (2.1)$$

Dies wird auch als Thermodynamisches Dreieck bezeichnet. An dieser Stelle bietet es sich an, alle Verteilungskoeffizienten auf eine gemeinsame Referenz-Phase zu beziehen. In der Literatur sind die meisten verfügbaren Verteilungskoeffizienten für biologische Systeme mittels Verteilung aus Wasser angegeben. Daher wird auch hier und im Folgenden Wasser als Referenz-Phase gewählt.

Nehmen wir nun an, wir haben ein solches Drei-Phasen-System mit bekannten Verteilungskoeffizienten zur Referenz-Phase Wasser ($K_{1,Wasser}$, $K_{2,Wasser}$, $K_{3,Wasser}$) und bekannten Volumina (V_1 , V_2 , V_3). Eine definierte Menge M einer Substanz wird in dieses System gegeben und es interessiert uns, wie sich die Substanz zwischen

den drei Phasen verteilt. Da wir wissen, dass im Gleichgewicht die Konzentrationen durch die Verteilungskoeffizienten beschrieben sind ($C_i = K_{i,Wasser} * C_{Wasser}$) und die Stoffmengen der einzelnen Phasen zusammengenommen der Menge entsprechen muss, die wir zugegeben haben ($M_{Gesamt} = M_1 + M_2 + M_3$), können wir folgende Gleichungen aufstellen:

$$\begin{aligned}
 M_{Gesamt} &= C_1 * V_1 + C_2 * V_2 + C_3 * V_3 \\
 &= (C_{Wasser} * K_{1,Wasser} * V_1) + (C_{Wasser} * K_{2,Wasser} * V_2) + (C_{Wasser} * K_{3,Wasser} * V_3) \\
 &= C_{Wasser} * (K_{1,Wasser} * V_1 + K_{2,Wasser} * V_2 + K_{3,Wasser} * V_3) \\
 \Rightarrow C_{Wasser} &= \frac{M_{Gesamt}}{K_{1,Wasser} * V_1 + K_{2,Wasser} * V_2 + K_{3,Wasser} * V_3} \quad (2.2)
 \end{aligned}$$

Da wir nun die Konzentration unserer Referenz-Phase kennen, können wir einfach mittels der entsprechenden Verteilungskoeffizienten die Konzentrationen und damit Stoffmengen aller beteiligten Phasen berechnen. Dieser Formalismus lässt sich auf beliebig viele Phasen erweitern:

$$\Rightarrow C_{Wasser} = \frac{M_{Gesamt}}{\sum_i K_{i,Wasser} * V_i} \quad (2.3)$$

Diese Gleichung wird im hier vorgestellten Modell benutzt, um bei allen Multi-Phasen Verteilungen (bis zu sechs verschiedenen Phasen) die Wasser-Konzentration zu bestimmen und darüber die jeweilige, benötigte Phasen-Konzentration oder Stoffmenge.

2.2.3 pp-LFER Parameter

Die für diese Berechnungen nötigen Verteilungskoeffizienten sind mitunter nur schwer experimentell zu bestimmen. Insbesondere bei sehr kleinen bzw. sehr großen Verteilungskoeffizienten ist dies auf Grund der enorm kleinen Konzentration in einer der beiden Phasen schwierig und führt zu hohen Ungenauigkeiten (Poole u. a., 2009). Zudem können die in der Literatur vorhandenen Werte teilweise nur schwer auf ihre Qualität überprüft werden oder es liegen mehrere stark abweichende Werte vor (Pontolillo und Eganhouse, 2001). Hinzu kommt, dass die Verteilungen in sehr verschiedene biologische Phasen, wie sie in unserem Modell vorkommen, nur selten von allgemeiner Bedeutung sind und daher oftmals nicht zur Verfügung stehen.

Daher ist es notwendig, die experimentell nicht zur Verfügung stehenden Verteilungskoeffizienten mittels Vorhersagemodellen zu bestimmen. Hier gibt es eine ganze Reihe verschiedener Modelle, angefangen von quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*engl.*: *Quantitative Structure-Activity Relationship* - QSAR) über Vorhersagemodelle, die auf der jeweiligen molekularen Struktur beruhen (Katritzky u. a., 2010; Dearden, Rotureau und Fayet, 2013; Boethling, Howard und Meylan, 2004), bis hin zu sehr aufwändigen Molekül-Dynamik-Simulationen oder quantenchemischen Berechnungen (Bittermann, Spycher und Goss, 2016). Die meisten der verfügbaren QSAR-Modelle sind empirisch und damit für Substanzen bzw. Systeme außerhalb ihrer Anwendungs-Domäne (definiert durch die Qualität und Variabilität ihres Trainingsdatensatzes) nicht geeignet. Die weit verbreitete Variante der Korrelation des $\log K_{OW}$ mit anderen Verteilungskoeffizienten ist ebenfalls mit großen Unsicherheiten behaftet, vor allem bei nichtoktanolähnlichen Phasen (Bronner und Goss, 2011; Harris u. a., 2008).

Ein weiterer Ansatz ist die Polyparameter-lineare-freie-Energie-Beziehung (*engl.: poly parameter linear free energy relationship - pp-LFER*). Hierbei werden je ein Parameter-Satz für die Phasen zwischen denen die Verteilung stattfindet (kleine Buchstaben) und die zu verteilenden Substanzen (große Buchstaben) verwendet (Flanagan u. a., 2005). Der entsprechende Formalismus sieht wie folgt aus:

$$\log K = v * V + l * L + a * A + b * B + s * S \quad (2.4)$$

Jeder dieser Parameter (groß und klein) beschreibt dabei eine andere Eigenschaft. V beschreibt das molare Volumen (normiert für die Verwendung in der logarithmischen Gleichung (Abraham und McGowan, 1987)), L ist der Hexadekan/Luft Verteilungskoeffizient, S die Polarisierbarkeit (Dipolarität) und A bzw. B beschreiben die Wasserstoffbrücken-Donor- bzw. Akzeptor-Eigenschaften. V und L beschreiben nichtspezifische Eigenschaften wie die notwendige Volumenarbeiten (V) und die Van-der-Waals-Wechselwirkung (L) und die anderen (S, A, B) spezifischere Eigenschaften. Der Parameter c ist ein Korrektur-Parameter, der zur Optimierung der Vorhersage dient. Die pp-LFER Gleichung ist damit wesentlich mechanistischer als andere Modelle, was dem Anspruch unseres Modells entspricht. Es sei angemerkt, dass in der Literatur auch die Verwendung des Parameters E anstelle von V oder L auftritt (Abraham, Ibrahim und Zissimos, 2004; Flanagan u. a., 2005).

In der Literatur existieren bereits System-Parameter, für die von uns benötigten Verteilungs-Phasen, wie zB. Speicherlipide/Wasser, Membranlipide/Wasser oder Proteine/Wasser und diverse Substanz-Parameter (Karunasekara und Poole, 2013; Endo, Bauerfeind und Goss, 2012; Bronner und Goss, 2011; Flanagan u. a., 2005; Geisler, Endo und Goss, 2012; Endo, Escher und Goss, 2011; Abraham, Ibrahim und Acree, 2005; Poole und Poole, 2008). Es empfiehlt sich hierbei die Verwendung einer pp-LFER Deskriptoren-Datenbank, in der > 3000 System- und Substanz-Deskriptoren enthalten sind und die nicht vorhandene Deskriptoren mittels integrierter QSAR berechnen kann (Ulrich S.; Brown, T.N.; Watanabe, N.; Bronner, G.; Abraham, M.H.; Goss, K.-U., 2017).

2.3 Vier gekoppelte Kompartimente

In diesem Abschnitt wird das Herleiten einer expliziten, analytischen Lösung für ein Differentialgleichungssystem, bestehend aus vier in Reihe liegenden Kompartimenten mit jeweils möglicher Hin- und Rückreaktion, beschrieben. Solche Differentialgleichungssysteme können zwar ohne Probleme numerisch gelöst werden, bedürfen dafür jedoch einer gewissen Rechenzeit. Dieser Zeitaufwand ist je nach beschriebener Situation und verwendetem Lösungsalgorithmus unterschiedlich hoch, liegt bei modernen Computersystemen jedoch meist im Bereich weniger Sekunden. In dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell wird eine rekursive Numerik Anwendung finden (siehe Abschnitt 3.1.3 - Rechenabläufe), in der ein solches Differentialgleichungssystem mehrfach (ca. 13x) pro Iteration (Durchlauf) benötigt wird. Je nach Situation werden mehrere zehntausend Iterationen benötigt, unter Umständen (Lang-Zeit-Simulationen) auch weit über eine Million. In diesem Kontext ist die Zeitersparnis von einer bzw. mehrere Sekunden pro Iteration mehr als gerechtfertigt. Zumal angemerkt werden soll, dass eine typische Iteration auf dem dafür vorgesehenen Computer (mit expliziter, analytischer Lösung) gerade einmal 0,006 Sekunden benötigt (siehe Abschnitt 3.4 - Programm Performance).

Der nachfolgend beschriebene Formalismus wurde in Microsoft-Excel implementiert und für eine separate Veröffentlichung im Rahmen der Beschreibung von „3 gekoppelten, reversiblen Kinetiken erster Ordnung,“ verwendet (Larisch und Goss, 2017). Diese Veröffentlichung enthält neben dem hier dargestellten Beispiel weitere Anwendungen, die das breite Anwendungsfeld einer solchen analytischen Lösung aufzeigen.

2.3.1 Aufkommen und Verwendung von vier gekoppelten Kompartimenten

Betrachtet man den Übergang eines Moleküls von der Lunge (analog Kiemen – dann mit Wasser statt Luft) ins Blut mittels eines einfachen Zwei-Kompartiment-Modells (Luft und Blut – siehe Abbildung 2.3). So kann der Diffusionsprozess durch die Lungen-Membran ebenfalls als ein Zwei-Kompartiment-Diffusions-Prozess beschrieben werden (siehe in Abschnitt 2.1.3 –Fick’sche Gesetze und Permeabilität).

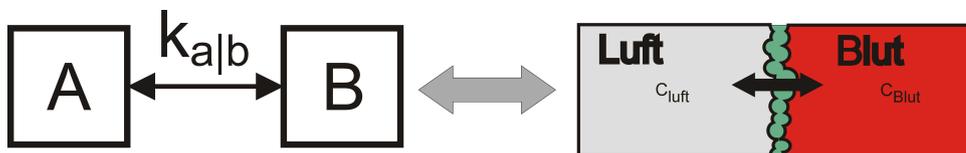


ABBILDUNG 2.3: Der Austausch von Luft zu Blut geschieht durch Diffusion durch das Lungengewebe. Dies lässt sich durch ein Zwei-Kompartiment - Problem beschreiben (Kompartiment A: Luft; Kompartiment B: Blut). Die Diffusion ist dabei symmetrisch in beide Richtungen und nur vom Konzentrationsgradienten abhängig.

In unserem Modell wollen wir das Lungengewebe (resp. Kiemengewebe) jedoch nicht als einfache Barriere darstellen. Da es aus mehreren Zell-Lagen besteht, hat das Kiemengewebe nicht nur einen Membran-Übergang, sondern mehrere. Ebenfalls haben die Zellbestandteile eine Sorptionskapazität und stehen im Verdacht metabolisch aktiv zu sein. Aus diesem Grund ist es für unserem Anspruch nötig, das Lungengewebe (resp. Kiemengewebe) als eigenständiges Kompartiment zu führen (siehe Abbildung 2.4).

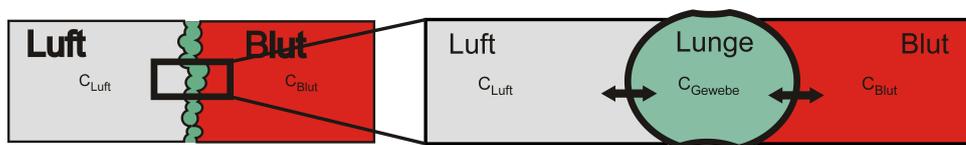


ABBILDUNG 2.4: Der Austausch von Luft zu Blut geschieht zuerst durch Diffusion in die Lunge und von dort weiter ins Blut. Die Lungen-Zellen-Membranen an den 'Rändern' nehmen hierbei die Rolle der Diffusionsbarrieren ein.

Eine Stufe komplexer wird es, wenn man sich die beteiligten Phasen näher anschaut. Sowohl das Lungengewebe als auch das Blut bestehen nicht nur aus einer Phase bzw. sie lassen sich nicht nur durch ein gemischtes Medium beschreiben. Vielmehr ist es sinnvoll, zwischen festen und wässrigen Bestandteilen zu unterscheiden

und zwischen diesen ebenfalls einen Austauschprozess (Adsorption und Desorption) stattfinden zu lassen. Dadurch entsteht ein Vier-Kompartiment-Problem (siehe Abbildung 2.5).

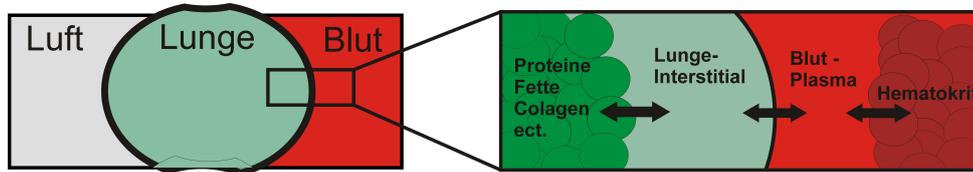


ABBILDUNG 2.5: Innerhalb der/des einzelnen Organe/Bluts findet ebenfalls Diffusion zwischen festen und wässrigen Phasen statt. Somit wird es nötig vier verschiedene Kompartimente zu betrachten.

Bislang konnten alle Diffusionsprozesse als symmetrisch durch die Barrieren (gleich in beide Richtungen) betrachtet werden. Jedoch kommt es in der Natur sehr häufig vor, dass aktive Transportmechanismen durch Membranen existieren. Diese sind wiederum meist nur in eine Richtung aktiv und brechen daher mit der bislang betrachteten symmetrischen Diffusion (siehe Abbildung 2.6). Dies ist die Situation, wie sie in dem hier vorgestellten Modell sehr häufig auftritt, da diese Prozesse nicht nur beim Übergang von Lungengewebe zu Blut, sondern auch beim Übergang vom Blut zu allen anderen Organen vorkommt.

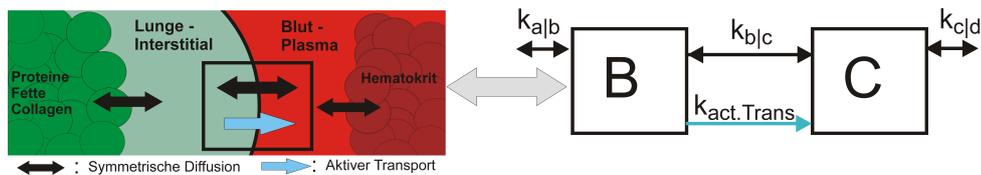


ABBILDUNG 2.6: Durch aktiven Transport durch die Zell-Membran in nur eine Richtung erfolgt eine Symmetriebrechung zwischen Kompartiment zwei und Kompartiment drei.

Ebenfalls können Ad- und Desorption an Zellbestandteile kinetisch beeinflusst sein. Auch ist die Richtung des zusätzlichen Transports nicht eindeutig. Möchte man nun, wie in unserem Fall, alle möglichen Situationen abdecken, so muss zwischen allen Kompartimenten Hin- und Rückreaktion getrennt betrachtet werden. Diese Situation lässt sich verallgemeinert als reversible Folge-Kinetik zwischen vier Kompartimenten darstellen (siehe Abbildung 2.7).

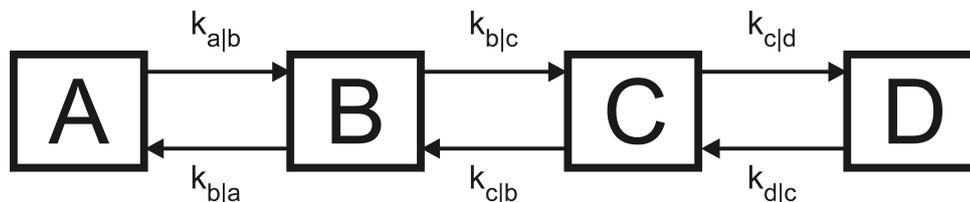


ABBILDUNG 2.7: Reversible Folge Kinetiken zwischen vier Kompartimenten (A, B, C, D) mit acht verschiedenen Konstanten (nach Larisch und Goss, 2017).

Das Differentialgleichungssystem (DGS) für Prozesse, die einer Kinetik erster Ordnung entsprechen, sieht wie folgt aus:

$$\begin{aligned}
\dot{N}(A) &= -k_{a,b} * C(A) + k_{b,a} * C(B) \\
\dot{N}(B) &= k_{a,b} * C(A) + k_{b,a} * C(B) - k_{b,c} * C(B) + k_{c,b} * C(C) \\
\dot{N}(C) &= k_{b,c} * C(B) + k_{c,b} * C(C) - k_{c,d} * C(C) - k_{d,c} * C(D) \\
\dot{N}(D) &= k_{c,d} * C(C) - k_{d,c} * C(D)
\end{aligned} \tag{2.5}$$

2.3.2 Skizze des Lösungswegs

Die vollständige Lösung des obigen Problems können Sie im SI der Veröffentlichung Larisch et al. 2017 (Larisch und Goss, 2017) entnehmen. Im Folgenden soll lediglich kurz der entsprechende Lösungsweg in drei Schritten skizziert sowie die entsprechende Lösung für das Kompartiment A (alle anderen Kompartimente sind analog) dargestellt werden.

I - Symmetrie als Grundbedingung Wenn man nun zwei entgegengesetzt orientierte Konstante zB. $k_{a;b}$ und $k_{b;a}$ betrachtet und beide von der selben physikalischen Größe ihres Kompartiments abhängen, wie zB. der Konzentration innerhalb ihres Kompartiments $C(i)$ oder explizit der Stoffmenge $N(i)$, dann ist es möglich, einen Faktor zu finden, mit dem beide Raten ineinander überführt werden können : $K = k_{i;j}/k_{j;i}$. Dies führt zu :

$$\begin{aligned}
\dot{N}(A) &= -k_{a,b} * C(A) + k_{b,a} * C(B) \quad ; \quad \dot{N}(B) = -k_{b,a} * C(B) + k_{a,b} * C(A) \\
K_1 &= \frac{k_{a,b}}{k_{b,a}} \\
\Rightarrow \dot{N}(A) &= -k_{a,b} * C(A) + \frac{k_{a,b}}{K_1} * C(B) \quad ; \quad \Rightarrow \dot{N}(B) = -\frac{k_{a,b}}{K_1} * C(B) + k_{a,b} * C(A)
\end{aligned} \tag{2.6}$$

Damit erhält man eine nur noch von einer Ratenkonstante abhängige Situation. Da dieses K von der Konzentration und von der Zeit unabhängig ist, kann es als normaler Faktor behandelt werden. Setzt man nun aber das Volumen des Systems $V_i = V(S_i)$ als konstant über die Zeit, so ist es durch den Zusammenhang $C_i(t) = N_i(t)/V_i$ möglich, den Faktor K an das Volumen zu multiplizieren und so ein 'relatives' Volumen $V_i^R = K * V_i$ zu bilden. Dieses K kann je nach Situation auch als Verteilungskoeffizient oder Reaktionskonstante verstanden werden. Auf diese Weise lassen sich die vorherigen Beziehungen der Systeme umschreiben:

$$\begin{aligned}
\dot{N}(A) &= -k_{a,b} * C(A) + k_{a,b} \frac{C(B)}{K_1} = -k_{a,b} * \frac{N(A)}{V(A)} + k_{a,b} \frac{N(B)}{K_1 * V(B)} = -k_{a,b} * \frac{N(A)}{V(A)} + k_{a,b} \frac{N(B)}{V^R(B)} \\
&= -k_{a,b} \left(\frac{N(A)}{V(A)} - \frac{N(B)}{V^R(B)} \right) \\
\dot{N}(B) &= +k_{a,b} * C(A) - k_{a,b} \frac{C(B)}{K_1} = +k_{a,b} * \frac{N(A)}{V(A)} - k_{a,b} \frac{N(B)}{K_1 * V(B)} = +k_{a,b} * \frac{N(A)}{V(A)} - k_{a,b} \frac{N(B)}{V^R(B)} \\
&= +k_{a,b} \left(\frac{N(A)}{V(A)} - \frac{N(B)}{V^R(B)} \right)
\end{aligned} \tag{2.7}$$

Damit existiert nun eine symmetrische Ratenkonstante zwischen den Systemen. Diese Umformung lässt sich einfach auf die weiteren beteiligten Systeme übertragen. Wobei zu beachten ist, dass die erste Umformung Einfluss auf die Umformungen der anderen Systeme hat - die bereits bekannten, relativen Volumina, also Ausgangspunkt sind. Somit lässt sich das Gesamt-Problem symmetrisieren.

Um die Übersichtlichkeit zu wahren (und um zu verdeutlichen, dass das nun folgenden Lösungskonzept auch für rein symmetrische DGS dieser Art verwendet

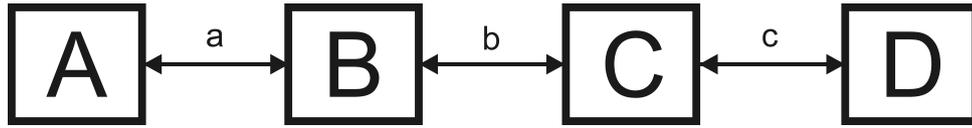


ABBILDUNG 2.8: Reversible Folge-Kinetik zwischen vier Kompartimenten (A, B, C, D) mit vier verschiedenen Konstanten.

werden kann), werden die relativen Volumina nur noch als normale Volumina dargestellt. Das symmetrische DGS lässt sich nun einfacher aufschreiben:

$$\begin{aligned}
 \dot{N}_A &= -a * \left(\frac{N_A(t)}{V_A(t)} - \frac{N_B(t)}{V_B(t)} \right) \\
 \dot{N}_B &= a * \left(\frac{N_A(t)}{V_A(t)} - \frac{N_B(t)}{V_B(t)} \right) - b * \left(\frac{N_B(t)}{V_B(t)} - \frac{N_C(t)}{V_C(t)} \right) \\
 \dot{N}_C &= b * \left(\frac{N_B(t)}{V_B(t)} - \frac{N_C(t)}{V_C(t)} \right) - c * \left(\frac{N_C(t)}{V_C(t)} - \frac{N_D(t)}{V_D(t)} \right) \\
 \dot{N}_D &= c * \left(\frac{N_C(t)}{V_C(t)} - \frac{N_D(t)}{V_D(t)} \right)
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

II - Linearisierung Als zweiter Schritt wird eine Linearisierung des Problems durchgeführt. Dh. alle Kopplungen innerhalb einer Gleichung des Gleichungssystems werden ersetzt durch Ableitungsausdrücke der jeweils vorhanden anderen Gleichungen. Ziel ist dabei einen Ausdruck für jedes Kompartiment zu erhalten, der nur noch vom jeweiligen Kompartiment selbst abhängt. Da es sich hier um vier gekoppelte Kompartimente handelt (also drei Kopplungen), ist davon auszugehen, dass mindestens die dritte Ableitung der jeweiligen Gleichung benötigt wird.

$$\ddot{N}_A = -a * \left(\frac{\ddot{N}_A}{V_A} - \frac{\ddot{N}_B}{V_B} \right) = \frac{-a}{V_A} \ddot{N}_A + \frac{a}{V_B} \ddot{N}_B \tag{2.9}$$

Wenn alle Kopplungen eliminiert sind, hat man einen Ausdruck der Form:

$$\begin{aligned}
 \ddot{N}_A &= \frac{-a}{V_A} \ddot{N}_A + \frac{a^2}{V_A V_B} \ddot{N}_A - \left(\frac{abc}{V_B V_C V_D} - \frac{a^2(b+c)}{V_A V_B V_C} - \frac{a^2 c}{V_A V_B V_D} \right) \dot{N}_A \\
 &\quad - \left(\frac{a(a+b)}{V_B^2} + \frac{a(b+c)}{V_B V_C} + \frac{ac}{V_C V_D} \right) \times \frac{V_2}{a} \times \left(\ddot{N}_A + \frac{a}{V_A} \dot{N}_A \right) \\
 &\quad + \left(\frac{ab^2}{V_B^2 V_C} - \frac{abc}{V_B V_C V_D} - \frac{a(a+b)(b+c)}{V_B^2 V_C} - \frac{ac(a+b)}{V_B^2 V_D} \right) \times \frac{V_B}{a} \times \left(\ddot{N}_A + \frac{a}{V_A} \dot{N}_A \right)
 \end{aligned} \tag{2.10}$$

Mit einigen Substitutionen kann man diesen nun auf die Form einer linearen, homogenen Differentialgleichung (DGL) 3. Ordnung bringen:

$$\begin{aligned}
 \alpha &= \left(\frac{a}{V_A} + \frac{a+b}{V_B} + \frac{b+c}{V_C} + \frac{c}{V_D} \right) \\
 \beta &= ab \left(\frac{1}{V_A V_B} + \frac{1}{V_A V_C} + \frac{1}{V_B V_C} \right) + bc \left(\frac{1}{V_B V_C} + \frac{1}{V_B V_D} + \frac{1}{V_C V_D} \right) \\
 &\quad + ac \left(\frac{1}{V_A V_C} + \frac{1}{V_A V_D} + \frac{1}{V_B V_C} + \frac{1}{V_B V_D} \right) \\
 \gamma &= abc \left(\frac{1}{V_A V_C V_D} + \frac{1}{V_B V_C V_D} + \frac{1}{V_A V_B V_C} + \frac{1}{V_A V_B V_D} \right) = abc \left(\frac{V_A + V_B + V_C + V_D}{V_A V_B V_C V_D} \right) \\
 y &= \dot{N}_A, \dot{y} = \ddot{N}_A, \ddot{y} = \dddot{N}_A
 \end{aligned} \tag{2.11}$$

$$\Rightarrow \ddot{y} + \alpha \dot{y} + \beta y + \gamma y = 0 \quad (2.12)$$

III – Lösen der DGL. 3.Ordnung Um diese DGL zu lösen, benutzen wir einen einfachen Exponential-Ansatz $Y = e^{-\lambda t}$ und die allgemeine Lösung:

$$y(t) = C_1 e^{-\lambda_1 t} + C_2 e^{-\lambda_2 t} + C_3 e^{-\lambda_3 t} \quad (2.13)$$

Dies führt zu einem Polynom 3. Ordnung:

$$(\lambda^3 - \alpha \lambda^2 + \beta \lambda - \gamma) \times e^{-\lambda t} = 0 \quad (2.14)$$

Um dieses Polynom ohne Nebenbedingungen lösen zu können, benutzen wir die Cardanischen Formeln (Gerolamo Cardano – ca. 1470). In Abhängigkeit von der sogenannten Lagrangen Resolventen D erhält man drei Teil-Lösungen und daraus die allgemeine Lösung. Zuvor müssen noch einige Substitutionen gemacht werden:

$$\lambda = z + \frac{\alpha}{3} \quad ; \quad p = \beta - \frac{\alpha^2}{3} \quad ; \quad q = -\frac{2\alpha^3}{27} + \frac{\alpha\beta}{3} - \gamma \quad (2.15)$$

$$D = \left(\frac{q}{2}\right)^2 + \left(\frac{p}{3}\right)^3$$

$D > 0$	$D = 0$	$D < 0$
$\lambda_1 = u + v + \frac{\alpha}{3}$	$\lambda_1 = \frac{3q}{p} + \frac{\alpha}{3}$	$\lambda_1 = 2 * \sqrt{\frac{-p}{3}} \cos\left(\frac{\phi}{3}\right) + \frac{\alpha}{3}$
$\lambda_2 = \frac{-(u_1 + v_2) + i\sqrt{3}(u_1 - v_1)}{2} + \frac{\alpha}{3}$	$\lambda_2 = -\frac{3q}{2p} + \frac{\alpha}{3}$	$\lambda_2 = 2 * \sqrt{\frac{-p}{3}} \cos\left(\frac{\phi + 2\pi}{3}\right) + \frac{\alpha}{3}$
$\lambda_3 = \frac{-(u_1 + v_2) - i\sqrt{3}(u_1 - v_1)}{2} + \frac{\alpha}{3}$	$\lambda_3 = -\frac{3q}{2p} + \frac{\alpha}{3}$	$\lambda_3 = 2 * \sqrt{\frac{-p}{3}} \cos\left(\frac{\phi + 4\pi}{3}\right) + \frac{\alpha}{3}$
$u = \sqrt[3]{-\frac{q}{2} + \sqrt{D}}$		$\cos(\phi) = \frac{-q}{2 * \sqrt{-\left(\frac{p}{3}\right)^3}}$
$v = \sqrt[3]{-\frac{q}{2} - \sqrt{D}}$		

(2.16)

Für den Fall, das $D < 0$ ist, kann nun mittels drei einfacher Randbedingungen eine Lösung erstellt werden: Die Startbedingungen sind bekannt: $N(t=0)$, Equilibrium nach unendlicher Zeit wird erreicht und die Massen-Erhaltung muss gelten. Als Beispiel wird hier der Term für C_1 dargestellt:

$$C_1 = -\frac{\lambda_1 k_{3,4}}{(\lambda_3 - \lambda_1)(\lambda_2 - \lambda_1)} \left(\frac{N_3(0)}{V_3} - \frac{N_4(0)}{V_4} \right) \left(\frac{k_{3,4}}{V_3} + \frac{k_{3,4}}{V_4} + (\lambda_2 + \lambda_3) \right)$$

$$+ \frac{\lambda_1 k_{3,4}}{(\lambda_3 - \lambda_1)(\lambda_2 - \lambda_1)} \left(\frac{k_{2,3}}{V_3} \right) \left(\frac{N_2(0)}{V_2} - \frac{N_3(0)}{V_3} \right)$$

$$+ \frac{\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3}{(\lambda_3 - \lambda_1)(\lambda_2 - \lambda_1)} \left(V_4 \times \left(\frac{N_1(0) + N_2(0) + N_3(0) + N_4(0)}{V_1 + V_2 + V_3 + V_4} \right) - N_4(0) \right) \quad (2.17)$$

2.3.3 Validierung der Gleichungen

Da die Gleichungen überaus lang sind und es bei der Herleitung schnell zu Fehlern kommen kann, wurde eine Validierung gegen einen numerischen Löser durchgeführt. Hierzu wurde der in Matlab implementierte Lösungs-Algorithmus ODE45 genutzt. Die analytische Lösung lieferte in allen getesteten Szenarien die gleichen Ergebnisse (exemplarisch dargestellt in Abbildung 2.9 u. 2.10).

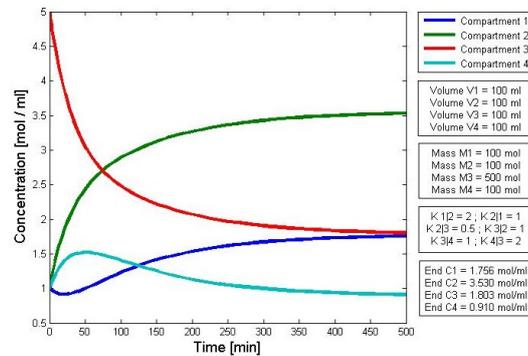


ABBILDUNG 2.9: Grafik der Ergebnisse des Matlab-ODE45-Algorithmus mit entsprechenden Anfangsbedingungen.

Der Quellcode zur Überprüfung der Ergebnisse mittels des ODE45-Lösers sowie die gesamte Herleitung und detaillierte Validierung finden sich im Supporting Information der Veröffentlichung von Larisch und Goss 2017 „Calculating the first-order kinetics of three coupled, reversible processes“, (Seite 1- 52) (Larisch und Goss, 2017).

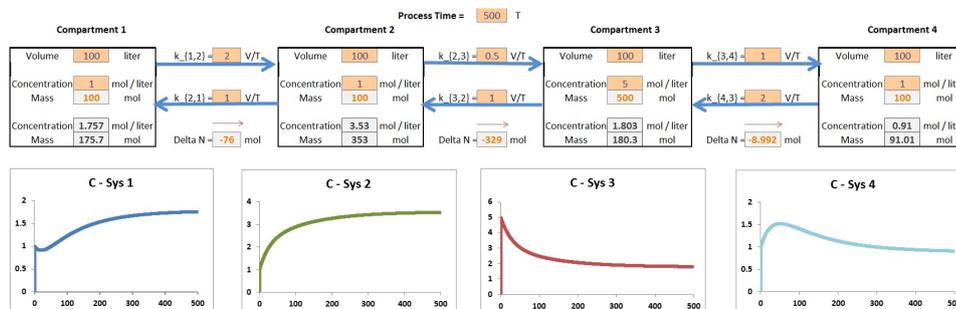


ABBILDUNG 2.10: Grafik der Ergebnisse des Excel-Algorithmus mit entsprechenden Anfangsbedingungen.

Kapitel 3

Modell und Validierung

In diesem Kapitel werden das Modell und seine Details vorgestellt und anschließend die Validierung einzelner Prozesse besprochen. Wie später gezeigt wird, benötigt das hier vorgestellte Modell eine Vielzahl an physiologischen Parametern der zu modellierenden Spezies sowie geeignete experimentelle Daten um einzelne Prozesse validieren zu können.

Die Zusammenstellung eines vollständigen physiologischen Datensatzes gelang hierbei für den Menschen (72Kg) und für eine Fischart (1Kg Regenbogenforelle) durch Dr. Trevor N. Brown. Dank seiner Bemühungen konnte der physiologische Datensatz der Regenbogenforelle mit allometrischen Skalierungen ausgestattet werden. Diese erlauben es, ausgehend zB. von dem 1Kg Datensatz, auf andere Körpergewichte zu skalieren. Da Organe nicht im selben Verhältnis wie das Körpergewicht wachsen und verschiedene Parameter wie Ventilationsrate oder Blutfluss auch nicht linear von der Körpergröße abhängen, war dies unerlässlich.

Datensätze aus Experimenten, mit denen das Modell validiert werden kann, sind für den Menschen weitaus schwieriger zu finden, als für Regenbogenforellen oder ähnliche Fischarten. Daher wird im Anschluss an die Modell-Besprechung eine Validierung der Prozesse für Aufnahme über Kiemen und Darm sowie für die interne Verteilung von neutralen bis leicht polaren Substanzen in Regenbogenforellen aufgezeigt. Durch die Beschreibung aller Prozesse unabhängig voneinander und im höchstmöglichen physikalisch-chemischen Detail können bereits validierte Prozesse auf andere Szenarien und Spezies übertragen werden, ohne dass sie selbst neu validiert werden müssen. Dies ermöglicht es, neue Prozesse hinzuzufügen und einzeln zu validieren ohne das bisherige Modell bzw. seine validierten Prozesse infrage zu stellen.

Am Ende dieses Kapitels finden Sie eine Übersicht über die Nutzer-Oberfläche des Programms sowie eine kurze Einführung zu dessen Benutzung. Eine Kurzübersicht über die Performance des Programms sowie Hinweise, wie diese verbessert werden kann (bzw. worauf im Code zu achten ist), helfen die benötigte Rechenzeit für verschiedene Szenarien abzuschätzen und bei Weiterentwicklungen stabil zu halten.

3.1 Aufbau des Modells

In diesem Abschnitt wird der Aufbau des Modelles beschrieben. Es wird mit der typischen PbTk-Struktur begonnen und darauf aufbauend immer weiter ins Detail gegangen. Dabei werden nach und nach alle Besonderheiten und deren Bedeutung angesprochen. Am Schluss wird auf den Rechenablauf im Groben eingegangen, da

dieser für das Verständnis einiger Einschränkungen des Modells unerlässlich ist. Auf den Aufbau des Programms an sich (Quellcode und Programm-Struktur) wird hier bewusst verzichtet, da dies sowohl inhaltlich wenig von Bedeutung, als auch aus Platzgründen in dieser Arbeit nicht sinnvoll ist.

3.1.1 PbTk - Struktur

Der Aufbau heutiger PbTk Modelle hat sich seit den 1990 Jahren kaum verändert. Daher ähneln fast alle Modelle im wesentlichen dem Aufbau des damals entwickelten und bis heute meist genutzten bzw. weiterentwickeltem Modells von Nichols (Nichols u. a., 1990). Dabei wird der Organismus in mehrere unterschiedliche Organe aufgeteilt, die alle über einen Blutfluss miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 3.1).

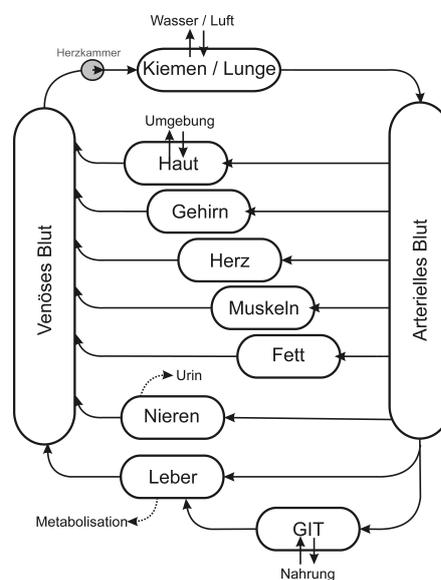


ABBILDUNG 3.1: Schematische Darstellung der abgebildeten Organe im Modell (nach Larisch, Brown und Goss, 2017). Auf der Abbildung fehlen aus Übersichtsgründen einige innere Organe (Gonaden, Milz und Knochen). Die Pfeile deuten die Blutflussrichtung an.

Prinzipiell gibt es dabei zwei Gruppen von Organen: Die internen Organe - Herz, Gehirn, Fettgewebe, Muskeln, Nieren, Leber, Knochen, Milz und Geschlechtsteile (männlich oder weiblich). Diese stehen nur mit dem Blutfluss in Wechselwirkung. Als Zweites gibt es die austauschenden Organe - Lunge (bzw. Kiemen), Haut und Magen-Darm-Trakt (engl.: Gastro-Intestinal-Tract - GIT). Austauschende Organe stehen sowohl mit dem Blut in Wechselwirkung als auch mit dem äußeren Medium (Lunge, Kiemen, Haut) bzw. etwaig aufgenommener Nahrung (GIT). An dieser Stelle unterscheidet sich dieses Modell teilweise von anderen. Es kommt recht häufig vor, dass statt der Aufteilung auf einzelne innere Organe, gemischte Kompartimente angegeben werden: Stark durchblutetes Gewebe (engl.: *high perfused Tissue*) und schwach durchblutetes Gewebe (engl.: *low perfused tissue*) oder schlicht andere, gemischte Gewebe (Celsie u. a., 2015; Nichols u. a., 2004a; Péry u. a., 2014). Im Wesentlichen legen die entsprechenden Autoren keinen Wert auf die Information der einzelnen Organe bzw. ist die Abschätzung der entsprechenden Blutflüsse auf diese Weise einfacher.

Es gibt zwei separate Blut-Pools: den arteriellen Blut-Pool und den venösen Blut-Pool. Aus dem venösen Blut-Pool wird vom Herzen das gesamte Herzzeitvolumen (*engl.: cardiac output*), also die Menge an Blut die pro Zeiteinheit in die Arterien gepumpt wird, entnommen. Hierbei ist zu beachten, dass das Herz lediglich als Pumpe funktioniert und nicht das gesamte Herzzeitvolumen dem Herzgewebe zum Wechselwirken zur Verfügung steht. Das Herz als sorbierendes Kompartiment erhält nach der Aufteilung des arteriellen Blutes nach der/den Lunge/Kiemen einen entsprechenden Anteil des Blutflusses, der dann in die Herzgefäße fließt und dem Herzgewebe zur Verfügung steht. Damit ist die Lunge/Kiemen das einzige Organ, das das gesamte Herzzeitvolumen zum Wechselwirken zur Verfügung hat.

Alle Organe (innere und austauschende Organe) haben die Möglichkeit einen Metabolismus zuzuschalten. Dieser kann entweder linear, einer Kinetik erster Ordnung oder einer Michaelis-Menten-Kinetik folgen. Der Niere steht noch ein weitere Prozess, die Urination, zur Verfügung. Dabei handelt es sich um einen einfachen Verlust-Prozess, der bei der Betrachtung von Fischen jedoch keine große Rolle spielt. Zusätzlich kann in jedes Organ sowie in die beiden Blut-Pools eine direkte Injektion erfolgen. In den Organen würde dies nur auf das Organ-Gewebe angewendet (siehe Abschnitt Organ-Struktur).

3.1.2 Gastro-Intestinal-Trakt

Der in Abbildung 3.1 schematisch dargestellte Gastro-Intestinal-Trakt (GIT) soll nun noch näher betrachtet werden. Während beim Menschen eine klare Abtrennung zwischen Magen, Dünn- und Dickdarm (wenn notwendig auch noch weitere Aufteilungen) gemacht werden kann, ist es bei Fischen im Allgemeinen nicht möglich, einzelne Abschnitte klar zu definieren, da sie strukturell ineinander übergehen und optisch kaum zu unterscheiden sind. Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen, wird der GIT in drei Teile geteilt. Jeder einzelne Teil kann separat parametrisiert werden und verfügt über ein separates Volumen für Nahrung/Fecies. Dabei muss beachtet werden, dass in der Realität die aufgenommene Nahrung kontinuierlich weiterrutscht, während in diesem Modell ein aufgenommenes Nahrungspaket eine definierte Zeit innerhalb eines Darm-Abschnittes verbleibt um dann in das nächste übergeben zu werden (bzw. am Ende ausgeschieden wird).

Jeder Darmabschnitt verfügt über die Möglichkeit einer individuellen Verdauung sowohl für Proteine als auch für Lipide. Dass dies von Bedeutung ist, zeigen die Daten aus Nichols et al. 2004 (Nichols u. a., 2004a), in denen über den Zeitraum von 48 Stunden Verdauung das Volumen des Darminhalts von drei verschiedenen Darmabschnitten (Stomach, upper and lower testines) von Regenbogenforellen und Dickkopfelritzen gemessen wurde. Des weiteren wird im Paper eine Reduktion des Lipid-Gehaltes auf 9% (am Ende der Verdauung) angegeben. Dies wird in diesem Modell ebenfalls berücksichtigt und sofern keine anderen Informationen vorliegen, als Standardwert der Verdauung für Fische benutzt 2004 (Larisch und Goss, 2018b).

Eine weitere Besonderheit dieses aufgeteilten Darmes ist der Blutfluss. Dieser Verläuft parallel durch die Darmabschnitte und fließt dann in das sogenannte Hepatische Portal (*engl.: Hepatic Portal Vein –HPV*), dass sich in nahezu allen Wirbeltieren finden lässt (S. N. Prasad, 1989). Hier mischt es sich mit dem arteriellen Blutfluss zur Leber und geht dann vollständig zur Leber als Organ. Diese Struktur dient zur besseren Abbildung eines sogenannten 'first pass effect'. Substanzen, die über die Nahrung aufgenommen werden, können so schneller von der Leber metabolisiert

des Organ-Gewebes wird als Eingabe Parameter benötigt. Entsprechende Werte für verschiedene Organe und Körpergrößen können in der Literatur gefunden werden (Nichols u. a., 1990; Nichols u. a., 1996; Barron, Tarr und Hayton, 1987; Nichols u. a., 2001; Hughes, 1966; Bertelsen u. a., 1998; Escher u. a., 2011; Nichols, Schultz und Fitzsimmons, 2006).

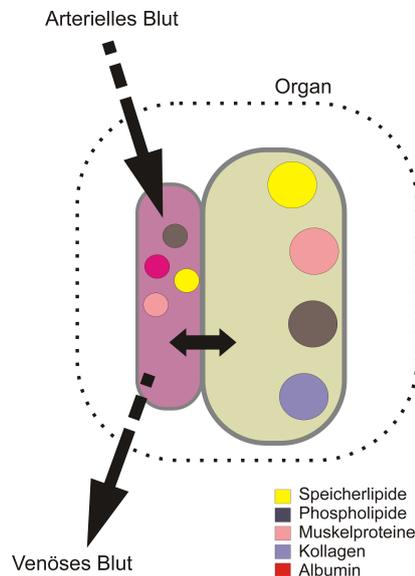


ABBILDUNG 3.3: Schematik eines Organs (generallisiert, nach Larisch, Brown und Goss, 2017). Es gibt zwei verschiedenen Kompartimente: den Organ-Blut-Pool und das Organ-Gewebe. Jedes Kompartiment beinhaltet fünf verschiedene Sorptionsphasen (siehe Legende). Der Blutfluss des arteriellen Blut-Systems beeinflusst zunächst nur das Blut im Blut-Pool. Zwischen beiden Kompartimenten finden alle Austauschprozesse über die Endothel-Zellen hinweg statt.

Um die Größe des Kapillaren-Blutes innerhalb eines Organs abzuschätzen, werden die sogenannten Krogh'schen Zylinder verwendet. Dabei handelt es sich um eine Abschätzung der notwendigen Kapillargefäße für die Sauerstoff-Versorgung des Gewebes (Benešová, 1986; Krogh, 1922). Es wird davon ausgegangen, dass eine Kapillare mit einem Durchmesser von ca. $6\mu\text{m}$ (Simionescu, Simionescu und Palade, 1974) in einem Radius zwischen $30\mu\text{m}$ und $50\mu\text{m}$ (Thews, 1959; Thews und Hutten, 1978) um sie herum das Gewebe effektiv mit Sauerstoff versorgen kann. Daraus ergibt sich ein virtueller Zylinder, der nun, aufgeteilt in mehrere parallele Zylinder, das gesamte Organgewebe versorgen muss. Aus der notwendigen Länge aller Zylinder kann ein Blut-Volumen sowie eine Austausch-Oberfläche (Diffusionsfläche) berechnet werden (Schünemann, 2005). Je nach Sauerstoffbedarf des Gewebes gibt es somit besser durchblutetes Gewebe ($30\mu\text{m}$ Radius) und schlechter durchblutetes Gewebe ($50\mu\text{m}$). Dies entspricht den bereits erwähnten ‚high perfused Tissue‘ und ‚low perfused Tissue‘ anderer Autoren (Nichols u. a., 1990; McKim, Schmieder und Veith, 1985).

3.1.4 Austausch zwischen Kompartimenten

Der Austausch einer Substanz zwischen Blut-Organ und Blut-Gewebe findet in diesem Modell derzeit nur als transzelluläre Permeation durch die Endothel-Zellen

statt. Der parazelluläre Weg (durch Öffnungen zwischen den Zellen bzw. durch spezielle Kanäle) spielt für die in dieser Arbeit betrachteten Substanzen keine Rolle. Für kleine und sehr polare Moleküle (bspw. Zucker) jedoch kann dies von Bedeutung sein.

Die Berechnung der Permeabilitäten erfolgt für jede einzelne Membran innerhalb des Organismus und ist im Wesentlichen durch die Breite ' B_{ABL} ', ihre wässrigen Grenzschichten (*engl.: Aquatic Boundary Layer - ABL*) und ihrer eigene Breite ' B_{Mem} ' sowie den in den jeweiligen Medien herrschenden Diffusionskoeffizienten und den Verteilungskoeffizienten bestimmt: $P_i = D_i K_i / B_i$ [cm/sek]. Dabei ergibt sich die Gesamt-Permeabilität als reziproke Addition der einzelnen Permeabilitäten:

$$\frac{1}{P_{Ges}} = \frac{1}{P_{ABL}} + \frac{1}{P_{Mem}} + \frac{1}{P_{Cyt}} + \frac{1}{P_{Mem}} + \frac{1}{P_{ABL}} \quad (3.1)$$

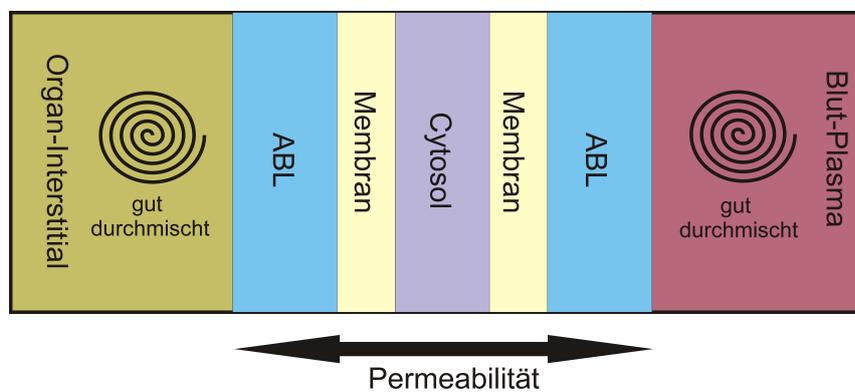


ABBILDUNG 3.4: Die Gesamt Permeabilität über die Endothel Zellen ergibt sich aus der reziproken Addition aller Einzel-Permeabilitäten (nach Larisch, Brown und Goss, 2017).

3.1.5 Träger gebundener Transport

Für hydrophobe Substanzen stellen die ABL den Hauptwiderstand bei der Permeation dar. Da jedoch auch Substanzen gebunden an Proteine/Fette die ABL durchqueren können (Kramer, Van Eijkeren und Hermens, 2007), also ein zusätzlicher Transport an Träger (*engl.: Carrier*) gebunden durch die ABL stattfinden kann, wurden zusätzliche Beschleunigungsfaktoren (*engl.: Facilitation Factor – FAC*) eingeführt. Diese lassen sich als Quotient aus beschleunigter (Diffusion + Transport) und nicht beschleunigter Permeabilität definieren (nur Diffusion):

$$FAC = \frac{P_{Diffusion} + P_{Transport}}{P_{Diffusion}} \quad (3.2)$$

Wobei $P_{Diffusion}$ die normale Diffusion durch die ABL darstellt:

$$P_{Diffusion} = K_{W/W} * \frac{D_W}{B_{ABL}} \quad (3.3)$$

Der Albumin FAC beschreibt den Transport der an Blut-Albumin gebundenen Substanz durch die ABL im inneren der KapillargefäÙe (Siehe Abbildung 3.5). Um eine transportergebundene Permeabilität zu berechnen, benötigen wir den Diffusionskoeffizienten von Albumin in Wasser (D_{Alb}), den Verteilungskoeffizienten der Substanz von Wasser zu Albumin (K_{Alb}) und die Konzentration des in Wasser gelösten Albumins (C_{Alb}):

$$P_{Transport(Albumin)} = K_{Alb/W} * D_{Alb} * \frac{C_{Alb}}{B_{ABL}} \quad (3.4)$$

$$FAC_{Albumin} = \frac{(K_{W/W} * D_W) + (K_{Alb/W} * D_{Alb} * C_{Alb})}{K_{W/W} * D_W} \quad (3.5)$$

Der Mizellen FAC beschreibt den Transport durch in Mizellen aus Gallenflüssigkeit transportierte Substanz im Darm hin zur Darmwand (Zhang u. a., 2015; Mayer u. a., 2007; Kelly, Gobas und McLachlan, 2004; Drouillard u. a., 2012; Westergaard und Dietschy, 1976a). Da für die Berechnung einer Mizellenbeschleunigung die Konzentration des Mizellenbildners und der Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen Mizellenbildner und Wasser benötigt wird, kann dieser nicht automatisch berechnet werden (da die notwendigen Daten nicht vorliegen). Dieser muss gesondert abgeschätzt werden. Wie so eine Abschätzung gemacht werden kann, finden sie im Kapitel 3.2.2 - Aufnahme über den GIT.

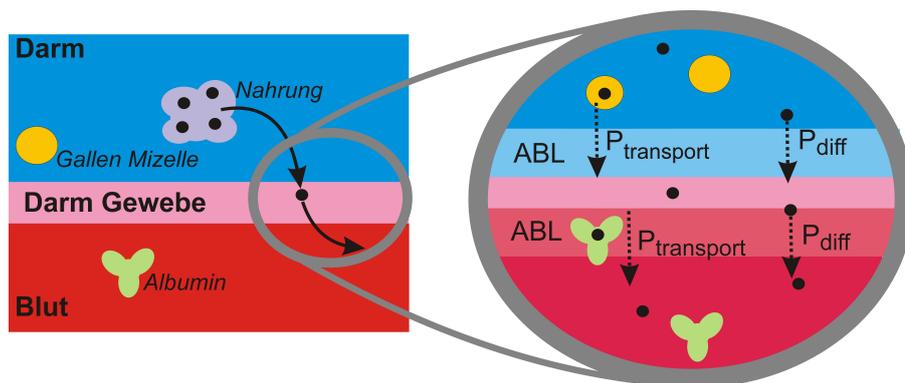


ABBILDUNG 3.5: Bei der Permeation einer hydrophoben Substanz von der Nahrung über den Darm ins Blut kann an zwei Stellen ein zusätzlicher Transportprozess parallel zur Diffusion die gesamte Permeation beschleunigen: beim Überqueren der darm-seitigen ABL durch Gallen-Mizellen und beim Überqueren der blut-seitigen ABL durch das Blutprotein Albumin (nach Larisch und Goss, 2018a).

Bei der Berechnung der Permeabilität wird ein etwaig auftretender FAC reziprok an die ABL Breite multipliziert, was zu einer künstlichen Verringerung der Diffusionsstrecke und damit der effektiven Verringerung des Widerstandes gleichkommt.

Dem Facilitation Factor steht ein sogenannter Mucus Factor entgegen. Dieser bildet eine Verminderung der Bewegungsfreiheit aufgrund der hydrogelartigen Struktur der ABL ab (Sigurdsson, Kirch und Lehr, 2013). Dieser Wert ist für alle Organe etwa zwei und für die Kiemen 1.7. Der Mucus Faktor wird an die ABL-Breite multipliziert und sorgt so für eine künstliche Verlängerung der Diffusionsstrecke. Dies ist zwar mathematisch identisch, aber darf nicht so verstanden werden.

3.1.6 Adsorptions- und Desorptionskinetik

Neben dem kinetischen Prozess der Permeation durch die Endothel-Zellen und gegebenenfalls eines zusätzlichen aktiven Transportes gibt es noch weitere kinetische Prozesse, die einen Einfluss haben können: die Adsorption und Desorption an feste Sorptionsphasen. Damit sind all jene nicht wässrigen Phasen innerhalb der Kompartimente gemeint. In der Literatur zur Human-Toxikologie und Pharmakologie wurde festgestellt, dass die Adsorptionskinetik an Albumin einen entscheidenden Einfluss auf die gesamte Aufnahmekinetik haben kann (Baker und Parton, 2007; Berezhkovskiy, 2012). Dies ist eines der ersten PbTk Modelle, das diese Kinetik implementiert hat.

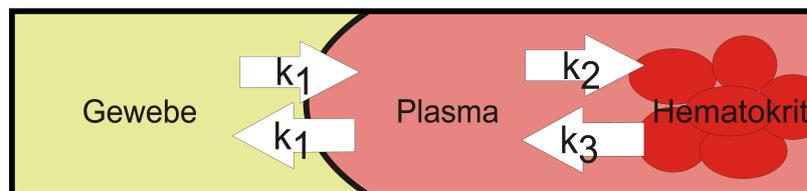


ABBILDUNG 3.6: Drei-Kompartiment-Prozess - Permeation zwischen Kompartiment eins und zwei und Ad/Desorption zwischen Kompartiment zwei und drei (nach Larisch, Brown und Goss, 2017).

Nun können solche Ad- und Desorptionskinetiken nicht nur an Albumin stattfinden, sondern auch an Zellbestandteilen. Dh. neben der in Abbildung 3.6 gezeigten drei Kompartimente mit Hin- und Rückkinetik kommt es somit auch zu einer Situation mit vier Kompartimenten und drei reversiblen Kinetiken erster Ordnung. Wie dies mathematisch zu lösen ist, finden Sie in Kapitel 2.3.

3.1.7 Berechnungsschleife

Die Berechnung all dieser Prozesse geschieht iterativ. Das bedeutet, dass das Ergebnis aus der letzten Berechnung die Startwerte für die nächste Berechnung liefert. Innerhalb einer Iteration werden dabei alle Prozesse sequenziell (Nacheinander) bearbeitet und alle einzelnen Ergebnisse zwischengespeichert. Daher ist es von großer Bedeutung, welche Zeitschrittweite eine einzelne Iteration hat. Hierfür wurde eine Schrittweite von einer Sekunde gewählt. Dies hat zur Folge, dass pro Iteration nicht mehr als 10% des Blutes eines Organs ausgetauscht werden. Würde man mehr als 10% auf einmal austauschen, wäre die Annahme der guten Durchmischung in den Blut-Kompartimenten gefährdet und dies kann zu unrealistischen Ergebnissen führen. Die Zeitauflösung ist jedoch keineswegs festgesetzt, sondern kann im Modell verändert werden. Dies sollte jedoch mit Vorsicht gemacht werden, da nahezu alle Prozesse davon betroffen sind. Prinzipiell sind kleinere Zeitschrittweiten kein Problem, sie erhöhen jedoch den Rechenaufwand (da mehr Iterationen für eine bestimmte Simulations-Zeit benötigt werden).

Nach jeder Iteration können alle Randbedingungen geändert werden. Das ist notwendig, da sich Zusammensetzungen und Größe verschiedener Organe verändern können oder sich das Expositions-Szenario drastisch ändert („Peak Exposure“). Alle wichtigen Ergebnisse aus den Iterationen werden nach einer frei einstellbaren

Iterations-Zahl (Speicherschnittweite) in Ascii Files ausgelagert. Dies dient der optimalen Speichernutzung und des Absicherns aller Simulationsergebnisse. Als wichtige Ergebnisse gelten derzeit: die Konzentrationen in allen sorbierenden Phasen aller Organe, die entsprechenden Stoffmengen und ihre absoluten Änderungen, Metabolisation sowie wichtige Organeigenschaften (Größe der Gewebe und Blut-Pools, Zusammensetzungen und Blutflussmengen).

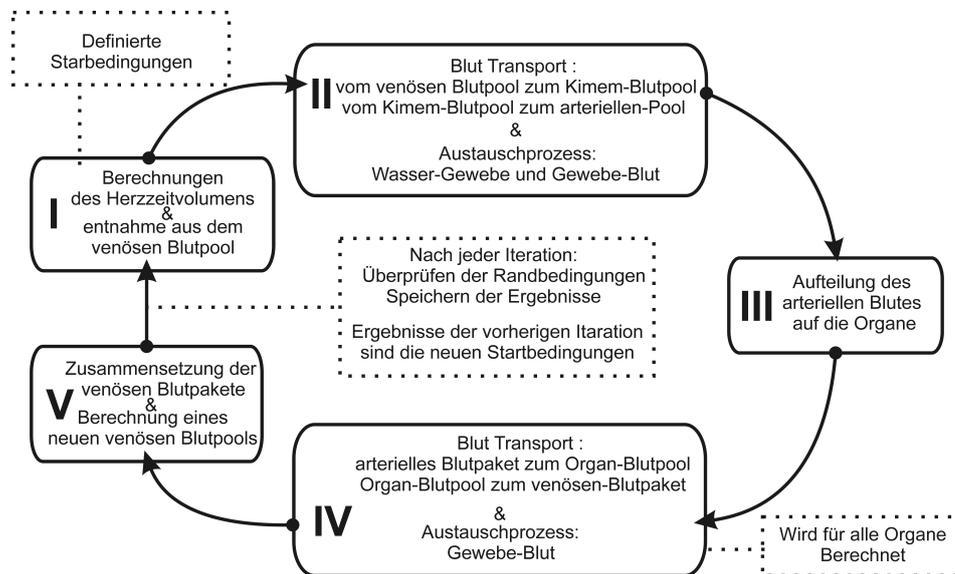


ABBILDUNG 3.7: Schema der Berechnungsschleifen für eine Iteration (nach Larisch, Brown und Goss, 2017).

Jede Iteration ist in fünf Abschnitte unterteilt (siehe Abbildung 3.7). Im ersten Abschnitt werden die zu transportierenden Blutvolumen des kardialen Herzzeitvolumens berechnet und dem venösen Blut-Pool entzogen. Zusammen mit der darin enthaltenen Stoffmenge (N_{BIF}) wird es in die Lunge / Kiemen geführt.

Im zweiten Abschnitt wird die einfließende Blutmenge mit dem vorhandenen Blut-Pool gemischt und gleichzeitig das gleiche Blutvolumen aus dem Blut-Pool entfernt. Dabei hat das Ausströmende (jetzt arterielle Blut) noch die Konzentration des ungemischten Blutes und trägt entsprechend eine andere Stoffmenge (N_{BOF}). Dabei wird zwischen an Feststoffen gebundener Stoffmenge/Konzentration und freigelöster Konzentration unterschieden, da sich diese durch Ad- und Desorbtkinetik nicht zwangsweise im Gleichgewicht befinden müssen. Equilibrium beim Mischen des Blutflusses mit dem Blut-Pool wird daher nur innerhalb der festen Phasen und innerhalb der wässrigen Phasen angenommen. Anschließend werden alle Austauschprozesse berechnet und als parallel verlaufend angenommen (dh. alle Prozesse haben die gleichen Randbedingungen). Dazu gehören der Austausch mit dem außenliegenden Medium (N_{EO}) mit dem Organ-Gewebe, der Austausch des Organ-Gewebes mit dem Organ-Blut (N_{EI}), etwaiger Metabolismus (N_{Metab}) oder Injektion (N_{Inject}). Danach erfolgt eine Massen-Bilanz-Gleichung für alle Prozesse für Gewebe und Blut:

$$N_{Gewebe(Neu)} = N_{Gewebe(Alt)} + N_{EO} - N_{EI} - N_{Metab} + N_{Inject} \quad (3.6)$$

$$N_{Blut(Neu)} = N_{Blut(Alt)} + N_{EI} + N_{BIF} - N_{BOF} \quad (3.7)$$

Im dritten Abschnitt wird das aus den Lungen/Kiemen strömende Blut (ab hier als arterielles Blut bezeichnet) auf die vorhandenen Organe nach einem vom Nutzer definiertem Schlüssel aufgeteilt. Blut, das nicht zugeordnet wurde, fließt direkt zurück in den venösen Blut-Pool (damit wird die gesamt Massen Bilanz gewahrt). Modelle, die nicht auf explizite Blutströme zurückgreifen, müssen darauf achten, dass ihre Blutzuteilung (meist in Form von Quotienten oder Prozenten) immer auf 100% aufgeht, da sie ansonsten nicht konsistent arbeiten. Dies verhindert meist ein einfaches Ab- oder Zuschalten von einzelnen Organen zu Studienzwecken.

Im vierten Abschnitt wird der Austausch der einzelnen Organgewebe mit ihrem jeweiligen Blut-Pool berechnet. Dies geschieht im Wesentlichen wie im zweiten Abschnitt mit der Ausnahme, dass kein externer Massenfluss vorhanden ist (da kein externes Medium zur Verfügung steht). Dabei können alle Organe als Parallel liegend betrachtet werden, da ihre Prozesse voneinander unabhängig sind. Einzige Ausnahmen sind die Leber und der GIT. Hier wird zuerst der GIT (alle drei Abschnitte nacheinander und mit einem etwaigen Nahrungspaket als externes Medium) berechnet und die ausfließenden Blutströme im hepatischen Portal mit dem arteriellen Blutstrom der Leber vermischt. Erst danach erfolgt die Berechnung der Austauschprozesse der Leber.

In dem fünften und letzten Abschnitt werden alle aus den Organen ausfließenden Blutströme im venösen Blut-Pool gesammelt und mit dem im Pool vorhanden Blut gemischt. Auch hier wird auf die Differenzierung der Konzentrationen zwischen festen und wässrigen Phasen geachtet. Nach Abschluss aller Abschnitte werden alle Randbedingungen erneuert und gegebenenfalls ersetzt. Alle Ergebnisse werden gespeichert (nach Bedarf zusätzlich ausgelagert) und die nächste Iteration beginnt.

3.2 Modell Validierung

Die Modell-Validierung erfolgt in zwei Schritten. Als erstes wird die Aufnahme über die Kiemen in Regenbogenforellen simuliert und anhand von experimentellen Datensätzen verglichen. Da die Equilibrium-Konzentration aus Expositionskonzentration und dem Verteilungskoeffizienten Wasser/Körper errechnet werden kann, ist ein Vergleich von kinetischen Parametern notwendig. Dazu wird vor allem ein Vergleich der Aufnahme-Effizienz von McKim et al (McKim, Schmieder, and Veith 1985) herangezogen, da es der wichtigste Parameter für die Aufnahme und Elimination über die Kiemen ist. Diese Validierung des Modells wurde bereits in Larisch et al. 2017 veröffentlicht (Larisch und Goss, 2017).

Als zweites erfolgen Simulationen mit kontaminierter Nahrung, die ebenfalls mit experimentellen Daten verglichen werden. Dazu ist vorab eine Abschätzung des zellengebundenen Transportes notwendig. Diese Validierung wurde ebenfalls veröffentlicht (Larisch und Goss, 2018b).

3.2.1 Aufnahme über die Kiemen

Um die Aufnahme über die Kiemen zu validieren, vergleichen wir unsere Simulationen mit Daten aus zwei verschiedenen Studien: McKim et al (McKim, Schmieder und Veith, 1985) und Adolfson-Ericci et al (Adolfsson-Erici, Åkerman und McLachlan, 2012). In beiden Studien wurden Regenbogenforellen unterschiedlicher Größe und Alters verwendet. Dies wurde durch die allometrische Skalierung kompensiert. Physiologische Werte, die explizit von den Autoren gemessen und angegeben wurden, ersetzen dabei die generierten physiologischen Werte. Dies betrifft vor allem den Lipidgehalt der Individuen. In jedem der in den Studien beschriebenen Experimente wurden die Individuen nur über das Wasser kontaminiert.

I - Aufnahmeeffizienz In der Studie von McKim et al (McKim, Schmieder und Veith, 1985) wurden 14 verschiedene Substanzen (davon zwei ionische Substanzen die nicht simuliert werden konnten) in einem $\log K_{OW}$ Bereich von 0.2 bis 7.5 an ca. 750g Regenbogenforellen exponiert. Nach etwa einer Stunde wurden die Individuen auf ihre Gesamtkörperkonzentration gemessen und eine Aufnahme-Effizienz errechnet. Dabei haben sie eine Ventilationsrate von 117 ml/min (bei 11° C Wassertemperatur) gemessen, die hier berücksichtigt werden muss. Die effektive Ventilationsrate (auch Respirationsrate genannt) entspricht der Menge an Wasser, das durch die Kiemen gepumpt wird, das nah genug an der Kiemenoberfläche vorbei gelangt, um in einen effektiven Austauschprozess zu treten. Diese Respirationsrate ist, entsprechend des Anteils an zu weit weg fließendem Wasser, kleiner als die Ventilationsrate. Mittels Experimenten zur Sauerstoffaufnahmeeffizienz konnte festgestellt werden, dass dieser Wert etwa 70% der Ventilationsrate bei Regenbogenforellen entspricht (Erickson und McKim, 1990; Gehrke, 1987; Hughes, 1966). Für kleine Fischarten bzw. inaktiver, wie bspw. Guppys, kann er aber auch noch kleiner sein (60%), (Erickson und McKim, 1990; Hughes, 1966). Daher wird im Model eine Respirationsrate von 81.9 ml/min verwendet.

McKim definierte die Aufnahmeeffizienz als den Anteil der Substanzmenge, die aufgenommen wurde N_{upt} [mol/min] gegenüber der Substanzmenge, die durch die Ventilationsrate in die Kiemen geflossen ist N_{resp} [mol/min]. Da er die Ventilationsrate verwendete, müssten seine Werte ein natürliches Maximum von ca. 70% nicht überschreiten dürfen. Dies entspräche 100% der Respirationsrate. Tatsächlich ist diese Obergrenze in seinen Werten gut zu erkennen (siehe Abbildung 3.8). Da die Aufnahmeeffizienz ein relativer Wert ist, spielt die exakte Expositionskonzentration hier keine Rolle.

Im Modell kommt die Aufnahmeeffizienz als Parameter nicht explizit vor. Vielmehr ist es eine Mischung aus der Permeabilität, der Respirationsrate, dem Blutfluss in den Kiemen und dem Konzentrationsgradienten von Wasser zu Kiemengewebe (bzw. Gesamtkörper des Individuums). Sie kann aber mittels desselben Ansatzes ausgerechnet werden (wobei darauf zu achten ist, dass die Ventilationsrate verwendet werden muss). Die simulierten Werte für die Effizienz stimmen dabei sehr gut mit den Gemessenen überein. Eine Liste aller hier benutzten Substanzen und ihre verwendeten Verteilungskoeffizienten finden Sie im SI der Publikation Larisch, Brown und Goss 2017 (Larisch, Brown und Goss, 2017).

Wie bereits beschrieben ist die Aufnahmeeffizienz mechanistisch eine Mischung aus verschiedenen Prozessen, unter anderem dem Konzentrationsgradienten. Dieser wird mit der Zeit (und damit zunehmender Sättigung des Kiemengewebes und des

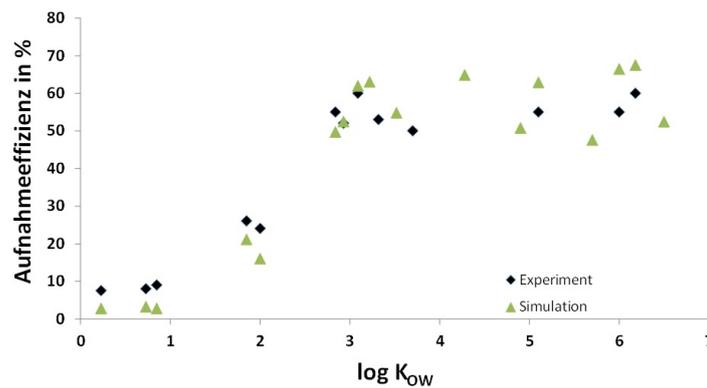


ABBILDUNG 3.8: Aufnahmeeffizienz über $\log K_{OW}$ (nach Larisch, Brown und Goss, 2017). Blau: McKim et al. Grün: Simulationsergebnisse.

gesamten Körpers) abnehmen. Folglich muss auch die Aufnahmeeffizienz mit der Zeit abnehmen. Dieses Verhalten beobachtet auch McKim bereits in seiner Studie (siehe Abbildung 3.9). Die entsprechenden Werte bzw. deren Verlauf konnten ebenfalls in der Simulation nachgestellt werden.

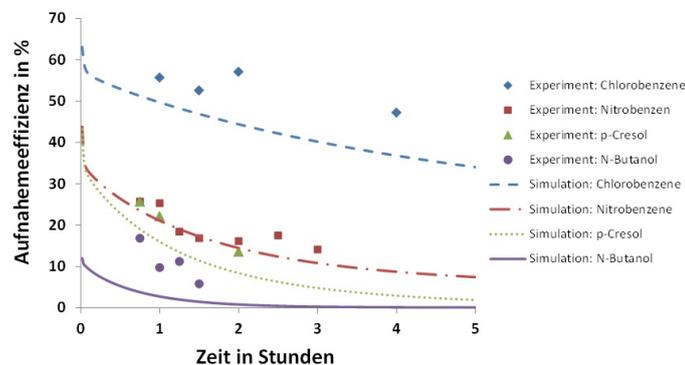


ABBILDUNG 3.9: Zeitabhängigkeit der Aufnahmeeffizienz für vier verschiedene Substanzen (nach Larisch, Brown und Goss, 2017).

II - Bioakkumulation und Wachstum Adolfsson-Erici et al. (Adolfsson-Erici, Åkerman, and McLachlan 2012) haben in ihrer Studie zur Bioakkumulation mehrere Substanzen an 45g Regenbogenforellen exponiert. Da nur die Aufnahme über die Kiemen validiert werden soll, wurden daraus zwei Substanzen ausgewählt, bei denen keine Biotransformation (Metabolismus) zu erwarten ist: Hexachlorobenzol (HCB) und Pentachlorobenzol (PCB). Die Physiologie musste neben dem Gewicht noch an ein Fisch-Lipid-Gehalt von 6.8% und eine Wassertemperatur von 13°C angepasst werden. Die entsprechenden Verteilungskoeffizienten finden Sie wieder im SI der Publikation Larisch, Brown und Goss 2016 (Larisch, Brown und Goss, 2017).

Da die Studien über einen Zeitraum von 80 Tagen stattfanden, wuchsen die Individuen kontinuierlich, was zu einer Verdünnung im Körper führt. Dies kann fälschlich als Eliminationsprozess gedeutet werden. Das durchschnittliche Wachstum betrug 1.1ml/Tag. Da der Einfluss des Wachstums auf die Konzentration weitläufig bekannt ist und bei der Auswertung von Bioakkumulationsstudien standardmäßig mit eingerechnet wird (OECD, 2012b), wird hier auf eine explizite Validierung des Wachstums als einzelner Prozesses verzichtet.

Die Expositions-Szenarien gestalteten sich dabei wie folgt: Hexachlorbenzene - 0.0665 $\mu\text{g}/\text{L}$ innerhalb der ersten 9 Tage, 0.081 $\mu\text{g}/\text{L}$ zwischen dem 9. und 14. Tag, 0.052 $\mu\text{g}/\text{L}$ vom 14. zum 24. Tag und 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ während der clearance phase vom 24. zum 85. Tag. Pentachlorobenzen - 250 $\mu\text{g}/\text{L}$ innerhalb der ersten 4 Tage, 160 $\mu\text{g}/\text{L}$ zwischen dem 4. und 9. Tag, 135 $\mu\text{g}/\text{L}$ vom 9. zum 14. Tag und 64 $\mu\text{g}/\text{L}$ vom 14. zum 24. Tag. 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ während der clearance phase vom 24. zum 85. Tag.

Die allometrische Skalierung der Ventilationsrate nach West et al. (West, Brown und Enquist, 1997), der diese für verschiedene Säugetiere aufstellte und entsprechend für Lungen einen Skalierungsfaktor von $\frac{3}{4}$ annahm, kommt für einen 45g Fisch auf einen Ventilationsrate von gerade einmal 11.7 ml/min. Vergleicht man diesen Wert mit den experimentellen Ergebnissen aus Adolfsson-Erici (siehe Abbildung 3.10) so stellt man fest, dass selbst bei einer maximal Aufnahmeeffizienz von 70% dieser Wert nicht ausreicht um die gemessenen Werte zu erreichen. Extrapoliert man unter der Annahme einer maximalen Aufnahmeeffizienz von 70% so erhält man einen Wert von ca. 57ml/min als notwendige Ventilationsrate. Unter der Annahme einer solchen Ventilationsrate (entsprechend kleinere Respirationsrate) stimmen die simulierten Daten hervorragend mit den experimentellen Werten überein.

Dabei lässt sich im Modell der Einfluss des Wachstums auf die Eliminationskurve sehr einfach darstellen, indem eine zusätzliche Simulation ohne Wachstum angesetzt wird (siehe Abbildung 3.11). Diese zeigt deutlich, dass die Elimination von HCB von dem Verdünnungseffekt des Wachstums dominiert wird.

3.2.2 Aufnahme über den GIT

Um die Aufnahme über den GIT zu validieren, vergleichen wir unsere Simulationen erneut mit Daten aus zwei verschiedenen Studien, hier: Nichols 2004 (Nichols u. a., 2004b) und einem OECD Ringtest aus 2011. Bei beiden Studien handelt es sich um Aufnahmestudien über die Nahrung. Da für die Aufnahme aus der Nahrung eine Abschätzung der Micell Facilitation gemacht werden muss, wird darauf im Folgenden noch eingegangen.

I – Abschätzung des Mizellen Facilitation Faktors Um die Transportprozesse von Substanzen, die an Mizellen gebunden die innere Darmwand-ABL durchqueren, abschätzen zu können, steht uns bislang nur eine Quelle zur Verfügung (Westergaard und Dietschy, 1976b). In dieser Quelle wird ein Beschleunigungs-Faktor aufgelistet, der den Effekt des Transportes im Verhältnis zur normalen Diffusion angibt. Mittels einer Tabelle, die diese Werte beinhaltet, wird eine (nicht sehr fundamentale) Korrelation mittels der Löslichkeit der Substanz möglich gemacht (Larisch und Goss, 2018a).

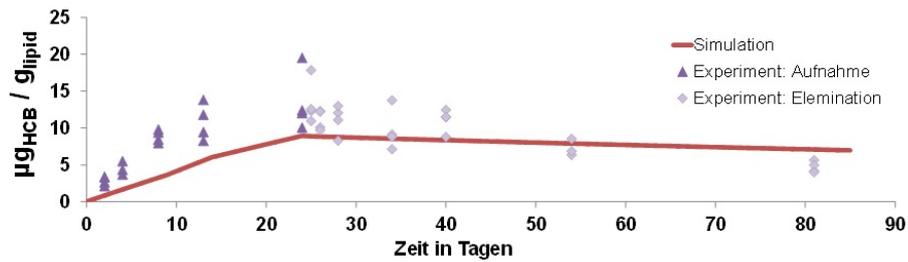
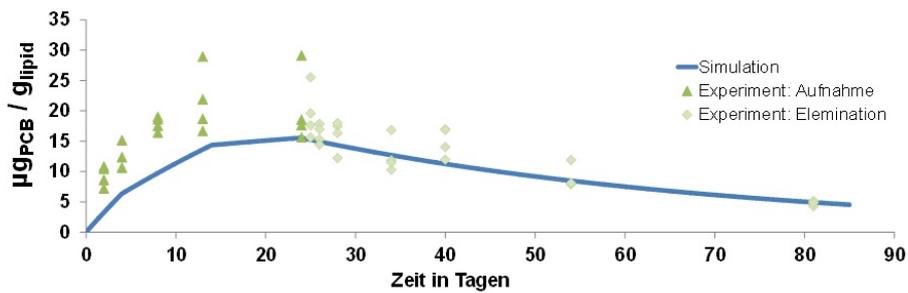


ABBILDUNG 3.10: Werte aus Adolfsson-Erici et al. 2012 im Vergleich mit den Simulationen des Modells (nach Larisch, Brown und Goss, 2017). Oben: Pentachlorobenzene (PCB), Unten: Hexachlorobenzene (HCB)

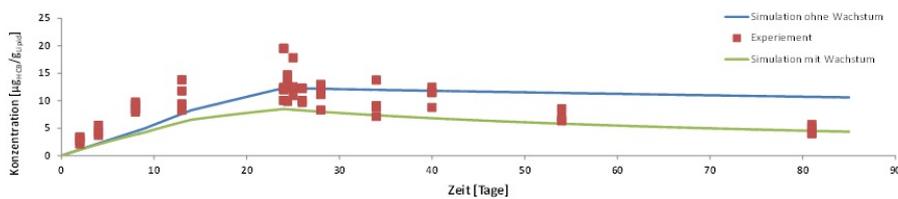


ABBILDUNG 3.11: Simulation des Experiments nach Adolfsson-Erici et al. Vergleich des Konzentrationsverlaufs mit und ohne Wachstum (Larisch, Brown und Goss, 2017).

Hierbei gilt es jedoch die Löslichkeit in unterkühlter Flüssigkeit zu verwenden. Neben wenigen Datenquellen (zB. das Buch von Schwarzenbach (Schwarzenbach, Gschwend, and Imboden 1993) und auch nur noch in der Auflage von 1993 – spätere Auflagen haben entsprechende Tabellen nicht mehr zum Inhalt), die eine solche Löslichkeit angeben, ist eine Berechnung/Abschätzung wünschenswert. Dazu benutzen wir das Paper von Liu et al 2013 (Liu u. a., 2013), in dem entsprechende Gleichungen angegeben sind, um eine Löslichkeit in unterkühlter Flüssigkeit aus der ‚normalen‘ Wasserlöslichkeit einer Substanz zu berechnen:

$$S_{i,subcooledliquid} = \frac{S_{i,solid}}{f^{solid}/f^{liquid}} \quad (3.8)$$

$$\ln \frac{f^{solid}}{f^{liquid}} = \frac{\Delta H_m}{R * T_m} * \left(\frac{T_t}{T} - 1 \right) \quad (3.9)$$

$$\Delta H_m = T_m + \Delta S_m \quad (3.10)$$

- $S_{i,Sub}$ (mg/ L) Ist die Löslichkeit in unterkühlter Flüssigkeit

- S_i (mg/ L) Ist die Wasserlöslichkeit
- f^{solid} Fugazität des Feststoffes
- f^{liquid} Fugazität der unterkühlten Flüssigkeit
- ΔH_m (kJ /mol) Schmelz-Enthalpy am der triple Punkt Temperatur T_t
- T_t (Kelvin) Triple Punkt temperatur (in etwas gleich der T_m)
- T (Kelvin) Die System Temperatur
- R (kJ/ mol*K) Die universale Gaskonstante
- T_m (Kelvin) Schmelztemperatur der Substanz
- ΔS_m (kJ /mol*K) Schmelz-Entropy (ist näherungsweise eine Konstante mit 56.5 kJ/mol*K)

Die in Westergaard und Dietschy angegebene Tabelle enthält die Werte der gemessenen Beschleunigung bei der Aufnahme aus der Nahrung von Fatty Acids in Anwesenheit von Bile Micells im Vergleich zu deren Abwesenheit. Hierbei ist ebenfalls die Löslichkeit der jeweiligen Fatty Acid angegeben.

Ein Plot der Facilitation über die Solubility zeigt einen interessanten Verlauf, der genutzt werden kann. Dieser ist mechanistisch jedoch nicht beschreibbar. Ein Fit über alle Daten liefert ein eher schlechtes Ergebnis (siehe Abbildung 3.12). Da die Werte nahe 1 uninteressant sind, konzentrieren wir uns hier auf die hohen Facilitation Werte (siehe Abbildung 3.13).

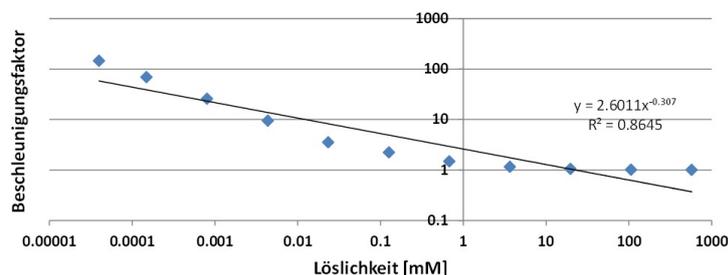


ABBILDUNG 3.12: Plot des Beschleunigungsfaktors über die Löslichkeit.

Ein Fit mit eingeschränktem Datensatz ab Löslichkeitswerten von 0.02 und damit verbundenen Facilitation-Werten größer als drei ergibt einen zufriedenstellenden Fit : $y = 0.3972x^{-0.584}$; $R^2 = 0.9999$. Dies scheint gerechtfertigt, da der Fit stark beeinflusst wird von den niedrigeren Facilitation-Werten (Fac kleiner als 3), diese jedoch sehr ungenau in der Messung sind und damit den Fit unnötig verschlechtern.

Westergard und Ditschy hatten keine Angabe gemacht, ob es sich bei den von ihnen verwendeten Löslichkeiten um die realen Löslichkeiten oder die unterkühlten Löslichkeiten handelt. Da die kleinen Fettsäuren bei Raumtemperatur flüssig sind, müssen deren Löslichkeiten die der Flüssigkeit sein. Da ein Plot der Löslichkeiten gegen die C-Zahl der jeweiligen Säure keinen Knick zeigt (Abbildung 3.14), obwohl die Säuren bei mehr als acht C-Atomen als Feststoff vorliegen, müssen sich offenbar alle verwendeten Löslichkeiten auf die unterkühlte Flüssigkeit beziehen. D.h. bei Verwendung dieser Tabelle sollten immer Löslichkeiten der unterkühlten Flüssigkeiten verwendet werden.

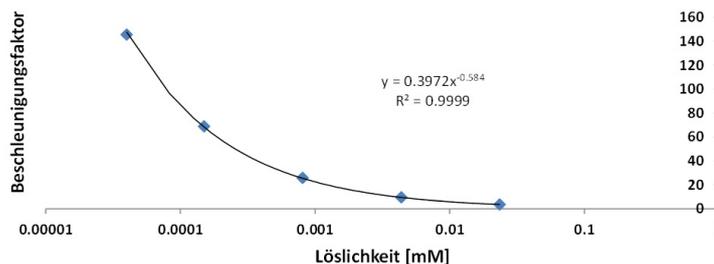


ABBILDUNG 3.13: Verbesserter Fit für spätere Extrapolation.

Insgesamt werden fünf Eingabe-Parameter benötigt: die normale Wasserlöslichkeit, die Triple-Punkt Temperatur, die Schmelztemperatur, die im Zielsystem vorherrschende Temperatur und das Molekulargewicht der Substanz. Im Paper von Liu et al. ist angegeben, dass Triple-Punkt und Schmelztemperatur in etwa gleich groß seien. Daher kann eines von beiden verwendet werden, sollten nicht beide Parameter zur Verfügung stehen. Die Schmelzentropie sowie die relative Gaskonstante sind oben angegeben.

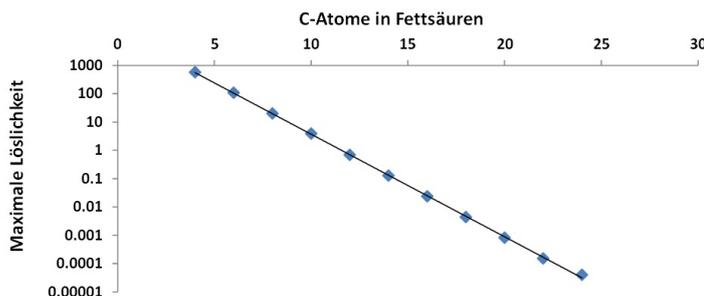


ABBILDUNG 3.14: Plot der Löslichkeit über die Anzahl in der Substanz enthaltener Kohlenstoffatome (nach SI - Larisch und Goss, 2018a).

Mittels der Gleichungen von Liu et al. werden aus der Schmelzentropie und der Schmelztemperatur die Tripel-Punkt Enthalpie berechnet (ΔH_m), mittels derer der logarithmische Fugazitäts Quotient berechnet werden kann ($\ln(f^{solid}/f^{liquid})$). Dieser Quotient entspricht dem logarithmischen Löslichkeitsquotient ($\ln(S^{solid}/S^{liquid})$). Diese muss nun noch mittels des Molekulargewichts auf die Einheit mM (millimolar) gebracht werden und man kann danach durch die aus den Werten von Westergaard und Dietschy abgeleitete Formel einen Micellenbeschleunigungsfaktor extrapolieren. Da der Fit der Daten nur einen kleinen Bereich der Facilitation-Faktoren abdeckt, ist die entsprechende Extrapolation mit Vorsicht anzuwenden. Wie groß etwaige Abweichungen sein können, ist aus den gegebenen Daten nur schwer abzuschätzen.

II – Verdauungseffizienz und Aufnahme Die erste Validierung erfolgt mit den Daten aus Nichols 2004 (Nichols u. a., 2004b). Dort wurde eine mit PCB52 kontaminierte Dickkopfelritze (*engl.: fathead minnow*) an etwa 100g schwere Regenbogenforellen verfüttert (ca. 4% ihres Körpergewichtes als Futter). Diese wurden dann in bestimmten Zeitabständen auf ihre internen Konzentrationen hin gemessen (Zeitpunkte der Messung: 6h, 12h, 24h, 48h und 96h). In der Studie wurde ebenfalls eine Verdauungseffizienz von 91% für Lipide angegeben. Da diese die Haupt-Sorptionsphase für PCB52 darstellt wurde dieser Wert für die gesamte Nahrung angenommen. Dabei ist besonders interessant, dass über den Zeitraum der 48 h Verdauung das Volumen des Darminhalts von drei verschiedenen Darmabschnitten (Stomach, upper and lower testines) gemessen wurde. Dies ermöglicht uns eine Anpassung an das vorliegende Verdauungsverhalten. Dabei fällt auf, dass der Großteil der Nahrungsreduzierung im Magen stattfindet und danach das Volumen der restlichen Nahrung nahezu konstant innerhalb der einzelnen Darm-Abschnitte bleibt. Um dieses Verhalten nachzustellen, wurden die Verdauungswerte in unserem Modell angepasst, um einen entsprechenden Verlauf zu erzeugen. Dabei können wir in den einzelnen Darm-Abschnitten jedoch nur lineares Verhalten abbilden (siehe Abbildung 3.15). Des Weiteren wird im Paper eine Reduktion des Lipid-Gehaltes auf 9% (am Ende der Verdauung) angegeben. Dies wird in unserem Modell ebenfalls berücksichtigt.

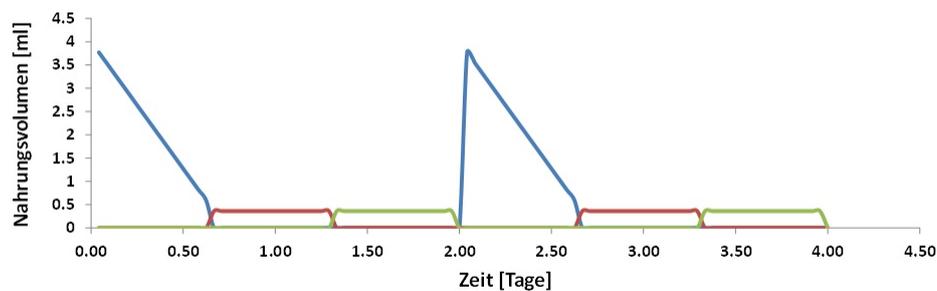


ABBILDUNG 3.15: Nahrungsvolumen über die Zeit in den drei Darm-Abschnitten des Modelles. Blau: Darm-Abschnitt eins, Rot: Darm-Abschnitt zwei und Grün: Darm-Abschnitt drei.

Mit dem abgeschätzten Mizellenbeschleunigungsfaktor für PCB52 von 30 konnten die gemessenen Werte einigermaßen gut nachgestellt werden. Es fällt auf, dass vor allem am Beginn der Aufnahmephase die experimentellen Werte weit höher liegen als die Simulierten. Dies lässt sich damit erklären, dass das Verdauungsverhalten im ersten Darmabschnitt nicht mit dem Experiment übereinstimmt. Eine hohe Verdauung im Magen führt zu einer sehr schnellen Reduktion des Volumens und damit verbunden einer Erhöhung der Konzentration in der verbleibenden Nahrung. Jedoch wird nach zwei Tagen (in diesem Fall entspricht dies der Verdauungszeit) die gemessene Konzentration erreicht. Auch im weiteren Verlauf stimmen Simulation und Experiment überein (siehe Abbildung ??). Die hier zu beobachtende Abweichung am Anfang ist also mit zunehmender Dauer eines Experimentes und sich wiederholender Fütterung unerheblich.

Auffallend ist, dass alle Konzentrationen der gemessenen Organe minimal unterschätzt wurden, bis auf das Muskelgewebe. Eine Überschätzung der darin vorzufindenden Konzentration bei gleichzeitiger minimaler Unterschätzung der Blutkonzentration ist nur auf eine Abweichung der berechneten Verteilungskoeffizienten zurückzuführen. Diese ist aber in den Grenzen der für pp-LFER angegebenen Genauigkeit (Larisch und Goss, 2018a).

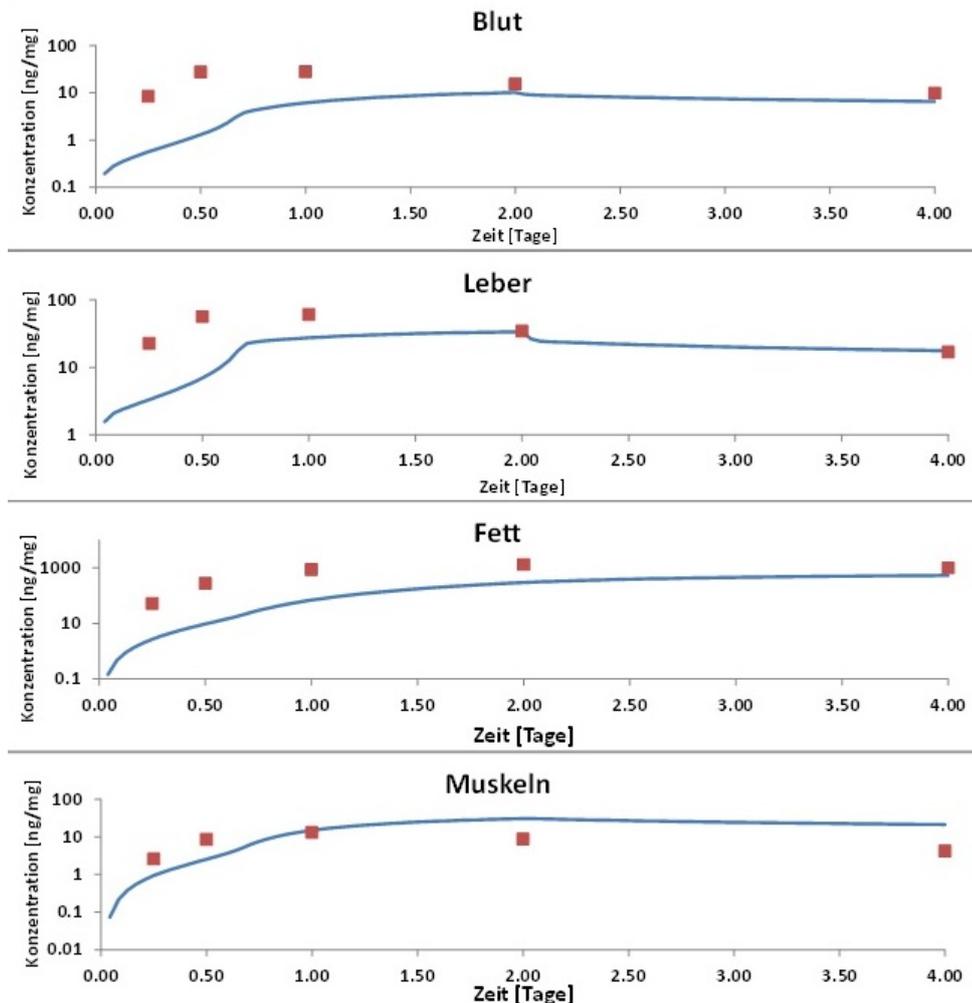


ABBILDUNG 3.16: Konzentrationen in verschiedenen Organen (nach Larisch und Goss, 2018a). Punkte: Daten aus Nichols et al. 2004 (Nichols u. a., 2004b), Linien: Simulationsdaten.

III – Aufnahme und Elimination (unter Einfluss von Wachstum) Für eine zweite Validierung werden Daten aus einem OECD Ringtest herangezogen. Darin wurden Regenbogenforellen in verschiedenen Laboren unter möglichst gleichen Bedingungen den gleichen Substanzen exponiert. Die einzige dabei verwendete, nicht metabolisierende Substanz war erneut HCB (Hexachlorobenzol). Die Individuen bekamen kontaminierte Nahrung in etwa 3% ihres Körpergewichtes als Menge verabreicht. Nach 13 Tagen wurde auf nicht kontaminierte Nahrung umgestellt. Die Zusammensetzung der Nahrung sowie Startgewicht und Wachstum variierte zwischen den Laboren. Dies wurde bei der Parametrisierung des Modells berücksichtigt. Die Daten zeigen außerdem, dass der Lipidgehalt der Fische während der Experimente

um den Faktor zwei schwankte. Dies hat definitiv Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen, kann aber im Model nicht abgebildet werden. Der abgeschätzte Wert für den Mizellenbeschleunigungsfaktor beträgt 15.

Die simulierten Ergebnisse stimmen gut mit den experimentellen Daten überein (siehe Abbildung 3.17). Zu beachten ist, dass bereits innerhalb der experimentellen Werte eine nicht unerhebliche Streuung vorhanden ist.

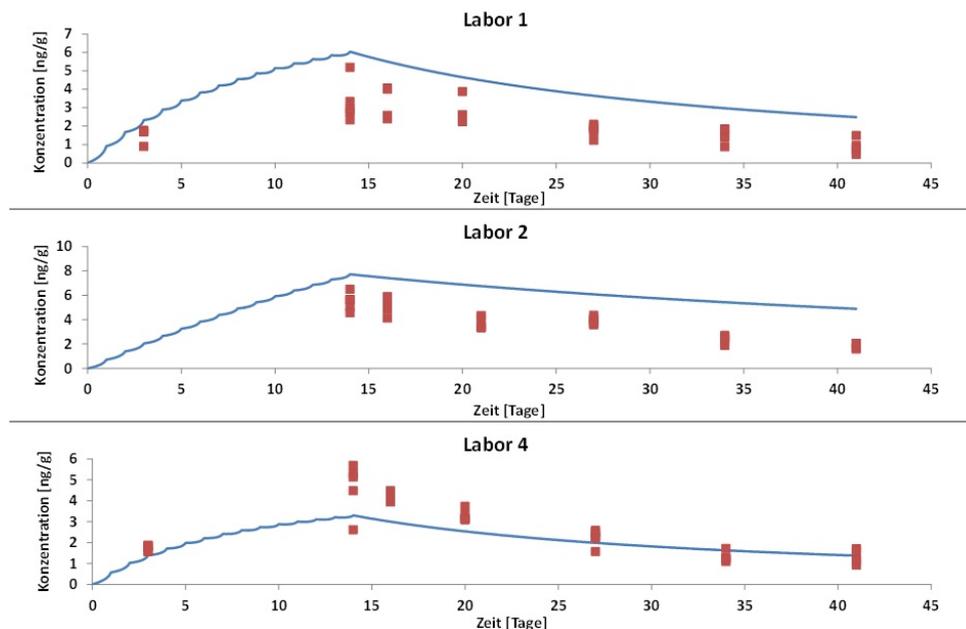


ABBILDUNG 3.17: HCB in Regenbogenforellen, gemessen in drei Verschieden Laboren (nach Larisch und Goss, 2018a).

3.3 Programmoberfläche

Dieser Abschnitt soll eine kurze Übersicht über die Benutzeroberfläche (eng.: User Interface - UI) des Programms geben und gleichzeitig eine Einweisung in die Handhabung darstellen. Dazu werden die einzelnen Oberflächen (Fenster), in der empfohlenen Reihenfolge besprochen und die wichtigsten Details erklärt. Dies stellt jedoch kein vollständiges Handbuch dar, da alle Einstellungsmöglichkeiten und ihre Auswirkungen auf die Simulation weit umfassender sind, als hier dargestellt.

3.3.1 PbTk Main UI

Dies ist das Hauptfenster des PbTk Programms. Von hier aus werden alle Schritte zum Einleiten und Auslesen einer Simulation unternommen. Der dahinterliegende Code verwaltet die Datenübergabe der einzelnen Fenster untereinander sowie die Simulation selbst. Das Schließen dieses Fensters während einer Simulation ist nicht zu empfehlen, sollte aber die Simulation selbst nicht automatisch abbrechen.

Die Oberfläche ist in vier Abschnitte unterteilt, die von oben nach unten der besten (wenn auch nicht einzigen) Reihenfolge zum Starten einer Simulation angelegt sind.

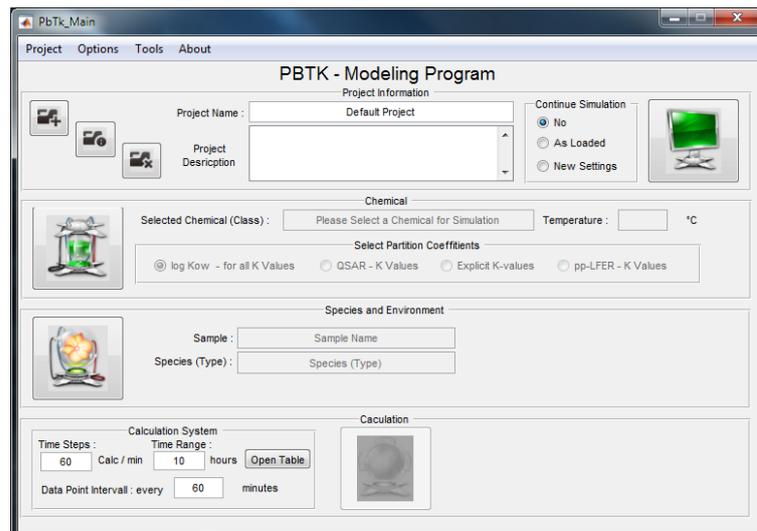


ABBILDUNG 3.18: Darstellung der Benutzeroberfläche des PbTk Main UI.

Der oberste Abschnitt ‚Project Information‘ dient zur Identifikation der Simulation und der dazugehörigen Daten. Der eingegebene Projektname wird beim Starten einer Simulation als Windows-Ordner angelegt (.../Simulations/ProjectName) und dient auch beim Öffnen der Daten als Projekt-Identifikator. So kann eine bereits abgeschlossene Simulation erneut aufgerufen werden, indem der entsprechende Projektname eingegeben wird und der Schalter ‚Show Simulation‘ (rechts) betätigt wird.

Alle Projektinformationen (Projektbeschreibung, verwendete Substanz sowie alle physiologischen Daten) können gespeichert (Schalter ‚Save Project‘ – links, mittig) sowie geladen werden (Schalter ‚Load Project‘ – links, oben). Die entsprechenden Daten werden in einem speziellen Windows-Ordner abgelegt (OrtDesProgrammes/ProjectData/ProjectName) und man kann sie von dort auch wieder abrufen. So können Simulationseinstellungen gespeichert werden, um sie später ggf. zu prüfen oder zu verändern, ohne vollkommen neu anzufangen.

Simulationen können weitergeführt werden, falls diese unterbrochen wurden. Das Panel ‚Continue Simulation‘ gibt dabei drei Möglichkeiten zur Auswahl:

- NO: Es ist keine weiterführende Simulation – ACHTUNG: Hat man bereits eine Simulation unter dem gleichen Projekt-Identifikator (und die entsprechenden Daten liegen noch immer im ‚Simulations‘-Ordner) würde das Programm im Falle eines Simulationsstarts alle neuen Daten an die bereits vorhandenen Daten anhängen. Dies ist jedoch sinnvoll, um zwei unterschiedliche Simulationen hintereinander zu legen und zu vergleichen.
- As Loaded: Das Programm lädt alle bereits vorhandenen Daten einer Simulation, die unter dem Projekt-Identifikator gefunden wurden, ein und führt sie mit dort gefundenen Werten (Randbedingungen) weiter. Somit kann eine Simulation fortgesetzt werden, falls es zu einer Unterbrechung gekommen ist.
- New Settings: Das Programm lädt alle bereits vorhandenen Daten einer Simulation, die unter dem Projekt-Identifikator gefunden wurden ein, aber setzt sie

unter den derzeit eingestellten Randbedingungen (Kontaminierung, Wachstum, Metabolismus etc.) fort. Auf diese Weise lassen sich zB. komplexe Szenarien nachstellen oder Einflüsse verschiedener Parameter im Vergleich betrachten.

Der zweite Abschnitt zeigt eine Übersicht über die gewählte Substanz (Name, Temperatur) und gibt die Möglichkeit verschiedene Arten von Verteilungskoeffizienten für die Simulation zu verwenden. Es stehen dabei nur jene Möglichkeiten zur Verfügung, die zuvor in dem Chemikalien-Fenster konfiguriert wurden. Dazu wird auf die Schaltfläche ‚Chemicals‘ (links in diesem Abschnitt) gedrückt, sodass sich besagtes Fenster öffnet (siehe Beschreibung- Chemical UI). Die automatische Einstellung nimmt immer den ‚bestmöglichen‘ Parameter-Datensatz (von rechts nach links absteigend), wobei die pp-LFER als beste angesehen werden (durch ihre Konsistenz mit Diffusionskoeffizienten und Temperaturanpassung).

Der dritte Abschnitt gibt eine Übersicht über die gewählte Spezies. Diese wird im physiologie Fenster erstellt, das mittels der Schaltfläche ‚Species‘ geöffnet wird (siehe Beschreibung- Physiological UI).

Der vierte und unterste Abschnitt beinhaltet die Einstellungen zur Simulation selbst. Hier können die Zeitschrittweiten (‚Calculation Step Width‘ - diese sollte ohne weiteres Wissen bei 60 gelassen werden!), die Simulationsdauer (Time Range) und die Speicherschrittweite (Data Point Intervall) festgelegt werden. Die Schaltfläche zum Starten einer Simulation (mittig) ist zu Beginn ausgegraut und inaktiv. Sie wird erst aktivierbar, wenn sowohl Substanz als auch Spezies definiert sind.

3.3.2 Chemical UI

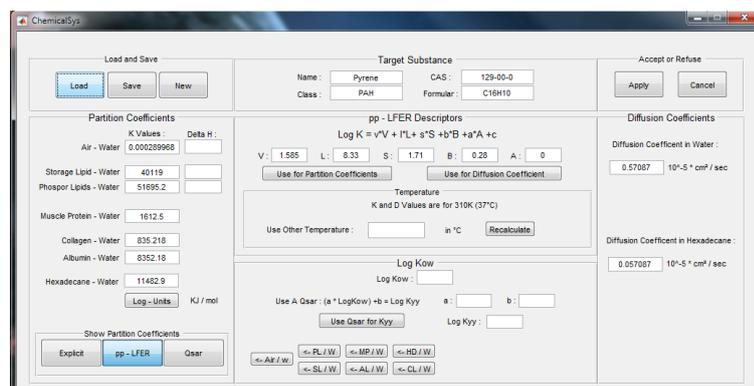


ABBILDUNG 3.19: Darstellung der Benutzeroberfläche des Chemical UI.

Nach dem Aktivieren der Schaltfläche ‚Chemicals‘ im Hauptfenster öffnet sich die Oberfläche der ‚ChemicalSys‘. Hier können die Eigenschaften der zu simulierenden Substanz definiert werden. Dabei werden vor allem die Verteilungskoeffizienten in alle sorbierenden Phasen (links) und die Diffusionskoeffizienten in Wasser und Hexadecane (rechts) benötigt.

Im Panel ‚Target Substance‘ (oberer Bereich, mittig) können allgemeine Informationen der gewünschten Substanzen eingetragen werden. Diese sind für die Simulation nicht zwingend nötig, helfen jedoch dem Nutzer bei der Auswertung. Links daneben befindet sich das Panel ‚Load and Save‘ in dem Substanzen als .mat Files abgespeichert oder geladen werden können („New“ löscht alle aktuellen Einträge). Rechts befinden sich Schaltflächen zum Akzeptieren oder Verweigern der aktuellen Eingaben (Panel ‚Accept or Refuse‘). Die Schaltfläche ‚Apply‘ nimmt dabei alle derzeitigen Einstellungen an und übergibt sie an die Main UI, während ‚Cancel‘ diese verwirft und somit etwaige vorherige Einstellungen bestehen bleiben.

Es gibt mehrere Möglichkeiten die Verteilungskoeffizienten bzw. Diffusionskoeffizienten zu definieren. Alle Parameter können von Hand eingetragen werden, insofern man diese zur Verfügung hat (Literaturquellen oder eigene Messungen etc.). Es gibt die Möglichkeit alle Verteilungskoeffizienten mittels QSAR's zu berechnen, die entweder auf dem Log Kow beruhen oder einem andere Parameter, der an dessen Stelle gesetzt wird. Die empfohlene Variante ist die Berechnung mittels der pp-LFER Deskriptoren. Diese erlaubt neben der zusätzlichen Berechnung der Diffusionskoeffizienten (Hills u. a., 2011) auch eine Anpassung an die Temperatur (Goss, 2006). Eine pp-LFER Datenbank mit weit über 3000 Substanzen und der Möglichkeit unbekannt Parameter zu extrapolieren, stellt dafür eine geeignete Datenquelle dar (Ulrich S.; Brown, T.N.; Watanabe, N.; Bronner, G.; Abraham, M.H.; Goss, K.-U., 2017).

Die verschieden berechneten Parameter werden auch als verschiedene Datensätze abgelegt. Diese können über die Schaltflächen unten rechts jeweils aufgerufen werden. In der MainUI werden alle eingegebene Datensätze zur Auswahl gestellt (siehe MainUI). Sollte der $\log K_{OW}$ als Verteilungskoeffizient ausgewählt werden, so wird nur dieser Wert als Verteilungskoeffizient für alle nichtwässrigen, sorbierenden Phasen benutzt.

3.3.3 Physiology UI

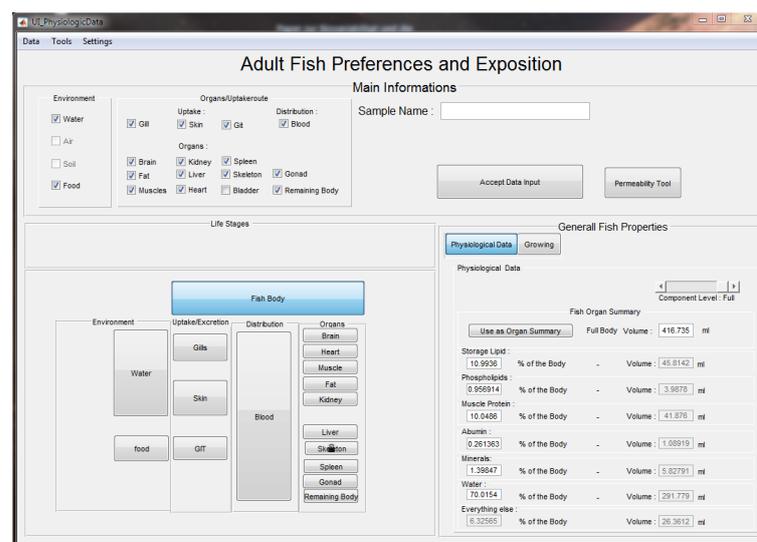


ABBILDUNG 3.20: Darstellung der Benutzeroberfläche des Physiology UI.

Durch das Aktivieren der Schaltfläche ‚Species‘ im Hauptfenster wird die Benutzeroberfläche zum Definieren der Spezies / des Individuums aufgerufen. Hier werden alle physiologischen Daten verwaltet.

Im oberen Bereich (Panel ‚Main Information‘) befinden sich kleine Schaltflächen über die einzelne Organe sowie die äußere Kompartimente zu oder abgeschaltet werden können. Nur aktiv geschaltete Kompartimente werden in der Simulation berücksichtigt (auch wenn inaktiven Kompartimenten Eigenschaften zugewiesen wurden). Der Samplename dient hierbei lediglich als eine Information für den Nutzer selbst und muss nicht ausgefüllt werden.

Da es sich um eine Vielzahl an Parametern handelt, wurde ein Einlesen aus einem speziellen Excel File ermöglicht (Oberes Menü -> Data -> Read from Excel). Dieses Excel File stellt zugleich die Schnittstelle zwischen der Anpassung der Physiologie und dem Modell selber dar. Alle allometrischen Skalierungen sowie Organanpassungen sollten im Excel File vorgenommen werden, da dadurch das Einlesen ins Modell schneller und weniger fehleranfällig ist.

Das Panel ‚General Fish Properties‘ gibt einen Überblick auf das definierte Individuum und seine Zusammensetzung. Der Slider ‚Component Level‘ (rechts mittig) erlaubt es, den Detailgrad der in der Simulation verwendeten Zusammensetzung zu verändern. So wird mit niedrigerem Detailgrad nicht mehr zwischen verschiedenen Lipiden und Proteinen unterschieden. Eine weitere Verringerung führt dazu, dass nur noch Lipide und Wasser verwendet werden.

Mit Aktivieren der Schaltfläche ‚Growing‘ kann ein etwaiges Wachstum eingestellt werden. Dabei kann zwischen einfachem linearem Wachstum und prozentualem Wachstum gewählt werden. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, mittels der Aktivierung des Kästchens ‚Adapt for all Organs‘ die Wachstums-Einstellungen für alle Organe zu übernehmen, dabei bleiben alle Organe in ihrem Verhältnis zum Gesamtkörper (% des Gesamt-Volumen).

Die Schaltfläche ‚Permeability Tool‘ öffnet eine weitere Oberfläche zum Berechnen der Permeabilitäten.

Alle aktivierten Organe sowie das Blut und die Blutflüsse können im Detail betrachtet und verändert werden. Dazu muss die Schaltfläche des gewünschten Kompartiments innerhalb des großen Panels links unten gedrückt werden.

3.3.4 Organ UI

Wird in der Physiologie UI die Schaltfläche für ein bestimmtes Organ benutzt, so öffnet sich das Fenster ‚Organ Properties‘. Dies gibt die aktuellen Daten des gewünschten Organs wieder. Es existiert nur eine programmierte Oberfläche, die jeweils die gewünschten Daten einliest (Objekt orientiertes Programmieren). Daher kann immer nur ein Organ gleichzeitig betrachtet werden.

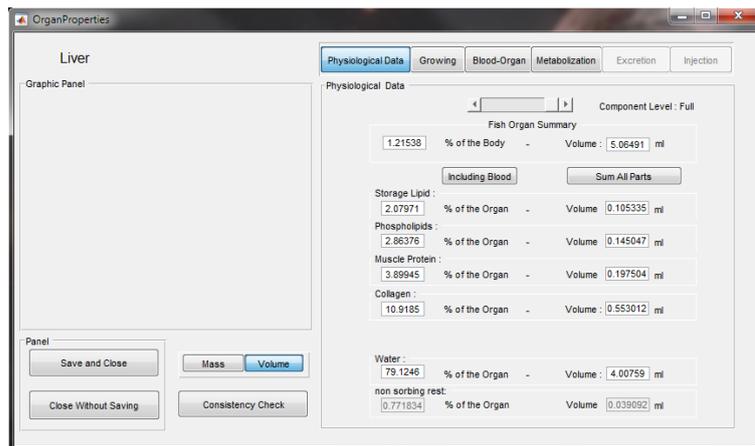


ABBILDUNG 3.21: Darstellung der Benutzeroberfläche des Organ UI.

Genau wie in der Physiologie UI wird hier (im rechten Teil) eine Zusammensetzung des Organs gezeigt (Panel ‚Physiological Data‘). Diese ist ebenso über den Slider ‚Component Level‘ verstellbar und hat die gleichen Auswirkungen auf die Simulation (werden weniger Details eingestellt, so werden auch weniger Details verwendet).

Im unteren Bereich (links) befinden sich Schaltflächen, die ein Umstellen der Zusammensetzung von ‚% Volumen‘ (Default) zu ‚% Masse‘ erlauben. Auch die Schaltflächen zum Annehmen des Datensatzes (bei Veränderungen) oder zum Verwerfen befinden sich dort.

Im oberen Bereich (rechts) befinden sich mehrere Schaltflächen nebeneinander. Diese bewirken, dass verschiedene Informationen / Einstellungsmöglichkeiten im darunterliegenden Panel angezeigt werden. Die automatische (Default) Einstellung sind die physiologischen Daten (‚Physiological Data‘).

Wird die Schaltfläche ‚Growing‘ aktiviert, so erscheint das ‚Growing‘ Panel. In diesem kann das Wachstum des Organs eingestellt werden. Dabei gibt es mehrere verschiedene Möglichkeiten. So kann ein Gesamtkörper unabhängiges Wachstum entweder linear oder prozentual erfolgen (Panel: Organ Specific Growing). Oder es kann ein Gesamtkörper abhängiges Wachstum eingestellt werden. Hierbei gibt es die Unterscheidung zwischen proportionalem Wachstum, bei dem die Volumen-Verhältnisse zum Gesamtkörper gleich bleiben (diese Einstellung würde verwendet werden, wenn man beim Gesamtkörper-Wachstum der Physiologie UI das Kästchen ‚Adapt all Organs‘ aktiviert) und beim allometrischen Wachstum.



ABBILDUNG 3.22: Panel ‚Growing‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.

Wird die Schaltfläche ‚Blood-Organ‘ aktiviert, so erscheint das ‚Blood-Organ‘ Panel. Hierin werden die Einstellungen des Blut-Kompartiments eines jeden Organs angezeigt. Dies betrifft das Blutvolumen, sowie die kapillare Oberfläche. Im unteren Bereich kann die spezifische Permeabilität für den Übergang zwischen Organ-Blut und Organ-Gewebe eingegeben werden. Alternativ kann dieser Wert über das Permeabilitätstool berechnet werden (das Tool speichert automatisch alle Werte – siehe Abschnitt Permeabilitätstool).

ABBILDUNG 3.23: Panel ‚Blood-Organ‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.

Wird die Schaltfläche ‚Metabolism‘ aktiviert, so erscheint das ‚Metabolism‘ Panel. Hier kann für jedes Organ ein Metabolismus eingestellt werden. Es gibt wieder mehrere mögliche Varianten. Generell wird zwischen zwei Kinetik-Typen unterschieden: Kinetik erster Ordnung (Panel: First Order Metabolism) und Michaelis Menten Kinetik (Panel: Michaelis Menten Metabolism). Wobei lediglich die Kinetik erster Ordnung wahlweise auf die gesamt Organ-Konzentration oder die frei-gelöste Konzentration (Wasser-Phase) angewendet werden kann. Die Michaelis-Menten-Kinetik wird immer auf die frei gelöste Konzentration bezogen.

ABBILDUNG 3.24: Panel ‚Metabolism‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.

Die Schaltfläche ‚Excretion‘ sollte nur dann aktivierbar sein, wenn es sich bei dem ausgewählten Organ um die Nieren handelt. Andernfalls bleibt es deaktiviert. Hier kann eine Urin-Fluss-Rate eingegeben werden. Dieser Fluss ist als Eliminationsprozess zu verstehen, da er im Gleichgewicht mit der Wasserphase der Nieren steht und somit Substanz aus dem Körper befördert. Die entsprechende Flussrate kann in zwei Varianten eingegeben werden: als feste Ratenkonstante oder in Abhängigkeit der Körpergröße (Volumen).

ABBILDUNG 3.25: Panel ‚Excretion‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.

Über die Schaltfläche ‚Injection‘ wird das ‚Injection‘ Panel aktiviert. Die hierin enthaltenen Einstellungen erlauben es Substanz direkt in ein Organ zu injizieren. Dabei kann entweder eine einmalige Injektion (one Injection) oder eine konstante Injektion (vergleichbar mit einem Tropf) ausgewählt werden. Die eingebrachte Stoffmenge wird dabei dem Organgewebe hinzugerechnet und wird sich von dort zuerst in das Organ-Blut und darüber in den restlichen Körper verteilen.

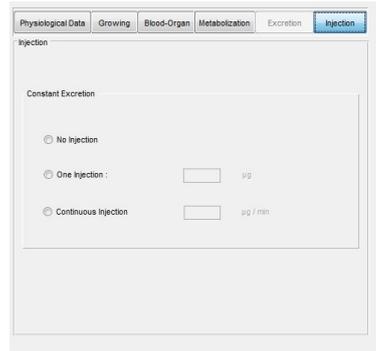


ABBILDUNG 3.26: Panel ‚Injection‘ der Benutzeroberfläche des Organ UI.

Eine Besonderheit ist das Organ Fenster für den Magen-Darm-Trakt (GIT). Hier gibt es zusätzlich die Möglichkeit, die Darmoberfläche einzustellen sowie deren Permeabilität. Diese Möglichkeit besteht auch für die Kiemen / Lunge und die Haut. Einzig bei dem GIT gibt es die Unterscheidung zwischen einem Einkompartiment GIT und einem Dreikompartiment. Wobei diese Auswahl nur möglich ist, wenn entsprechende Informationen mittels des Excel-Files eingelesen wurden. Per Hand kann diese Information derzeit nicht eingestellt werden, da auch die Vielfalt der möglichen Darmaufteilungen noch nicht sinnvoll eingegrenzt wurde. Dies ist zukünftiger Weiterentwicklung überlassen.

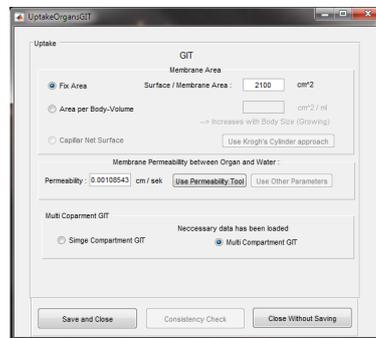


ABBILDUNG 3.27: Darstellung der speziellen Benutzeroberfläche des GIT.

3.3.5 Blood Distribution UI

Wird in der Physiologie UI das Blut ausgewählt, so wird ein etwas anderes Fenster geöffnet. In diesem kann neben der Zusammensetzung des Blutes auf der rechten Seite auch den Blutfluss (links, mittig) eingestellt werden.

Des Weiteren kann eine Desorptionsratenkonstante für eine etwaige Desorptions-/Adsorptionskinetik der Substanz an das Blut Albumin festgelegt werden. Diese hat zur Folge, dass Blut Plasma (die wässrige Phase des Blutes) und die Blut-Feststoffe (es werden dabei alle beteiligten Feststoffe betrachtet) nicht mehr zwingend miteinander im Gleichgewicht sind. Das kann Verzögerungen bei der Aufnahme von Stoffen (durch schlechteren Abtransport über das Blut) als auch bei der Elimination bewirken (Ausscheidung und Metabolismus).

Über die Schaltfläche ‚Injection‘ wird ein zusätzliches Panel sichtbar, in dem eine Injektion in den arteriellen Blutfluss angegeben werden kann (siehe Injektions-Panel bei Organen). Mit betätigen des ‚OK‘ Schalters verschwindet das Panel wieder.

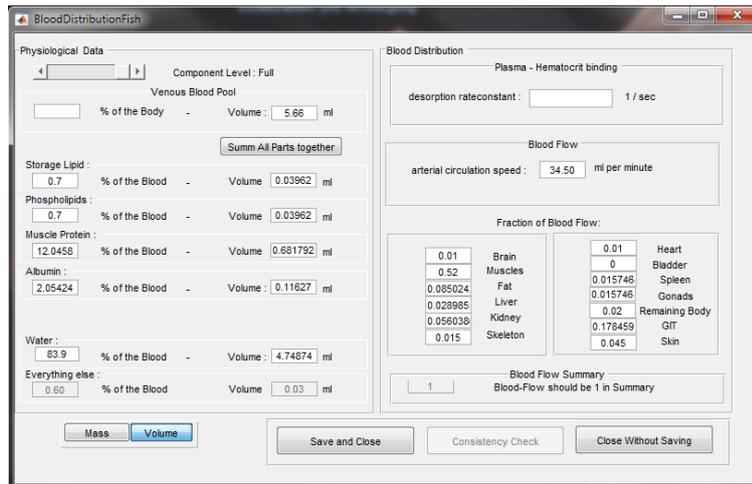


ABBILDUNG 3.28: Darstellung der Benutzeroberfläche des Blood Distribution UI.

Im rechten unteren Bereich befindet sich die Aufteilung des arteriellen Blutes auf die einzelnen Organe. Eine darunter liegende Box zeigt das Verhältnis des Gesamtflusses zu den Einzel-Flüssen an. Liegt der Wert bei eins ist der gesamte Blutfluss aufgeteilt. Ist der Wert kleiner als eins, so fließt eine bestimmte Menge Blut (entsprechender Fraktionsteil) nicht zu einem Organ. Ein solcher Blutfluss wird im Modell mitgeführt und ohne weitere Wechselwirkung wieder dem venösen Blut-Pool zugeführt. Somit ist eine Massenerhaltung garantiert. Sollte dieser Wert jedoch größer als eins sein, so wird mehr Blut auf die einzelnen Organe verteilt, als eigentlich zur Verfügung steht. Dies hat zur Folge, dass negative Blutvolumina entstehen können und damit die Simulation keine sinnvollen Ergebnisse mehr produzieren kann. Daher wird in einem solchen Falle eine Warnung ausgegeben, die den Nutzer auf diesen Fehler hinweist.

3.3.6 Wasser UI

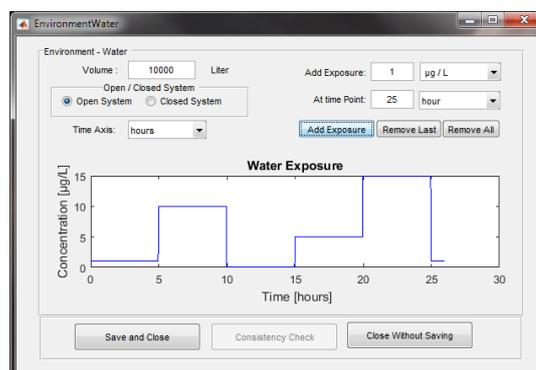


ABBILDUNG 3.29: Darstellung der Benutzeroberfläche des Wasser UI.

Mittels der Oberfläche für das Kompartiment des (das Individuum umgebenden) Wassers wird neben der Wassermenge auch die Exposition selbst eingestellt.

Auf der rechten Seite des Fensters befinden sich dafür Felder, in denen Konzentration und Zeitpunkt zum Einstellen der Konzentration angebracht sind. Wird die Schaltfläche ‚Add Exposure‘ betätigt, so wird die angegebene Expositionskonzentration zum angegebenen Zeitpunkt dem Exposure-Szenario hinzugefügt. Soll von Anfang an eine Exposition stattfinden, so wird dies mit dem Zeitpunkt ‚0‘ erreicht.

Alle Eingaben werden anhand ihrer Zeitpunkte gespeichert. Wird ein Zeitpunkt doppelt verwendet, so wird lediglich die letzte Eingabe benutzt. Mittels des ‚Remove Last‘ Schalters lässt sich die letzte Eingabe revidieren (falls diese eine vorherige Eingabe überschrieben hatte, wird diese wiederhergestellt). Auf diese Weise lassen sich beliebig komplexe Szenarien erstellen. Der ‚Remove All‘ Schalter löscht das gesamte Expositionsszenario.

Im oberen rechten Bereich gibt es die Möglichkeit zwischen einem offenen System („Open System“) und einem geschlossenen System („Closed System“) zu wählen. Hierbei bedeutet ein offenes System, dass das virtuelle Volumen unendlich groß ist, auch wenn eine Bezugsgröße vorgegeben werden muss (Volumen). Damit wird sich die eingestellte Konzentration nicht durch den Aufnahmeprozess in das Individuum ändern (sehr wohl jedoch durch das Expositionsszenario). Dies entspricht z.B. einem Durchfluss System mit kontrollierter Exposition oder einem Gewässer mit enormen Volumen im Vergleich zur Größe des Individuums. Im geschlossenen System hingegen ist die absolute Stoffmenge im gesamten System (Wasser+ Individuum) begrenzt. Damit kann die Aufnahme in das Individuum die Wasserkonzentration beeinflussen. Sollte dies entscheidenden Einfluss auf das Szenario haben, müssen etwaige Anpassungen des Expositionsszenarios beachtet werden.

3.3.7 Nahrungs UI

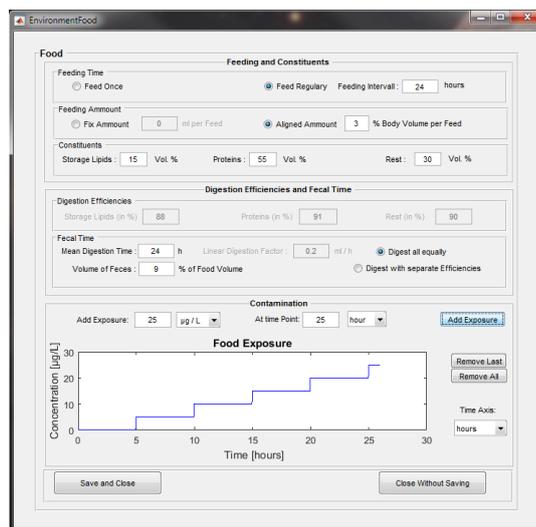


ABBILDUNG 3.30: Darstellung der Benutzeroberfläche des Nahrungs UI.

Im Wesentlichen kann hier, ähnlich der Wasser UI, ein Expositionsszenario für die Aufnahme über die Nahrung definiert werden. Dazu werden alle Schalter im

unteren Panel ‚Contamination‘ analog zur Wasser UI verwendet. Hinzu kommen jedoch nahrungsspezifische Einstellungen.

Neben den Einstellungen Zur Fütterungszeit (Panel ‚Feeding Time‘) muss die Nahrungsmenge (Panel ‚Feeding Ammount‘) sowie die Nahrungszusammensetzung (Panel ‚Constituents‘) definiert werden. Im mittleren Abschnitt ‚Digestion Efficiency‘ werden die Zeitpunkte zur Nahrungsausscheidung sowie die gesamte Verdauungseffizienz angegeben. Da alle dies Informationen enormen Einfluss auf eine Simulation haben können, sollte auf die Verwendung der Default Werte nur im Ausnahmefall zurückgegriffen werden.

3.3.8 Permeability Tool

Das Permeabilität-Tool ist ein Hilfskonstrukt, das eine schnelle Berechnung der benötigten Permeabilitäten ermöglicht. Dieses Tool ist sowohl in der Physiologie-UI als auch in der Main-UI aufrufbar.

Dabei werden die Permeabilitäten von neutralen/leicht polaren Substanzen beim diffusiven Durchgang durch Membranen und den wässrigen, nicht durchmischten Wasserschichten (Aquatic Boundary Layer – ABL) der Blutkapillaren und Austausch-Oberflächen (Lunge , Haut , Darm u.a.) berechnet

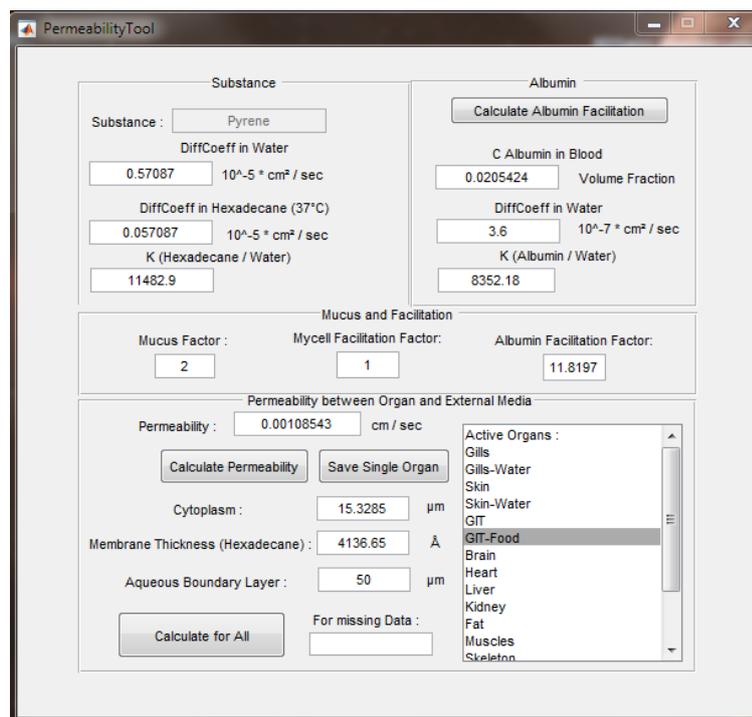


ABBILDUNG 3.31: Darstellung der Benutzeroberfläche des Permeability Tools.

Für eine einfache und schnelle Nutzung sollten Substanz und Spezies bereits vollständig eingegeben oder geladen worden sein. Die benötigten Daten werden automatisch eingelesen und etwaige Parameter berechnet. Einzig auf den ‚Mycell Facilitation Faktor‘ muss Acht gegeben werden (siehe Träger gebundener Transport).

Mit dem Button ‚Calculate for All‘ werden alle Permeabilitäten berechnet und das Tool kann geschlossen werden.

3.3.9 Progress Bar

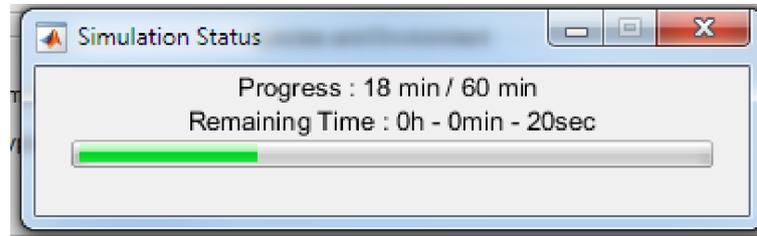


ABBILDUNG 3.32: Fortschrittsbalken der Simulation. Wird dieses Fenster während einer laufenden Rechnung geschlossen wird das Programm beendet.

Sind alle Einstellungen vorgenommen worden und die Schaltfläche ‚Start Simulation‘ im unteren Bereich der Main UI wurde betätigt, so erscheint ein Fortschrittsbalken. Auf diesem werden Informationen zum Simulationsstatus wiedergegeben.

Zu Beginn wird die Simulation initiiert und dies mit ‚Initialising‘ gekennzeichnet. Sollten Fehler innerhalb des Modells erkannt werden (bzw. auftreten) zB. durch fehlende Werte oder falsche Eingaben, so wird das Programm dies mit einem Warnsignal quittieren, wobei der Fortschrittsbalken beim Status ‚Initialising‘ verbleibt.

Ist die Initialisierung erfolgreich und die Simulation beginnt, so wird versucht, die verbleibende Zeit bis zum Ende abzuschätzen und anzuzeigen. Dies ist jedoch stark von der Rechnerauslastung abhängig, sodass es vereinzelt zu Abweichungen kommen kann.

Der Fortschrittsbalken ist im Programmcode unmittelbar mit der Simulationsschleife verknüpft. Dies hat zur Folge, dass, sollte der Fortschrittsbalken (aus versehen) gelöscht werden, die Simulation an dieser Stelle abbricht. Damit ist ein gezieltes Abbrechen einer Simulation möglich, ohne die verbleibende Zeit abwarten zu müssen oder alle Eingaben neu aufzusetzen (da alternativ nur die gesamte Programm-Instanz gelöscht werden kann).

3.3.10 Data UI

Wird im Hauptfenster die Schaltfläche ‚Show Simulation‘ betätigt oder wird eine eingeschaltete Simulation vollständig beendet (nicht abgebrochen), so wird das Fenster für die Datenanzeige geöffnet. Hier können bis zu drei verschiedene Datenkurven der Simulation gleichzeitig angezeigt werden.

Dazu wird zuerst ein Organ bzw. der gesamte Körper ausgewählt und danach die gewünschte Information. Dazu gehören unter anderem die Konzentrationen aller einzelnen sorbierenden Phasen in Blut und Gewebe sowie die Gesamtkonzentration.

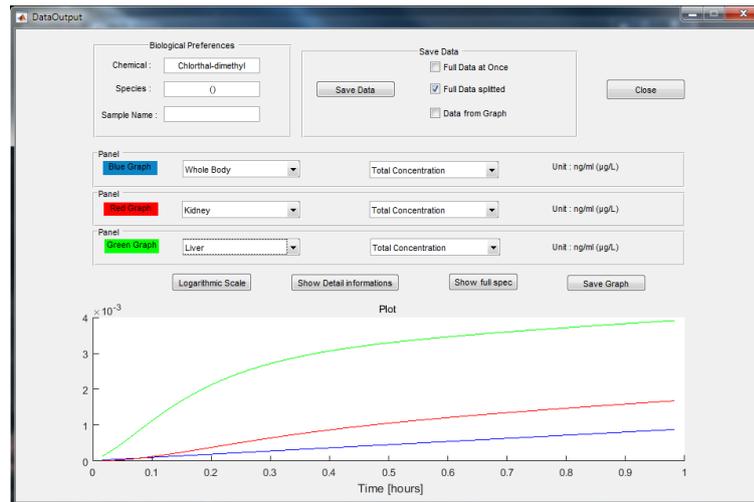


ABBILDUNG 3.33: Darstellung der Benutzeroberfläche des Data UI.

Auch Stoffmengen und ihre totale Änderung können ausgewählt werden. Zusätzlich bieten die Austauschorgane die Möglichkeit, sich den Stofftransport nach außen („External Mass Flow“) und zum Blut („Internal Mass Flow“) anzeigen zu lassen.

3.3.11 ASCII Files

Da alle Daten extern in ASCII Files gespeichert werden, ist eine Übertragung der Daten in andere Programme ohne weiteres möglich. Dabei werden in jedes File alle Daten Tabulator getrennt mit einer Genauigkeit von 15 Vor- und Nachkommastellen abgelegt. Eine Liste der einzelnen Spalten, die entsprechende Einheit sowie der im Programmcode verwendete Variablenname ist wie folgt:

- 1 - 14 : Organ General Information :
 - 01: Total Organ Volume (Blood + Tissue) [milli liters]
 - 02: Organ Tissue Volume [milli liters]
 - 03: Tissue Water Volume [milli liters]
 - 04: Tissue S-lipid Volume [milli liters]
 - 05: Tissue P-lipid Volume [milli liters]
 - 06: Tissue M-Protein Volume [milli liters]
 - 07: Tissue Collagen Volume [milli liters]
 - 08: Organ Blood Volume [milli liters]
 - 09: Organ Blood Flow [milli liters]
 - 10: Blood Water Volume [milli liters]
 - 11: Blood S-lipid Volume [milli liters]
 - 12: Blood P-lipid Volume [milli liters]
 - 13: Blood M-Protein Volume [milli liters]
 - 14: Blood Albumin Volume [milli liters]
- 15 - 35 : Substance Misbalances and Concentrations

- 15: Total Uptake of Chemical [mol]
- 16: Total Amount of Chemical [mol]
- 17: Total Concentration of Full Organ [mol/l]
- 18: Tissue Uptake of Chemical [mol]
- 19: Tissue Amount of chemical Full [mol]
- 20: Tissue Amount of chemical Fluid [mol]
- 21: Tissue Concentration in Full Tissue [mol/l]
- 22: Tissue Concentration in Water [mol/l]
- 23: Tissue Concentration in Storage - Lipids [mol/l]
- 24: Tissue Concentration in Phosphor - Lipids [mol/l]
- 25: Tissue Concentration in Muscle - Protein [mol/l]
- 26: Tissue Concentration in Collagen [mol/l]
- 27: Blood Uptake of Chemical [mol]
- 28: Blood Amount of chemical Full [mol]
- 29: Blood Amount of chemical Fluid [mol]
- 30: Blood Concentration in Full Tissue [mol/l]
- 31: Blood Concentration in Water [mol/l]
- 32: Blood Concentration in Storage - Lipids [mol/l]
- 33: Blood Concentration in Phosphor - Lipids [mol/l]
- 34: Blood Concentration in Muscle - Protein [mol/l]
- 35: Blood Concentration in Albumin [mol/l]
- 36 - 56 : Metabolite Misbalances and concentrations
 - 36: Total Uptake of Metabolite [mol]
 - 37: Total Amount of Metabolite [mol]
 - 38: Total Concentration of Full Organ [mol/l]
 - 39: Tissue Uptake of Metabolite [mol]
 - 40: Tissue Amount of Metabolite Full [mol]
 - 41: Tissue Amount of Metabolite Fluid [mol]
 - 42: Tissue Concentration c Full Tissue [mol/l]
 - 43: Tissue Concentration of Water [mol/l]
 - 44: Tissue Concentration of Storage - Lipids [mol/l]
 - 45: Tissue Concentration of Phosphor - Lipids [mol/l]
 - 46: Tissue Concentration of Muscle - Protein [mol/l]
 - 47: Tissue Concentration of div. [mol/l]
 - 48: Blood Uptake of Metabolite [mol]
 - 49: Blood Amount of Metabolite Full [mol]
 - 50: Blood Amount of Metabolite Fluid [mol]
 - 51: Blood Concentration of Full Tissue [mol/l]
 - 52: Blood Concentration in Water [mol/l]

- 53: Blood Concentration in Storage - Lipids [mol/l]
- 54: Blood Concentration in Phosphor - Lipids [mol/l]
- 55: Blood Concentration in Muscle - Protein [mol/l]
- 56: Blood Concentration in div. [mol/l]
- 57 - 60 : Additional Loss information
 - 57: Urination Loss of Chemical / Food Actual Number [mol]
 - 58: Urination Loss of Metabolite / Food Fecal Number [mol]
 - 59: Exchange Mass Outside. [mmol]
 - 60: Exchange Mass Inside. [mmol]

3.4 Performance und Code Optimierung

Für ein iterativ arbeitendes Modell, mit dem auch längere Simulationen unternommen werden sollen, ist die Rechengeschwindigkeit (seine Performanz) von enormer Bedeutung. Ist die Rechenzeit zu lang, können Simulationen nicht in vernünftiger Zeit beendet und ausgewertet werden. Ist die Rechenzeit zu variabel, sind Planungen für aufeinanderfolgenden Simulationen schwierig oder nicht sinnvoll. Daher wurde nach dem Validieren der einzelnen, mechanistischen Prozesse eine Verbesserung der Performanz angestrebt.

Die Geschwindigkeit, mit der ein Modell betrieben werden kann, hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen ist sie direkt abhängig von der Rechengeschwindigkeit des Rechners/Computersystems auf dem es betrieben wird. Da dies nicht quantifiziert werden kann, gelten alle nachfolgenden Angaben für ein System mit einem Intel Core i5-3470 (4-Kern-Prozessor mit 2.9GHz). Auf diesem System benötigte die Simulation einer virtuellen Stunde ca. 470 Sekunden (7min : 50sek).

Als ein weiterer Faktor kann die Parallelisierung des Programmes betrachtet werden: je mehr Prozesse parallel abgearbeitet werden können, desto schneller ist die Berechnung aller Prozesse fertig. Dies ist jedoch nicht in jedem Falle umsetzbar. In diesem Modell können auf Grund seines iterativen Aufbaus nur die internen Organe (da diese mit wenigen Ausnahmen voneinander unabhängig sind) parallel berechnet werden. Der Rechenaufwand für ein einzelnes Organ ist dabei recht gering, während das Zuweisen von Daten und Prozessoren auf die einzelnen Threads (Ausführungsstränge, die ein Prozessor abarbeitet), auch ‚Communication Overhead‘ genannt, auf Grund der notwendigen Datenmenge für die Berechnungen recht hoch ist. Die Einführung einer Parallelisierung der Programmstruktur führte daher zu einer Erhöhung der Rechenzeit (ca. um den Faktor 5). Daher wurde dies im Nachhinein verworfen.

Als letztes wurde die Verbesserung des Programmcodes in Hinblick auf effiziente Datenverwaltung und das Vermeiden von langsamen Strukturen begonnen. Dazu wurde der Matlab interne Profiler verwendet (siehe Abbildung 3.34). Dieser misst die Zeiten, die jede einzelne Zeile Quellcode im Programm benötigt und gibt einen guten Überblick über alle Funktionen und ihre Rechenzeit. Dabei wird zwischen der totalen Zeit, die eine bestimmte Funktion benötigt hat, und der ‚Eigen-Zeit‘ (Self Time) unterschieden. Letztere ist die Zeit, die für alle Zeilen innerhalb der Funktion

Function Name	Calls	Total Time	Self Time*	Total Time Plot (dark band = self time)
PbTk_Main>CalculationMainButton_Callback	1	251.184 s	0.006 s	
CalculationSys	1	251.178 s	0.001 s	
CalculationSys>Kinetic_Fish_Calculations	1	251.175 s	0.008 s	
CalculationSys>SimulationLoop_Fish_Adult	1	251.081 s	0.338 s	
CalculationSys>NameToOrgan_Library	586800	177.733 s	177.733 s	
CalculationSys>Fish_Body_Total	3600	161.176 s	0.380 s	
...ys>SumChemicalValues_OverAllOrgans	21600	81.675 s	4.304 s	
CalculationSys>PhaseValues_OverAllOrgans	18000	77.418 s	11.718 s	
CalculationSys>Exchange_BloodOrgan	36000	67.847 s	13.099 s	
CalculationSys>Phase_Distribution_Blood	126000	19.286 s	19.286 s	
CalculationSys>Exchange_Gill_WaterBlood	3600	10.251 s	1.911 s	
CalculationSys>SaveMatrixLine_Library	54000	6.886 s	6.886 s	
CalculationSys>Phase_Distribution_Organ	39600	6.116 s	6.116 s	
CalculationSys>Blood_Junction_Function	3600	4.847 s	0.465 s	

ABBILDUNG 3.34: Gesamtüberblick des Matlab Profiler. Gesamt verwendete Zeit pro Funktion und die Eigenzeit werden dargestellt und lassen sich vergleichen. Dieses Beispiel zeigt eine Simulation für 30 virtuelle Minuten bevor der Programmcode verbessert wurde.

nötig waren, die nicht auf eine andere Funktion zugreifen. Daraus lässt sich ableiten, dass Funktionen mit hoher Eigen-Zeit das größte Verbesserungspotenzial haben.

```

Function listing
time  Calls  line
3759 Function NewConcentrations = Phase Distribution Blood (TotalMass, OrganMap, OrganKey, OrganVolume)
3759 % This Function Calculates the Organ-intern Distribution of the Substance
3760 % In the Organ itself between interstitial-space-Water and Lipids,
3761 % Proteins and others.
3762 % Approximation that this process is instant an in steady state!
3763 % Actual Volume input includes Dilution due to growth!
3764 % Input of Ammount in mol -> output of Water Concentration in mol per liters
3765 % Organ Volume = ml | Concn = % | total Mass = mmol
3.10 126000 3766 Global K_m_l_w_K_pl_w_K_sp_w_K_ap_w
3767
3768 % Read Organ Contents and Calculate Content Volume Fractions
3769
0.02 126000 3770 if OrganKey(1) >=1
3.49 126000 3771     Volume_Water = OrganVolume * (OrganMap('Water_Content'))/100; % ml
2.70 126000 3772     Volume_StorageLipid = OrganVolume * (OrganMap('Storage_Lipid_Content'))/100; % ml
3773
0.02 126000 3774     if OrganKey(1) >=2
2.60 126000 3775         Volume_MuscleProteine = OrganVolume * (OrganMap('Muscle_Proteine_Content'))/100; % ml
3776
0.02 126000 3777     if OrganKey(1) >=3
2.59 126000 3778         Volume_PhosphorLipid = OrganVolume * (OrganMap('Phosphor_Lipid_Content'))/100; % ml
2.57 126000 3779         Volume_Albumin = OrganVolume * (OrganMap('Albumin_Content'))/100; % ml
3780
3781         Volume_PhosphorLipid = 0;
3782         Volume_Albumin = 0;
0.01 126000 3783     end
3784

```

ABBILDUNG 3.35: Matlab-Profiler in der Funktionen-Darstellung. Sehr Zeitintensive Zeilen werden automatisch Rot dargestellt.

Zusätzlich werden innerhalb aller Funktionen die einzelnen Zeilen mit den jeweiligen Rechenzeiten (und der Anzahl an Aufrufen – ‚Calls‘) dargestellt. Zeilen die im Verhältnis zur Funktion besonders lange benötigen, werden rot unterteilt (siehe Abbildung 3.35). In diesem Beispiel ist zu erkennen, dass das Verwenden von globalen Variablen (Variablen, die von jeder Funktion benutzt und verändert werden können) sowie von ‚Maps‘ als Datencontainer (einem Bezugswort wird dabei die entsprechende Variable zugeordnet und bei Aufruf ausgegeben) vergleichsweise viel Rechenzeit benötigt. Daraufhin wurde die gesamte Zuordnung von Daten von globalen Variablen und Maps auf ein ‚Struct‘ umgestellt, dass alle Informationen beinhaltet.

Auf diese Weise wurden nacheinander Schwachstellen / nicht performanten Stellen im Programm gefunden und behoben. Der verbesserte Programmcode erreichte dabei eine durchschnittliche Rechenzeit von 21.3 Sekunden pro simulierter, virtueller Stunde. Dies entspricht einer Verbesserung um den Faktor 22. Mit diesem Durchschnittswert können nun Simulationen und ihre benötigte Rechenzeit abgeschätzt werden.

Kapitel 4

Diskussion

Die Validierung der einzelnen Prozesse zeigt sehr gute Ergebnisse. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Modell in den getesteten Bereichen gut funktioniert und mit den entsprechenden physiologischen und physico-chemischen Parametern realitätsnahe Aussagen über die Aufnahme, Verteilung und Elimination von neutralen (bzw. leicht polaren), nicht metabolisierten Substanzen macht.

Generell ist von einer gewissen Ungenauigkeit der vorhergesagten Konzentrationen auszugehen. Dies ergibt sich zum einen aus den impliziten Ungenauigkeiten der Verteilungskoeffizienten, falls diese durch die Verwendung der pp-LFER Parameter generiert werden (Stenzel, Goss und Endo, 2013b; Stenzel, Goss und Endo, 2013a). Zum anderen sind die physiologischen Daten (insbesondere die Zusammensetzung der einzelnen Organe) gemittelte Werte aus verschiedenen Literaturquellen. So kann z.B. der für unpolare Substanzen wichtige Lipidgehalt eines Individuums abhängig sein von der Spezies (Lien und McKim, 1993), dem Alter (Bertelsen u. a., 1998) und der Art der Fütterung (Yamamoto u. a., 2002). In der Natur wurden zudem Abhängigkeiten von der Jahreszeit sowie dem Ort gefunden. Dies führt zu Variationen zwischen 0.5% und 20% Lipidgehalt (Volumenprozent), (Schlechtriem, Flidner und Schäfers, 2012).

Somit ist eine genaue Abschätzung des zu erwartenden Fehlers nur schwer möglich, da je nach Szenario andere Parameter wichtig sind und damit ihre Ungenauigkeiten unterschiedlich starken Einfluss auf die Simulationen haben.

4.1 Wichtige Parameter und Sensitivität

Auch wenn die Sensitivität des Modells gegenüber den meisten Parametern stark vom jeweiligen Szenario abhängt, gibt es wenige, die von genereller Bedeutung sind. Nachfolgend sollen diese wichtigsten Parameter sowie die Sensitivität des Modells ihnen gegenüber besprochen werden.

4.1.1 Verteilungskoeffizienten

Die Verteilungskoeffizienten haben linearen Einfluss auf die Simulationsergebnisse. Über sie werden die Sorptionskapazitäten der einzelnen Organe und daraus die Kapazität des gesamten Individuums errechnet. Jede Abweichung in den Verteilungskoeffizienten wird daher direkt im Verteilungsgleichgewicht merkbar. Ebenfalls werden die Permeabilitäten der einzelnen Membranen mittels der Verteilungskoeffizienten Hexadecane/Wasser berechnet. Daher können Ungenauigkeiten in der

Messung oder Abschätzung zu Abweichungen in der Kinetik von Aufnahme, Verteilung und Elimination führen. Die Variabilität hängt vom Messverfahren bzw. Abschätzungsverfahren ab und kann durchaus eine Größenordnung und mehr betragen. Für Verteilungskoeffizienten, die über den pp-LFER Ansatz abgeschätzt werden, ist ein mittlerer Fehler von 0.3 log Einheiten anzunehmen (Endo, Brown und Goss, 2013).

Als Beispiel ist hier eine Simulation nach dem Paper von Nichols 1990 (Nichols u. a., 1990) aufgetragen. Darin wurde über einen Zeitraum von elf Tagen eine 1Kg schwere Regenbogenforelle mit Pentachlorobenzene kontaminiertem Wasser ausgesetzt. Zu erkennen ist, dass die gemessene Konzentration im Fett (Abbildung 1 – rote Punkte) gut mit der simulierten Konzentration übereinstimmt, hingegen weicht die Blutkonzentration um den Faktor vier ab. Dies liegt an den Verteilungskoeffizienten. Der gemischte Verteilungskoeffizient Blut/Wasser liegt in Experimenten zwischen 20 (in vivo) und 25 (in vitro), während der hier mittels pp-LFER (Ulrich S.; Brown, T.N.; Watanabe, N.; Bronner, G.; Abraham, M.H.; Goss, K.-U., 2017) (in Kombination mit einer annähernd gleichen Blutzusammensetzung) berechnete Wert bei 86 liegt. Hingegen scheint der Fett/Wasser Verteilungskoeffizient sehr gut zu passen, da die Fett-Konzentration gegen Ende (nahe des Gleichgewichts) sehr gut mit den gemessenen Werten übereinstimmt.

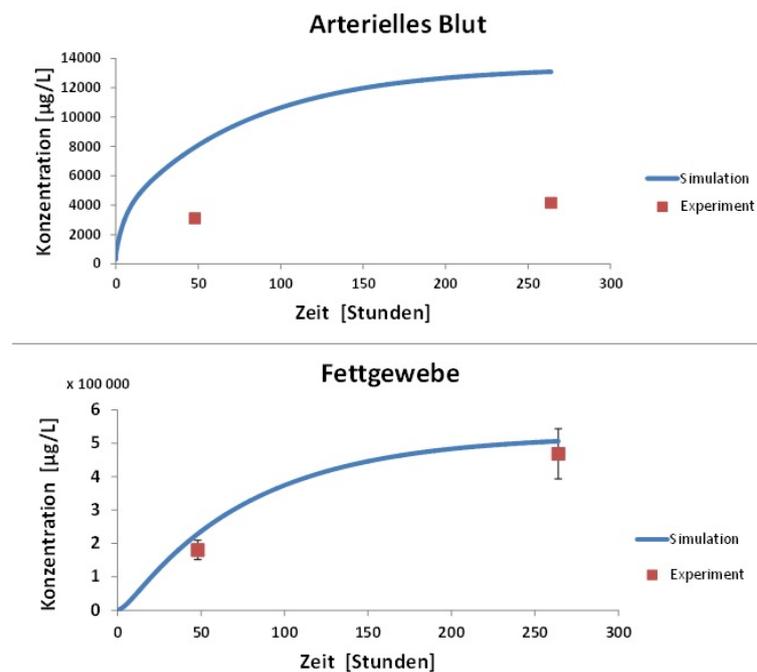


ABBILDUNG 4.1: Grafik ist identisch mit 3.16. Hier soll auf den Konzentrationsunterschied (speziell die Konzentrations-Überschätzung) im Simulationsverlauf zwischen Blut und Muskeln hingewiesen werden.

4.1.2 Gewebezusammensetzung

Die Zusammensetzung der einzelnen Organe, speziell die Gewebezusammensetzung hat im Zusammenspiel mit den Verteilungskoeffizienten ebenfalls einen Einfluss auf das Verteilungsverhalten. Wenngleich die Variabilität im Verhältnis zu den Verteilungskoeffizienten kleiner ist. Mit Ausnahme des Fettanteils des Körpers, der maßgeblich durch die Größe des Fettgewebes bestimmt wird und eine Variation von 0.5% bis 20% des Körpergewichtes aufweisen kann (Schlechtriem u. a., 2017) sind die Organzusammensetzungen innerhalb einer Spezies recht ähnlich.

Zur Verdeutlichung wird eine Nach-Simulation der Aufnahmestudie aus dem Paper von Nichols 2003 (Nichols u. a., 2004a) herangezogen. Dies ist eine Fütterungsstudie in Regenbogenforellen mit dem Kontaminanten PCB52. Betrachtet man die Konzentrationen im Blut und den Organen (Abbildung 4.2), so fällt auf, dass die Konzentration im Muskelgewebe als einzige überschätzt wird. Da das Muskelgewebe im Ausgleich mit dem Körper bzw. dem Blut steht, muss die Gleichgewichtsverteilung von PCB52 zwischen Blut und Muskelgewebe zu hoch sein. Da die aus den pp-LFER Gleichungen berechneten Verteilungskoeffizienten der einzelnen Sorptionsphasen in den anderen Organen zu korrekten Konzentrationen führen, scheint die Zusammensetzung des Muskelgewebes nicht korrekt zu sein. Da PCB52 hauptsächlich in Lipide eingelagert wird, ist zu vermuten, dass der Lipidanteil im Muskelgewebe zu hoch angesetzt ist. Dieser beträgt für diese Simulation 3.4% (Organvolumen), wobei sich 2.54% auf die Speicherlipide und 0.86% auf Phospho-Lipide (Membran-Lipide) verteilen.

4.1.3 Ventilation

Für alle Aufnahme und Eliminationsprozesse über das Wasser ist die Ventilationsrate von entscheidender Bedeutung. Sie bestimmt die Menge an zum Austausch zur Verfügung stehenden Wassers in den Kiemen und damit direkt die zur Verfügung stehende Stoffmenge pro Zeit bzw. die (maximale) abtransportierbare Stoffmenge.

Für Substanzen mit einer Aufnahmeeffizienz nahe 100% (bezogen auf Respirationsvolumen) hat die Ventilationsrate daher einen linearen Einfluss auf die Aufnahme. Für Substanzen/Situationen mit einer geringeren Aufnahmeeffizienz (siehe Sättigungseffekt der Aufnahmeeffizienz Kap.4.3.1) ist dieser Einfluss entsprechend vermindert.

Die zur Validierung der Aufnahme über die Kiemen verwendetet Daten von Adolfsson -Errici (Adolfsson-Erici, Åkerman und McLachlan, 2012) bieten hierfür ein gutes Beispiel. Die aus der allometrischen Skalierung nach Nichols 1990 (Nichols u. a., 1990) errechnete Ventilationsrate (für eine 45g Regenbogenforelle) beträgt 17.5ml/min. Da das hier verwendete Pentachlorobenzene eine Aufnahmeeffizienz von 91% (bezogen auf die Respirationsrate) aufweist, ist die Aufnahme stark ventilationsratenlimitiert. Mit der errechneten Ventilation sind die gemessenen Konzentrationen nicht zu erreichen. Hierfür kann eine Ventilationsrate aus der aufgenommenen Stoffmenge (unter der Annahme von 100% Aufnahmeeffizienz in den Kiemen) und den Expositionskonzentrationen abgeschätzt werden. Je nachdem, ob eine niedrigere oder eine

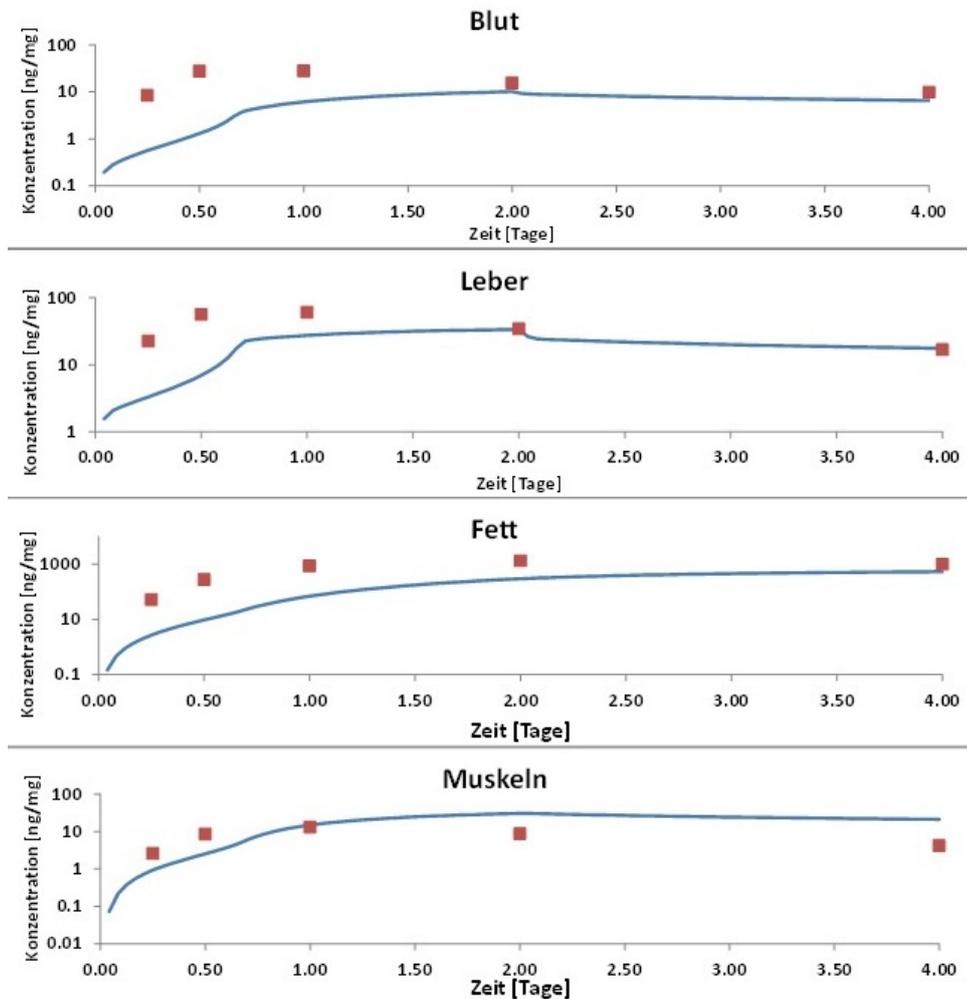


ABBILDUNG 4.2: Nichols et al. (Nichols et al. 1990). (A) Fat-tissue concentration, and (B) arterialblood concentration.

höhere Konzentration verwendet wird (aus der Variation der experimentellen Ergebnisse), ergeben sich daraus 40ml/min bzw. 55ml/min notwendige Ventilationsraten (siehe Abbildung 4.3). Nur durch diese hohen Ventilationsraten steht dem Individuum genügend Stoffmenge zur Verfügung, um die experimentell gemessenen Konzentrationen überhaupt zu erreichen.

4.1.4 Verdauung

Die Aufnahme/Elimination über die Nahrung ist ein komplexer Prozess, der von mehreren Faktoren Abhängig ist. Dazu gehören neben der Verdauungseffizienz der einzelnen Nahrungsbestandteile (Fette und Proteine werden verschieden effizient verdaut), (Nichols u. a., 2004a; Yamamoto u. a., 2002), auch die Aufenthaltszeit der Nahrung im GIT sowie die Dynamik der Verdauung.

Verdauungseffizienz: Der Einfluss der Verdauungseffizienz ist mit dem geringer werdenden Volumen der Nahrung während der Verdauung zu begründen. Durch

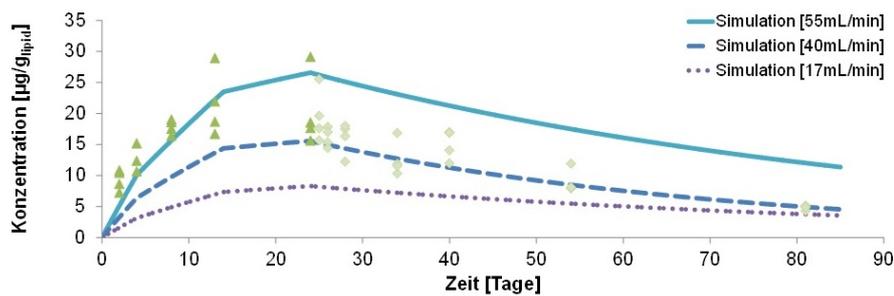


ABBILDUNG 4.3: Einfluss der Ventilationsrate auf die Aufnahme bei einer Exposition über die Kiemen.

die Reduktion des Nahrungsvolumens nimmt die Konzentration der darin enthaltenen Substanz zu (entspricht dem umgekehrten Effekt der Verdünnung durch Wachstum). Zur Verdeutlichung dieses Effektes wurde in Abbildung 4.4 die Aufnahme von Hexachlorobenzene über die Nahrung entsprechend dem Ringtest von 2012 (siehe Validierung des GIT) ohne Verwendung eines Beschleunigungsfaktors abgebildet (OECD, 2012a). Die Aufkonzentration innerhalb der Nahrung sorgt für einen steigenden Konzentrationsgradienten entlang des GIT und damit für eine erhöhte Aufnahme über die Zeit der Verdauung.

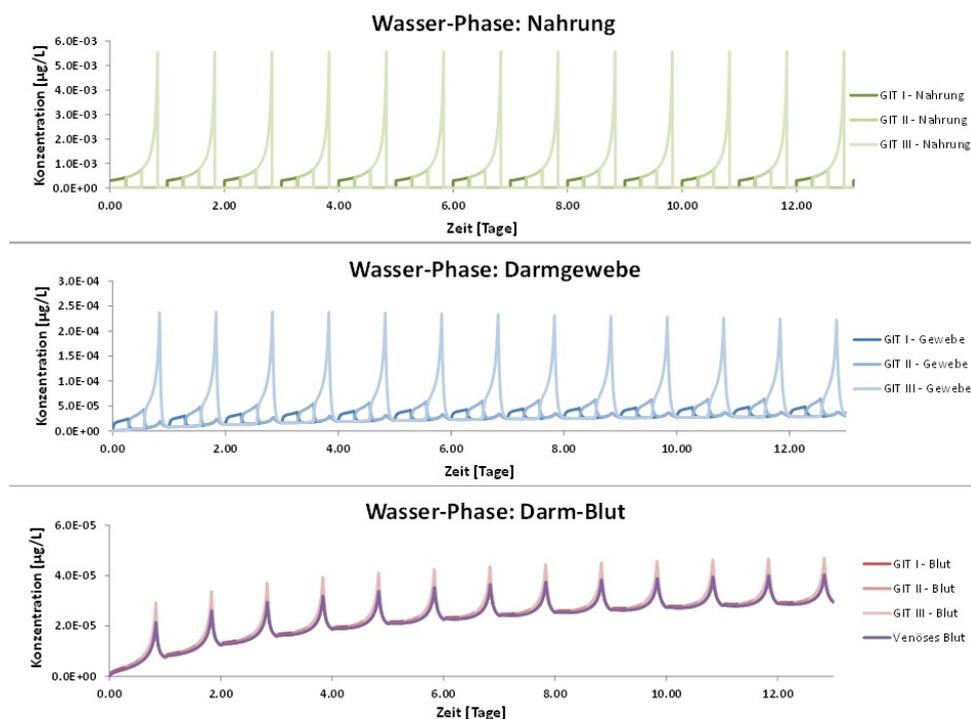


ABBILDUNG 4.4: Aufnahme von Hexachlorobenzene über die Nahrung. Aufgetragen sind die Wasserphasen-Konzentrationen in den drei Darm-Abschnitten (jeweils mit I, II oder III gekennzeichnet) für die Nahrung (oben), das Darm-Gewebe (mitte) und das Blut innerhalb des Darms sowie des gesamten venösen Blutes (unten).

Um den Einfluss der Verdauungseffizienz darzustellen, wurde für diese Simulationen (unter Verwendung eines Beschleunigungsfaktors von 30) neben einer Verdauungseffizienz von 96% eine weitere Simulation mit verringerter Effizienz von 80% aufgetragen (beide Werte werden in der Literatur angegeben (Nichols u. a., 2004a; Yamamoto u. a., 2002)). Die verringerte Verdauungseffizienz sorgt für eine geringere Aufkonzentration innerhalb der Nahrung und damit für einen niedrigeren Konzentrationsgradienten von der Nahrung in den Körper (siehe Abbildung 4.5). Da der Effekt der Aufkonzentration im Zusammenspiel mit der Aufnahmeeffizienz betrachtet werden muss, kann hier keine eindeutige Abhängigkeit definiert oder abgeleitet werden.

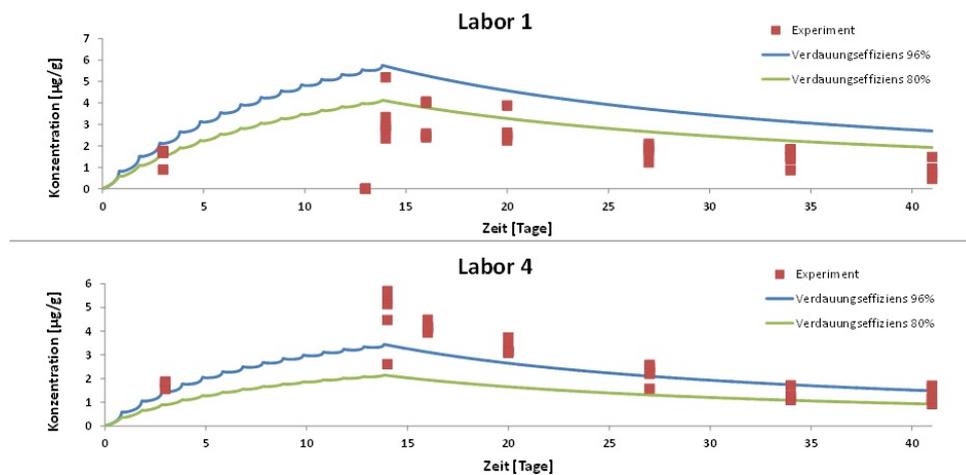


ABBILDUNG 4.5: Simulationen mit Verdauung mit 96% Verdauungseffizienz und 80% Verdauungseffizienz. Die Aufenthaltszeit der Nahrung im Darm betrug jeweils 24 h.

Aufenthaltszeit: Die Aufenthaltszeit der Nahrung im GIT bestimmt den Zeitraum, in dem der Stoffaustausch stattfinden kann und hat damit direkten Einfluss auf die aufgenommene bzw. abgegebene Stoffmenge. Dies ist jedoch nur relevant, solange sich Nahrung und Körper nicht im Ausgleich befinden bzw. der Austausch schnell genug ist, um die Aufkonzentration durch die Nahrungsreduktion zu kompensieren. Eine Abschätzung des Einflusses der Aufenthaltszeit ist aufgrund der starken Substanzabhängigkeit dieses Effektes nicht möglich.

Trägergebundener Transport: Wie bereits bei der Validierung gezeigt, hat der an Mizellen gebundene Transport durch die ABL einen nahezu linearen Einfluss auf die Aufnahme für hydrophobe Substanzen (Larisch und Goss, 2018b). In Abbildung 4.4 ist zu erkennen, dass ohne zusätzlichen Transport durch die ABL, die der Hauptwiderstand beim Übergang des hydrophoben Stoffes von der Nahrung in das Darmgewebe ist, der Konzentrationsunterschied zwischen den Wasserphasen in Nahrung und Darm-Gewebe der größte ist (und damit einhergehend der größte Widerstand). Ohne eine korrekte Beschreibung / Abschätzung des Mizellen gebundenen Transports können hydrophobe Substanzen daher nicht korrekt modelliert werden.

Verdauungs-Dynamik: Im Vergleich zu einer linearen Verdauung (lineare Abnahme des Nahrungsvolumens über alle Darmabschnitte und Zeit) kann eine nicht lineare Verdauungs-Dynamik, wie sie von Nichols gemessen wurde (Nichols u. a., 2004a), enormen Einfluss auf die Aufnahme haben.

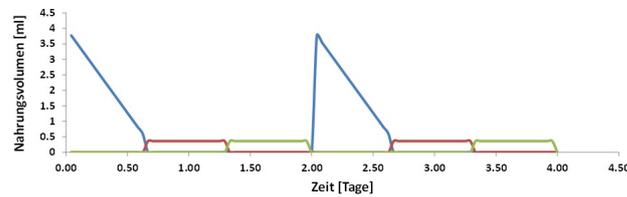


ABBILDUNG 4.6: Nahrungs-Menge über die Zeit in den 3 Darmabschnitten des Modells. Blau : Darmabschnitt I , Rot : Darmabschnitt II und Grün : Darmabschnitt III.

Vergleicht man die Wasserphasenkonzentration und die korrespondierenden Konzentrationen im Darm-Gewebe sowie im Darm-Blut von Abbildung 4.4 und Abbildung 4.7, so fällt auf, dass durch die hier stattfindende starke Aufkonzentration der Nahrung in Darmabschnitt I ein sehr hoher Konzentrationsgradient bereits sehr früh eingestellt wird und somit eine erhöhte Aufnahme über einen längeren Zeitraum generiert wird. Da dieser Einfluss und die Auswirkung auf das Simulationsergebnis stark von dem Verlauf (der Dynamik) der Verdauung abhängt, kann auch hier keine sinnvolle Abschätzung des Einflusses gegeben werden.

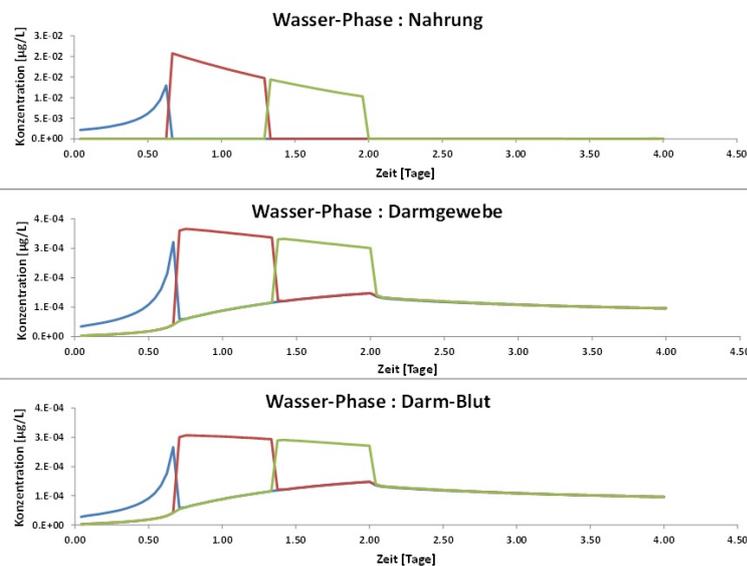


ABBILDUNG 4.7: Wasserphasenkonzentrationen in Nahrung, Darmgewebe und Darmblut für die drei Darmabschnitte: Blau - Darmabschnitt I , Rot - Darmabschnitt II und Grün - Darmabschnitt III.

4.2 Erkenntnisse aus den bisherigen Simulationen

4.2.1 Zeitabhängigkeit der Aufnahmeeffizienz

Sowohl Nichols (Nichols u. a., 1990) als auch McKim (McKim, Schmieder und Veith, 1985) haben in ihren Arbeiten eine Zeitabhängigkeit der Aufnahmeeffizienz festgestellt (siehe Abbildung 4.8) und diese mit der Sättigung des Individuums begründet.

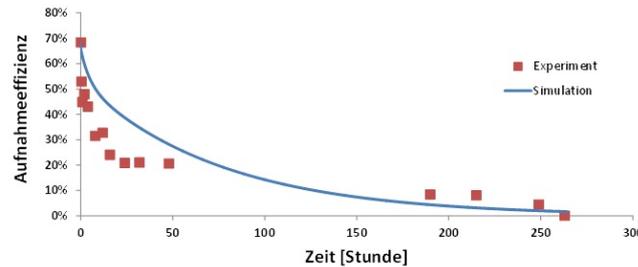


ABBILDUNG 4.8: Aufnahmeeffizienz über die Zeit mit Daten aus den Veröffentlichungen Nichols et al. (Nichols u. a., 1990).

Die in McKim et al. vorgestellten Werte reichen dabei über einen $\log K_{OW}$ Bereich von 0.2 bis 6.5 und wurden nach ca. einer Stunde gemessen. Die abgebildete Graphik suggeriert eine stabile $\log K_{OW}$ Abhängigkeit (siehe Abbildung 2), die in verschiedenen Bioakkumulations-Modellen als feste Parametrisierung verwendet wurde (Law 1991; Péry u. a., 2014).

Die Aufnahmeeffizienz ist jedoch eine komplexe Funktion aus verschiedenen physikalisch - chemischen und physiologischen Parametern. So beinhaltet sie die Permeabilitäten der ABL und Membranen der Kiemen (die wiederum von den Verteilungskoeffizienten abhängen), etwaigen aktiven o. Träger gebundenem Transport (zB. an in Wasser gelöstem organischem Kohlenstoff) sowie der Blutflussrate (bzw. Blut-Transport-Kapazität) und allem voran dem effektiven Respirationsvolumen.

Der in Abbildung 4.9 gezeigte Verlauf kann daher für jeden Abschnitt unabhängig vom K_{OW} Wert erklärt werden: Im unteren $\log K_{OW}$ Bereich von 0.2 bis etwa 1 ist bereits eine starke Sättigung des Individuums eingetreten und der niedrige chemische Gradient ermöglicht nur noch eine geringe Aufnahme der im Ventilationsvolumen vorhandenen Substanz. Im mittleren $\log K_{OW}$ Bereich von etwa 1 bis 3 ist diese Sättigung noch nicht so stark ausgeprägt und andere Prozesse dominieren die Aufnahme. Dabei können je nach Substanz und Physiologie unterschiedliche Prozesse von Bedeutung sein, unter anderem der Blutfluss durch die Kiemen oder die Membran-Permeabilität. Im oberen $\log K_{OW}$ Bereich (größer als 3) ist die Aufnahme Ventilationsraten limitiert. Die scheinbar obere Grenze der Aufnahmeeffizienz von um die 65% erklärt sich aus der Physiologie der Kiemen. Das effektiv zum Austausch stehende Volumen innerhalb der Kiemen (Respirationsvolumen) beträgt bei Regenbogenforellen ca. 70% des Ventilationsvolumens (Larisch und Goss, 2017). Die restliche 5% Differenz lässt sich leicht erklären, wenn man bedenkt, dass das durchfließende Wasser nicht vollständig (zu 100%) entleert wird.

Mit fortschreitender Sättigung des Individuums über die Zeit würde daher auch der mittlere Bereich der ansteigenden Aufnahmeeffizienz in einen höheren $\log K_{OW}$ Bereich verschoben.

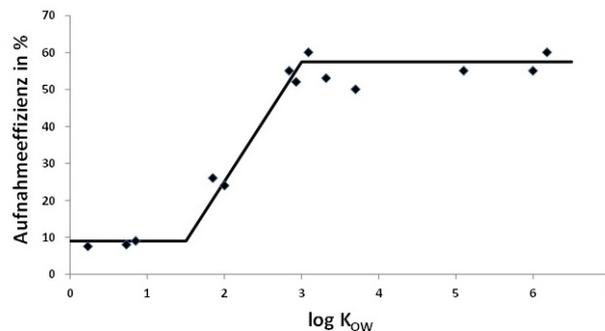


ABBILDUNG 4.9: Gemessene Aufnahmeeffizienz nach einer Stunde für verschiedene Substanzen über einen breiten $\log K_{OW}$ Bereich. Der Verlauf der Daten suggeriert eine (falsche -) Abhängigkeit vom $\log K_{OW}$ (eingezeichnete Line).

4.2.2 Aufnahme superhydrophober Substanzen – Mizellen gebundener Transport

Sowohl in der wissenschaftlichen Literatur (Dyer u. a., 2008; Sakuratani u. a., 2008) als auch in der Europäischen Chemikalienverordnung (ECHA, 2017) findet sich die Aussage, dass Substanzen mit einem $\log K_{OW} > 8$ (sog. superhydrophobe Substanzen) nicht bioakkumulierend sind, da sie nicht in relevanter Menge aufgenommen werden können. Dies wird häufig damit erklärt, dass solche große, hydrophobe Moleküle nicht mehr durch Membranen hindurch diffundieren können (Dyer u. a., 2008; Sakuratani u. a., 2008; Kierkegaard u. a., 1999). In der pharmazeutischen Literatur jedoch finden sich Beispiele für Substanzen mit Molekulargewichten > 800 (u.a. 1200) deren Aufnahme nicht verhindert, sondern lediglich verlangsamt ist (Broccatelli, 2012; Polli u. a., 2001). Eine weiterführende Diskussion dazu finden Sie in Larisch und Goss 2018 (Larisch und Goss, 2018a).

Als Beispiele für die Aufnahme solcher Substanzen dienen experimentelle Studien zu Decachlorobiphenyl (PCB209) mit einem $\log K_{OW}$ von 8.18 (Fisk u. a., 1998), Decchlorane Plus mit einem geschätztem $\log K_{OW}$ von 11.2 (Tomy u. a., 2008) und Decabromodiphenylether (BDE209) mit einem $\log K_{OW}$ von 9.97 (Munsch u. a., 2011). Die darin verwendeten Regenbogenforellen (verschiedenen Gewichte) wurde über einen bestimmten Zeitraum über ihre Nahrung exponiert und in regelmäßigen Abständen ihre interne Konzentration gemessen. Danach folgte jeweils eine Eliminationsphase. Die berechneten Beschleunigungsfaktoren für den albumingebundenen Transport betragen 51411 (PCB209), 450221 (Decchlorane) und 1179216 (BDE209). Da die Abschätzung des Mizellen-Beschleunigungsfaktors sehr weit weg von den vorhandenen Daten liegt (höchster gemessener Wert ist 145) (Westergaard und Dietschy, 1976a), wurden hierfür die Albumin-Beschleunigungsfaktoren benutzt.

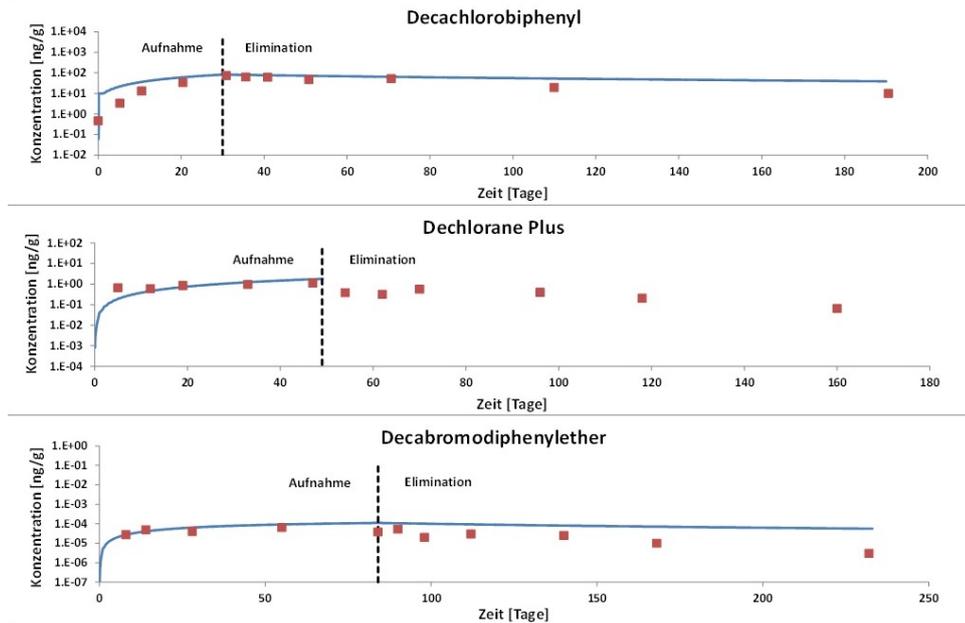


ABBILDUNG 4.10: Logarithmische Darstellung der Gesamtkonzentrationen der einzelnen Substanzen im jeweiligen Fisch. Die Punkte stellen die gemessenen Werte dar. Die durchgezogenen Linien sind die Simulationsergebnisse.

Die Ergebnisse der Simulationen stimmen dabei sehr gut mit den gemessenen Werten überein (siehe Abbildung 4.10). Dies zeigt zum einen, dass die abgeschätzten Mizell-Beschleunigungsfaktoren (51000 - 1100000) nah an der Realität sind und zum anderen, dass die superhydrophoben Substanzen sehr wohl aufgenommen werden können (wenngleich der notwendige Zeitraum für eine Bioakkumulation groß ist). Ohne effizienten Metabolismus solcher Substanzen müssen diese daher als bioakkumulierend eingestuft werden. Wegen der hohen Eliminationshalbwertszeit solcher Substanzen von 50 Tagen bis hin zu weit über 200 Tagen (Fisk u. a., 1998), sind experimentelle Bestimmungen des Bioakkumulationspotentials (mittels BCF o. BMF) nicht sinnvoll/praktikabel. PbTk Modelle, wie das hier vorgestellte, können helfen diese Lücke zu schließen.

4.3 Vergleich mit anderen Modellen

Im Bereich der PbTk Modelle für Fische ist das bekannteste wohl das Modell von Nichols 1990 (Nichols u. a., 1990). Über die Jahre erfuhr es mehrere Erweiterungen zB. eine detailliertere Betrachtung der Kiemen von Ericson und McKim (McKim, Schmieder und Veith, 1985) sowie ein komplexes Darm-Untermmodell von Nichols selbst (Nichols u. a., 2004a) und diverse Weiterentwicklungen (zB. in Stadnicka et al. (Kleinow u. a., 2008)). Es ist nach wie vor eines der Standardmodelle im Bereich der Vorhersage der Bioakkumulation für neutrale Substanzen und liefert hervorragende Ergebnisse (Bessemis u. a., 2014). Wenn jedoch eine mechanistisch detaillierte Prozess-Beschreibung im Fokus steht, sind schnell die Grenzen des Modells erreicht. Neben den notwendigen gemischten Parametern für die verschiedenen Aufnahme-/Eliminationsprozesse (wie bspw. zwischen Blut und Organ (1990; Erickson und

McKim, 1990)) enthält es nur wenige Sorptionsphasen (Wasser und Lipide) und benötigt entsprechend gefittete Parameter für jedes simulierte Szenario (Bessemis u. a., 2014).

Im Vergleich zu Nichols hat das hier vorgestellte Modell seine Stärken in der Prozessbeschreibung und dem physiologischen Detailgrad. Alle Prozesse sind, soweit möglich, mechanistisch korrekt beschrieben und beziehen sich auf die chemischen sowie physiologischen Eigenschaften von Substanz und Spezies. Ein szenarienbedingtes Fitten von Parametern, die daraufhin für andere Szenarien eventuell ungeeignet sind, entfällt. Dies setzt jedoch einen höheren Aufwand bei der Bereitstellung der notwendigen Daten voraus, welche jedoch Szenarien unabhängig sind und somit wiederverwendet werden können.

Die detailliertere Physiologie im Bereich der Sorptionsphase (hier sechs statt zwei) erlaubt eine bessere Vorhersage der Konzentrationen, allen voran von polaren Substanzen, die verstärkt an Proteine binden. Die Unterteilung der Organe in Blut- und Gewebe-Kompartimente sowie die Differenzierung zwischen wässrigen und festen Sorptionsphasen erlaubt eine genauere Betrachtung der freigelösten Konzentration innerhalb der Organe, eine Information, die für die Toxikodynamik (Beschreibung von toxischen Effekten in Abhängigkeit der vorhandenen Konzentration) von großer Bedeutung ist.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass es bereits Modelle (bzw. Teil-Modelle) gibt, die solche Informationen in guter Qualität zur Verfügung stellen (zB. in Ng & Hungenbühler 2013 (Ng2013)). Diese benutzen jedoch wiederum andere Vereinfachungen und/oder gemischte Aufnahme- / Eliminationsparameter, sodass in seiner Gesamtheit das hier dargestellte Modell weiterhin einzigartig bleibt.

Generelles Alleinstellungsmerkmal ist die Implementierung von Ad- und Desorptionskinetiken an feste Blut- und Gewebestandteile. Ein möglicher Einfluss solcher Kinetik wurde in der Literatur zwar bereits diskutiert (Kramer, Van Eijkeren und Hermens, 2007) aber noch nicht in einem Modell abgebildet. Des weiteren bietet die Implementierung der analytischen Lösung des Problems von vier in Reihe liegenden Kompartimenten mit jeweils reversibler Kinetik erster Ordnung zur Beschreibung der Permeation durch Membranen die Möglichkeit einen aktiven Transport an jeder gewünschten Membran zu simulieren, ohne das Modell in seiner grundsätzlichen Funktion zu verändern (Details dazu siehe Kapitel 2.2 ff).

Obwohl der Anspruch an diese Arbeit die Erstellung eines Modells zur exakten Prozess-Beschreibung (und damit verbunden des Prozess-Verständnisses) ist, muss die daraus folgenden Qualität der Vorhersagen mit den etablierten Modellen standhalten können. Da die erzielten Ergebnisse der Validierung hervorragende Übereinstimmung mit den verwendeten experimentellen Daten (und somit ebenfalls mit etwaig darauf angewendeten anderen Modellen) vorweisen, ist dieses Kriterium eindeutig erfüllt. Die hohe Komplexität des Modells erschwert jedoch die Anwendung und erfordert ein hohes Maß an Aufmerksamkeit und Prozessverständnis. Dadurch ist es zur schnellen Bearbeitung vieler Datensätze (wie es bspw. in der Regulatorik benötigt wird) ungeeignet.

Kapitel 5

Ausblick

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell stellt eine Grundlagenarbeit dar, ein Fundament auf dem Weiterentwicklungen für zukünftige Forschungsthemen angegangen werden können. Die Anforderungen bei der Entwicklung wurden speziell auf Erweiterbarkeit bei gleichzeitiger Prozess-Stabilität gelegt (sowohl unabhängig validierbar als auch unbeeinflusst von anderen Prozessen). Dies dient dem Aufbau eines Modells, das auch nach Abschluss dieser Arbeit noch weiterentwickelt werden kann (und muss), da noch immer viele ADME Prozesse nicht ausreichend verstanden sind. Durch die Implementierung von gut verstandenen Prozessen können experimentelle Daten analysiert werden und gegebenenfalls neue oder bislang unbeachtete Prozessen hinzugefügt werden (bspw. Mizellengebundener Transport). Im Folgenden werden einige der bereits vorbereiteten/angedachten Erweiterungsmöglichkeiten angesprochen.

Multi-Phasen-Sorption (Ionische Substanzen) Mittels der Multi-Phasen-Sorption von mindestens sechs verschiedenen sorbierenden Phasen ist eine Abbildung der Sorptionsprozesse weit über neutrale, nicht-polare Substanzen hinaus möglich. Die Wichtigkeit alternativer Sorptionsphasen (alternativ zu Lipiden) steigt insbesondere für ionische Substanzen deren Verteilungsverhalten gänzlich verschieden sein kann. Neben Messungen für Verteilungskoeffizienten ionischer Substanzen (Henneberger, Goss und Endo, 2016) wurde auch die Beschreibung ihrer Permeation durch Membranen parallel zu dieser Arbeit begonnen (Bittermann und Goss, 2017; Bittermann, Spycher und Goss, 2016).

Mechanistische Prozessbeschreibung (Metabolismus, aktiver Transport) Die mechanistische Beschreibung und Validierung aller einzelnen Prozesse sowie deren Implementierung als abgegrenzter, eigenständiger Programm-Block ermöglicht es, weitere Prozesse hinzuzufügen, ohne die bereits vorhandenen Prozesse zu beeinflussen. Somit können auch sonst nicht einzeln zu beobachtende Prozesse wie Metabolismus in einzelnen Organen (da abhängig von der Aufnahme- und Verteilungskinetik), aktiver Transport an bestimmten Membranen oder die Verbesserung einzelner Organe und ihrer Funktionen implementiert werden, ohne die bereits vorhandene Validierung infrage zu stellen. Hierzu wird und wurde parallel an einem komplexen Lebermodell gearbeitet, dessen Eigenschaften / Abstraktionen (unter anderem der Metabolismus) in dieses Modell übertragen werden sollen.

PbTk Modell für andere Spezies Die Möglichkeit Spezies-Parameter getrennt von Substanz-Parametern einzugeben, in Kombination mit einer gleichen Modell Struktur für alle Wirbeltiere, legt eine Verwendung dieses Modells für andere Spezies wie zB. Ratten oder Menschen nahe. Dies würde den Anwendungsbereich und die zur

Verfügung stehenden Daten enorm erhöhen. Dazu müsste als erstes der Prozess der Aufnahme über die Luft via Lunge validiert werden. Anschließend steht ein Vergleich mit bestehenden Modellen wie bspw. Simcyp®(Simcyp Ltd, Sheffield, UK) oder PKSim®(Bayer Technology Services GmbH, Leverkusen, Germany) aus. Diese Arbeit wird derzeit, im Bezug auf die Ratte, von nachfolgenden Wissenschaftlern angegangen.

Anhang A

Frequently Asked Questions

A.1 Wo finde ich den Quellcode?

Der Quellcode liegt auf den Servern des UFZ. Am einfachsten ist eine direkte Anfrage an Prof. Dr. Kai-Uwe Goss. Da der Quellcode mit Hilfe von Matlab 2016 (und höher) erstellt wurde wird zum ausführen eine Lizenzierte Version benötigt. Ein einfaches Betrachten mit einem Editor ist jedoch problemlos möglich.

A.2 Wie kann das Modell ausgeführt werden?

Es gibt zwei Möglichkeiten das Modell auszuführen. Erstens, kann der Quellcode mittels Matlab2016 (oder höher) ausgeführt werden, insofern eine Softwarelizenz zur Verfügung steht. Zweitens steht eine ausführbare .exe Version zur Verfügung. Um diese korrekt benutzen zu können, wird ein zusätzliches Softwarepaket benötigt, dass jedoch kostenfrei von den Servern von Mathworks erhältlich ist.

<https://de.mathworks.com/products/compiler/matlab-runtime.html>

A.3 Beim ausführen ertönt nur ein Signalton?

Es ist zu einem Fehler bei der Ausführung des Programms gekommen. Sollten sie den Quellcode mittels Matlab direkt ausführen, so können sie anhand der Fehlerbeschreibung im Matlab-Editor das Problem erkennen. Sollten sie die .exe Version verwenden steht leider keine Möglichkeit zur Verfügung den Fehler auszulesen. Sollte es zu einem solchen Fehler kommen wird das Programm keine Simulation starten.

Mögliche Fehlerquellen

- Nicht alle notwendigen Parameter wurden eingelesen
- Ein Parameter enthält einen Buchstaben anstatt einen Zahlenwert
- Es wurden keine Permeabilitäten berechnet
- Im Projektnamen steht noch 'Default Project'
- Es wurde keine Exposition definiert

Anhang B

Curriculum Vitae

Hiermit bestätige ich, Wolfgang Larisch, die Richtigkeit und Aktualität des folgenden Curriculum Vitae und der Publikationsliste.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift



Wolfgang Larisch

Curriculum Vitae

Ausbildung

- 2004 – 2011 **Diplom Physik**, *Universität Leipzig*, Leipzig, 2.0.
 2001 – 2004 **Abitur**, *Berufliches Schulzentrum Zittau*, Zittau, 1.9.
 1991 – 2001 **Realschulabschluss**, *Realschule "am Burgteich"*, Zittau, 1.5.

Diplom Arbeit

- Titel** *Strukturierung von Petri-Schalen mittels Protonen-Strahl-Schreiben in Agar für neuronale Netze mit definierter Topologie*
- Betreuer** Prof. Dr. habil. Tilman Butz
- Beschreibung** Das Ziel dieser Arbeit war es, einzelne neuronale Zellen gezielt in einem quadratischen Gitter zu platzieren und diese über Verbindungskanäle synaptische Verbindungen ausbilden zu lassen. Dazu wurde das Verfahren des Protonen-Strahl-Schreibens in Agargel verwendet.

Erfahrung

Beruflich

- 2016 – 2018 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, *Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH*, Leipzig.
 Erweiterung eines PbTk Modells um Detaillierte Darmstrukturen.
 Detaillierte Erfolge:
 - Literatur Recherche zur Aufnahmekinetik in Darmgeweben
 - Ausarbeitung ein Umsetzung der kinetischen Prozesse
 - Validierung und Veröffentlichung der Ergebnisse
- 2012 – 2016 **Doktorand**, *Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH*, Leipzig.
 Modell Programmierung und Validierung im Bereich Physiologisch Basierter Verteilungsmodelle.
 Detaillierte Erfolge:
 - Einarbeitung in die Grundlagen der Umweltchemie und Verteilungsverhalten von Chemikalien
 - Programmierung eines Numerischen Modells mittels Matlab
 - Validierung und Veröffentlichung des Modells und Nebenprojektes

Miscellaneous

- 2011 – 2012 **Assoziierter Wissenschaftler**, *Nukleare Festkörperphysik*, Universität Leipzig.
Veröffentlichungsarbeit zum Diplomthema in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe
Nukleare Festkörperphysik der Universität Leipzig.

Awards

- 2010 Poster Award at 12.th ICNMTA – PBW of Microstructures in Agar Gel for Patterned Cell Growth

Computerfähigkeiten

- Basic Fortran, Corel Draw, Linux
Intermediate PYTHON, L^AT_EX, OpenOffice, MicrosoftOffice, Microsoft Windows
Advanced Matlab

Kommunikationsfähigkeit

- 2018 Poster Präsentation – Setac Europe Rome
2015 Poster Präsentation – Diffusion Fundamentals
2015 Poster Präsentation – Higrade Fall Conference
2014 Poster Spotlight – Setac Europe Basel
2013 Vortrag – SummerSchool on Plantuptake Models in Lyngby
2010 Poster Präsentation – 12.th ICNMTA Leipzig
2010 Vortrag – 9.th Int. Microbeam workshop Darmstadt

Sprachen

- | | | |
|-------------|--------------------|----------------------------------------|
| Deutsch | Muttersprache | |
| Englisch | Verhandlungssicher | <i>Wort und Schrift</i> |
| Französisch | Basic | <i>Nur einfache Wörter und Phrasen</i> |

Interessen

- Schwimmen Leistungsorientiertes Schwimmen – Universitätsschwimmhalle Leipzig
Tanzen Rock'n'Roll und Swing Verein – RRC-Leipzig e.V.
Kraftsport Universitätskrafthalle am Sportforum

Publikationen

- Larisch, W., Koal, T., Werner, R., Hohlweg, M., Reinert, T., & Butz, T. (2011). Proton beam writing of microstructures in Agar gel for patterned cell growth. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 269(20), 2444–2447.
<https://doi.org/10.1016/j.nimb.2011.02.041>
- Reinert, T., Andrea, T., Barapatre, N., Hohlweg, M., Koal, T., Larisch, W., ... Butz, T. (2011). Biomedical research at LIPSION – Present state and future developments. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 269(20), 2254–2259.
<https://doi.org/10.1016/j.nimb.2011.02.071>
- Larisch, W., Brown, T. N., & Goss, K.-U. (2017). A toxicokinetic model for fish including multiphase sorption features. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(6), 1538–1546.
<https://doi.org/10.1002/etc.3677>
- Larisch, W., & Goss, K.-U. (2017). Calculating the first-order kinetics of three coupled, reversible processes. *SAR and QSAR in Environmental Research*, (September), 1–9.
<https://doi.org/10.1080/1062936X.2017.1365763>
- Larisch, W., & Goss, K.-U. (2018). Modelling oral up-take of hydrophobic and super-hydrophobic chemicals in fish. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(1), 98–104.
<https://doi.org/10.1039/C7EM00495H>

Literatur

- Abraham, M. H. und J. C. McGowan (1987). „The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography“. In: *Chromatographia* 23.4, S. 243–246. ISSN: 0009-5893. DOI: 10.1007/BF02311772. URL: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02311772><http://link.springer.com/10.1007/BF02311772>.
- Abraham, Michael H., Adam Ibrahim und William E. Acree (2005). „Air to blood distribution of volatile organic compounds: A linear free energy analysis“. In: *Chem. Res. Toxicol.* 18.5, S. 904–911. ISSN: 0893228X. DOI: 10.1021/tx050066d.
- Abraham, Michael H, Adam Ibrahim und Andreas M Zissimos (2004). „Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements.“ eng. In: *J. Chromatogr. A* 1037.1-2, S. 29–47. ISSN: 0021-9673 (Print).
- Adolfsson-Erici, Margaretha, Gun Åkerman und Michael S. McLachlan (2012). „Measuring bioconcentration factors in fish using exposure to multiple chemicals and internal benchmarking to correct for growth dilution“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 31.8, S. 1853–1860. ISSN: 07307268. DOI: 10.1002/etc.1897. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22639194><http://doi.wiley.com/10.1002/etc.1897>.
- Baker, M. und T. Parton (2007). „Kinetic determinants of hepatic clearance: Plasma protein binding and hepatic uptake“. In: *Xenobiotica* 37.10-11, S. 1110–1134. ISSN: 0049-8254. DOI: 10.1080/00498250701658296. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00498250701658296>.
- Baker, R W (1987). *Controlled release of biologically active agents*. New York, USA: John Wiley & Sons.
- Barron, M. G., B. D. Tarr und W. L. Hayton (1987). „Temperature-dependence of cardiac output and regional blood flow in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson“. In: *J. Fish Biol.* 31.6, S. 735–744. ISSN: 0022-1112. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1987.tb05276.x. URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.1987.tb05276.x>.
- Barton, Catherine A., Mary A. Kaiser und Mark H. Russell (2007). „Partitioning and removal of perfluorooctanoate during rain events: the importance of physical-chemical properties“. In: *J. Environ. Monit.* 9.8, S. 839. ISSN: 1464-0325. DOI: 10.1039/b703510a. URL: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b703510a>.
- Benešová, Helena (1986). *Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H. (ed.): Biophysics*. Bd. 28. 4, S. 274–274. DOI: 10.1007/BF02902292. URL: <http://link.springer.com/10.1007/BF02902292>.
- Berezhkovskiy, Leonid M. (2012). „Determination of hepatic clearance with the account of drug-protein binding kinetics“. In: *J. Pharm. Sci.* 101.10, S. 3936–3945. ISSN: 00223549. DOI: 10.1002/jps.23235. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/jps.23235>.
- Bertelsen, Sharon L. u. a. (1998). „Evaluation of log Kow and tissue lipid content as predictors of chemical partitioning to fish tissues“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 17.8, S. 1447. ISSN: 0730-7268. DOI: 10.1897/1551-5028(1998)017<1447:EOLKOA>2.3.CO;2. URL: <http://entc.allenpress.com/perlserv/>

- ?request=get-abstract{\&}doi=10.1897/1551-5028(1998)017{\% }3C1447:EOLKOA{\% }3E2.3.CO;2.
- Bessems, Jos G u. a. (2014). „PBTk modelling platforms and parameter estimation tools to enable animal-free risk assessment“. In: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 68.1, S. 119–139. ISSN: 02732300. DOI: 10.1016/j.yrtph.2013.11.008. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287156><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230013002092>.
- Bittermann, Kai und Kai Uwe Goss (2017). „Predicting apparent passive permeability of Caco-2 and MDCK cell-monolayers: A mechanistic model“. In: *PLoS One* 12.12, S. 1–20. ISSN: 19326203. DOI: 10.1371/journal.pone.0190319.
- Bittermann, Kai, Simon Spycher und Kai-Uwe Goss (2016). „Comparison of different models predicting the phospholipid-membrane water partition coefficients of charged compounds“. In: *Chemosphere* 144, S. 382–391. ISSN: 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.065.
- Boethling, Robert S., Philip H. Howard und William M. Meylan (2004). „Finding and estimating chemical property data for environmental assessment“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 23.10, S. 2290–2308. ISSN: 07307268. DOI: 10.1897/03-532.
- Broccatelli, Fabio (2012). „QSAR models for P-glycoprotein transport based on a highly consistent data set“. In: *J. Chem. Inf. Model.* 52.9, S. 2462–2470. ISSN: 15499596. DOI: 10.1021/ci3002809.
- Bronner, Guido und Kai Uwe Goss (2011). „Predicting sorption of pesticides and other multifunctional organic chemicals to soil organic carbon“. In: *Environ. Sci. Technol.* 45.4, S. 1313–1319. ISSN: 0013936X. DOI: 10.1021/es102553y.
- Brown, Ronald P. u. a. (1997). „Physiological Parameter Values for Physiologically Based Pharmacokinetic Models“. In: *Toxicol. Ind. Health* 13.4, S. 407–484. ISSN: 0748-2337. DOI: 10.1177/074823379701300401. URL: http://cfpub.epa.gov/ncea/hero/index.cfm?action=search.view{\&}reference{_ }id=20304<http://tih.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/074823379701300401>.
- Celsie, Alena u. a. (2015). „A fugacity-based toxicokinetic model for narcotic organic chemicals in fish“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 35.5, n/a–n/a. ISSN: 07307268. DOI: 10.1002/etc.3270. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3270>.
- Clark, Kathryn E., Frank a. P. C. Gobas und Donald Mackay (1990). „Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water“. In: *Environ. Sci. Technol.* 24.8, S. 1203–1213. ISSN: 0013-936X. DOI: 10.1021/es00078a008. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00078a008>.
- Dearden, J. C., P. Rotureau und G. Fayet (2013). „QSPR prediction of physico-chemical properties for REACH“. In: *SAR QSAR Environ. Res.* 24.4, S. 545–584. ISSN: 1062936X. DOI: 10.1080/1062936X.2013.773372.
- Drouillard, Ken G. u. a. (2012). „Calibration of the gastrointestinal magnification model to predict maximum biomagnification potentials of polychlorinated biphenyls in a bird and fish“. In: *Environ. Sci. Technol.* 46.18, S. 10279–10286. ISSN: 0013936X. DOI: 10.1021/es301724h.
- Dyer, Scott D u. a. (2008). „In vitro biotransformation of surfactants in fish. Part I: linear alkylbenzene sulfonate (C12-LAS) and alcohol ethoxylate (C13EO8)“. In: *Chemosphere* 72.5, S. 850–862. ISSN: 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.02.019. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.019>.
- ECHA (2017). *Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.11: PBT/vPvB assessment*. 4, S. 494. ISBN: 9789292447618. DOI: 10.2823/128621. URL: <https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/>

- information{_}requirements{_}r11{_}en.pdf/a8cce23f-a65a-46d2-ac68-92fee1f9e54f.
- Endo, Satoshi, Jasmin Bauerfeind und Kai Uwe Goss (2012). „Partitioning of neutral organic compounds to structural proteins“. In: *Environ. Sci. Technol.* 46.22, S. 12697–12703. ISSN: 0013936X. DOI: [10.1021/es303379y](https://doi.org/10.1021/es303379y).
- Endo, Satoshi, Trevor N Brown und Kai-Uwe Goss (2013). „General model for estimating partition coefficients to organisms and their tissues using the biological compositions and polyparameter linear free energy relationships.“ In: *Environ. Sci. Technol.* 47.12, S. 6630–9. ISSN: 1520-5851. DOI: [10.1021/es401772m](https://doi.org/10.1021/es401772m). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672211><http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es401772m>.
- Endo, Satoshi, Beate I Escher und Kai-Uwe Goss (2011). „Capacities of Membrane Lipids to Accumulate Neutral Organic Chemicals“. In: *Environ. Sci. Technol.* 45.14, S. 5912–5921. ISSN: 0013-936X. DOI: [10.1021/es200855w](https://doi.org/10.1021/es200855w). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671592><http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es200855w>.
- Erickson, Russell J. und James M. McKim (1990). „A model for exchange of organic chemicals at fish gills: flow and diffusion limitations“. In: *Aquat. Toxicol.* 18.4, S. 175–197. ISSN: 0166445X. DOI: [10.1016/0166-445X\(90\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90001-6). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166445X90900016>.
- Escher, Beate I. u. a. (2011). „Protein and lipid binding parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood and liver fractions to extrapolate from an in vitro metabolic degradation assay to in vivo bioaccumulation potential of hydrophobic organic chemicals“. In: *Chem. Res. Toxicol.* 24.7, S. 1134–1143. ISSN: 0893228X. DOI: [10.1021/tx200114y](https://doi.org/10.1021/tx200114y).
- Fisk, Aaron T. u. a. (1998). „Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 17.5, S. 951–961. ISSN: 07307268. DOI: [10.1897/1551-5028\(1998\)017<0951:DAADOH>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1998)017<0951:DAADOH>2.3.CO;2).
- Flanagan, Kelly B. u. a. (2005). „Predicting the equilibrium partitioning of organic compounds using just one linear solvation energy relationship (LSER)“. In: *Fluid Phase Equilib.* 233.1, S. 19–22. ISSN: 03783812. DOI: [10.1016/j.fluid.2005.04.006](https://doi.org/10.1016/j.fluid.2005.04.006). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378381205001172>.
- Gehrke, P. C. (1987). „Cardio-respiratory morphometrics of spangled perch, *Leiopotherapon unicolor* (Günther, 1859), (Percoidei, Teraponidae)“. In: *J. Fish Biol.* 31.5, S. 617–623. ISSN: 10958649. DOI: [10.1111/j.1095-8649.1987.tb05266.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1987.tb05266.x).
- Geisler, Anett, Satoshi Endo und Kai Uwe Goss (2012). „Partitioning of organic chemicals to storage lipids: Elucidating the dependence on fatty acid composition and temperature“. In: *Environ. Sci. Technol.* 46.17, S. 9519–9524. ISSN: 0013936X. DOI: [10.1021/es301921w](https://doi.org/10.1021/es301921w).
- Gerthsen, Christian (1966). *Physik*. Hrsg. von Hans O. Kneser. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 133 ff. ISBN: 978-3-662-30202-6. DOI: [10.1007/978-3-662-30201-9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-30201-9). URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-30201-9>.
- Goss, Kai-Uwe (2006). „Prediction of the temperature dependency of Henry’s law constant using poly-parameter linear free energy relationships“. In: *Chemosphere* 64.8, S. 1369–1374. ISSN: 00456535. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2005.12.049](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.049). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16466767><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565350501461X>.

- Harris, Kate A. u. a. (2008). „Partitioning of current-use and legacy pesticides in Salmon habitat in British Columbia, Canada“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 27.11, S. 2253–2262. ISSN: 07307268. DOI: 10.1897/07-651.1.
- Hayton, William L und Mace G Barron (1990). „Rate-limiting barriers to xenobiotic uptake by the gill“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 9.2, S. 151–157. ISSN: 1552-8618. DOI: 10.1002/etc.5620090204. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620090204>.
- Henneberger, Luise, Kai Uwe Goss und Satoshi Endo (2016). „Partitioning of Organic Ions to Muscle Protein: Experimental Data, Modeling, and Implications for in Vivo Distribution of Organic Ions“. In: *Environ. Sci. Technol.* 50.13, S. 7029–7036. ISSN: 15205851. DOI: 10.1021/acs.est.6b01417.
- Hills, Elizabeth E. u. a. (2011). „Diffusion coefficients in ethanol and in water at 298K: Linear free energy relationships“. In: *Fluid Phase Equilib.* 303.1, S. 45–55. ISSN: 03783812. DOI: 10.1016/j.fluid.2011.01.002. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2011.01.002><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378381211000070>.
- Hughes, G M (1966). „The dimensions of fish gills in relation to their function.“ In: *J. Exp. Biol.* 45.1, S. 177–195. ISSN: 0022-0949. DOI: 10.1111/j.1469-185X.1973.tb01009.x.
- Jager, Tjalling u. a. (2011). „General Unified Threshold Model of Survival - a Toxicokinetic-Toxicodynamic Framework for Ecotoxicology“. In: *Environ. Sci. Technol.* 45.7, S. 2529–2540. ISSN: 0013-936X. DOI: 10.1021/es103092a. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es103092a>.
- Karunasekara, Thushara und Colin F. Poole (2013). „Models for liquid-liquid partition in the system ethanolamine-organic solvent and their use for estimating descriptors for organic compounds“. In: *Chromatographia* 76.3-4, S. 157–164. ISSN: 00095893. DOI: 10.1007/s10337-013-2387-9. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.023>.
- Katritzky, A R u. a. (2010). „Quantitative correlation of physical and chemical properties with chemical structure: Utility for prediction“. In: *Chem. Rev.* 110.10, S. 5714–5789. ISSN: 00092665. DOI: 10.1021/cr900238d. URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77958029276{\&}partnerID=40{\&}md5=a2fbd3314648d8c20eae1a4e15432564>.
- Kelly, Barry C, Frank a P C Gobas und Michael S McLachlan (2004). „Intestinal absorption and biomagnification of organic contaminants in fish, wildlife, and humans.“ In: *Environ. Toxicol. Chem.* 23.10, S. 2324–2336. ISSN: 0730-7268. DOI: 10.1897/03-545.
- Kierkegaard, Amelie u. a. (1999). „Dietary uptake and biological effects of decabromodiphenyl ether in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)“. In: *Environ. Sci. Technol.* 33.10, S. 1612–1617. ISSN: 0013936X. DOI: 10.1021/es9807082.
- Kleinow, Kevin M u. a. (2008). „Toxicokinetics in Fishes“. In: *Toxicol. Fishes*. Hrsg. von Richard Di Giulio und David Hinton. CRC Press. Kap. 3, S. 55–152. ISBN: 978-0-415-24868-6. DOI: 10.1201/9780203647295. URL: <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/9780203647295>.
- Kramer, Nynke I., Jan C.H. Van Eijkeren und Joop L.M. Hermens (2007). „Influence of albumin on sorption kinetics in solid-phase microextraction: Consequences for chemical analyses and uptake processes“. In: *Anal. Chem.* 79.18, S. 6941–6948. ISSN: 00032700. DOI: 10.1021/ac070574n.
- Krogh, August (1922). „Krogh' Cylinder“. In: *Anat. Physiol. capillaries*. 2. Nabu Press (August 9, 2010). Kap. EXCHANGE O, S. 197–225.

- Larisch, W. und K.-U. Goss (2017). „Calculating the first-order kinetics of three coupled, reversible processes“. In: *SAR QSAR Environ. Res.* September, S. 1–9. ISSN: 1062-936X. DOI: [10.1080/1062936X.2017.1365763](https://doi.org/10.1080/1062936X.2017.1365763). URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1062936X.2017.1365763>.
- Larisch, Wolfgang, Trevor N. Brown und Kai-Uwe Goss (2017). „A toxicokinetic model for fish including multiphase sorption features“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 36.6, S. 1538–1546. ISSN: 07307268. DOI: [10.1002/etc.3677](https://doi.org/10.1002/etc.3677). URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3677>.
- Larisch, Wolfgang und Kai-Uwe Goss (2018b). „Modelling oral up-take of hydrophobic and super-hydrophobic chemicals in fish“. In: *Environ. Sci. Process. Impacts* 00, S. 1–7. ISSN: 2050-7887. DOI: [10.1039/C7EM00495H](https://doi.org/10.1039/C7EM00495H). URL: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7EM00495H>.
- (2018a). „Modelling oral up-take of hydrophobic and super-hydrophobic chemicals in fish“. In: *Environ. Sci. Process. Impacts* 20.1, S. 98–104. ISSN: 2050-7887. DOI: [10.1039/C7EM00495H](https://doi.org/10.1039/C7EM00495H). URL: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7EM00495H>.
- Lien, Gregory J. und James M. McKim (1993). „Predicting branchial and cutaneous uptake of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Rate limiting factors“. In: *Aquat. Toxicol.* 27.1-2, S. 15–31. ISSN: 0166445X. DOI: [10.1016/0166-445X\(93\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0166-445X(93)90044-2).
- Liu, Lihua u. a. (2013). „Determination of the subcooled liquid solubilities of PAHs in partitioning batch experiments“. In: *Geosci. Front.* 4.1, S. 123–126. ISSN: 16749871. DOI: [10.1016/j.gsf.2012.03.010](https://doi.org/10.1016/j.gsf.2012.03.010). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gsf.2012.03.010>.
- Mayer, Philipp u. a. (2007). „Enhanced diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons in artificial and natural aqueous solutions“. In: *Environ. Sci. Technol.* 41.17, S. 6148–6155. ISSN: 0013936X. DOI: [10.1021/es070495t](https://doi.org/10.1021/es070495t).
- McKim, J, P Schmieder und G Veith (1985). „Absorption dynamics of organic chemical transport across trout gills as related to octanol-water partition coefficient.“ In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77.1, S. 1–10. ISSN: 0041-008X. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3966233>.
- Munsch, C. u. a. (2011). „Dietary exposure of juvenile common sole (*Solea solea* L.) to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Part 1. Bioaccumulation and elimination kinetics of individual congeners and their debrominated metabolites“. In: *Environ. Pollut.* 159.1, S. 229–237. ISSN: 02697491. DOI: [10.1016/j.envpol.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.001). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.001><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749110003994>.
- Nichols, J. W. u. a. (1993). „Physiologically-based toxicokinetic modeling of three waterborne chloroethanes in channel catfish, *Ictalurus punctatus*“. In: *Aquat. Toxicol.* 27.1-2, S. 83–111. ISSN: 0166445X. DOI: [10.1016/0166-445X\(93\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(93)90049-7).
- Nichols, J W u. a. (1996). „A physiologically based toxicokinetic model for dermal absorption of organic chemicals by fish.“ In: *Fundam. Appl. Toxicol.* 31.2, S. 229–42. ISSN: 0272-0590. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8789789>.
- Nichols, J. W. u. a. (2001). „Dietary Uptake Kinetics Of 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl In Rainbow Trout“. In: *Drug Metab. Dispos.* 29.7, S. 1013–1022.
- Nichols, John W, Irvin R Schultz und Patrick N Fitzsimmons (2006). „In vitro–in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish“. In: *Aquat. Toxicol.* 78.1, S. 74–90. ISSN: 0166445X. DOI: [10.1016/j.aquatox.2006.01.017](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.01.017). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16513189><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X06000476>.

- Nichols, John W. u. a. (1990). „A physiologically based toxicokinetic model for the uptake and disposition of waterborne organic chemicals in fish“. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106.3, S. 433–447. ISSN: 0041008X. DOI: 10.1016/0041-008X(90)90338-U. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0041008X9090338U>.
- Nichols, John W. u. a. (2004a). „A Physiologically Based Toxicokinetic Model for Dietary Uptake of Hydrophobic Organic Compounds by Fish: I. Feeding Studies with 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl“. In: *Toxicol. Sci.* 77.2, S. 206–218. ISSN: 1096-0929. DOI: 10.1093/toxsci/kfh033. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657515><http://www.toxsci.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfh033><https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfh033>.
- (2004b). „A Physiologically Based Toxicokinetic Model for Dietary Uptake of Hydrophobic Organic Compounds by Fish: II. Simulation of Chronic Exposure Scenarios“. In: *Toxicol. Sci.* 77.2, S. 219–229. ISSN: 1096-0929. DOI: 10.1093/toxsci/kfh032. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657516><http://www.toxsci.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfh032><https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfh032>.
- OECD (2012a). *No 175: Validation report of a ring test for the OECD 305 dietary exposure bioaccumulation fish test*. Techn. Ber. Organisation de Coopération et de Développement Économiques Organisation for Economic Co-operation and Development. URL: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmenttestingforenvironmentalfate.htm>.
- (2012b). *OECD/OCDE Guidelines for testing of chemicals - 305 Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3 October. OECD Publishing. ISBN: 9789264067585. DOI: 10.1787/9789264067585-en. URL: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-316-phototransformation-of-chemicals-in-water-direct-photolysis__9789264067585-en.
- Péry, Alexandre R. R. u. a. (2014). „A Physiologically Based Toxicokinetic Model for the Zebrafish *Danio rerio*“. In: *Environ. Sci. Technol.* 48.1, S. 781–790. ISSN: 0013-936X. DOI: 10.1021/es404301q. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es404301q>.
- Peter W. Atkins und Julio de Paula (2013). *Physikalische Chemie - Kapitel 20 Die Bewegung von Molekülen*. Wiley-VCH, 791 ff. ISBN: 978-3-527-33568-8.
- Polli, J W u. a. (2001). „Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery.“ In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299.2, S. 620–8. ISSN: 0022-3565. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.09.065. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602674>.
- Pontolillo, James und Robert P. Eganhouse (2001). „The Search for Reliable Aqueous Solubility (Sw) and Octanol-Water Partition Coefficient (Kow) Data for Hydrophobic Organic Compounds: DDT and DDE as a Case Study“. In: *Assessment*, S. 1–55.
- Poole, Colin F. und Salwa K. Poole (2008). „Separation characteristics of wall-coated open-tubular columns for gas chromatography“. In: *J. Chromatogr. A* 1184.1-2, S. 254–280. ISSN: 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.07.028.
- Poole, Colin F. u. a. (2009). „Determination of solute descriptors by chromatographic methods“. In: *Anal. Chim. Acta* 652.1-2, S. 32–53. ISSN: 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2009.04.038. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- pubmed/19786169<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267009005789>.
- S. N. Prasad, Vasantika Kashyap (1989). „A Textbook of Vertebrate Zoology“. In: *A Textb. Vertebr. Zool.* 14 edition. New Age International Pvt. Ltd, S. 302–304. ISBN: 978-8122426724.
- Sakuratani, Yuki u. a. (2008). „Molecular size as a limiting characteristic for bioconcentration in fish“. In: *J. Environ. Biol.* 29.1, S. 89–92. ISSN: 0254-8704. URL: <http://europepmc.org/abstract/MED/18831338>.
- Schlechtriem, Christian, Annette Fliedner und Christoph Schäfers (2012). „Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: contributions to the revision of guideline OECD 305“. In: *Environ. Sci. Eur.* 24.1, S. 13. ISSN: 2190-4715. DOI: 10.1186/2190-4715-24-13. URL: <http://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/2190-4715-24-13><http://www.enveurope.com/content/24/1/13>.
- Schlechtriem, Christian u. a. (2017). „Fish bioconcentration studies with column-generated analyte concentrations of highly hydrophobic organic chemicals“. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 36.4, S. 906–916. ISSN: 15528618. DOI: 10.1002/etc.3635.
- Schmitt, Walter (2008). „General approach for the calculation of tissue to plasma partition coefficients“. In: *Toxicol. Vitro.* 22.2, S. 457–467. ISSN: 08872333. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.09.010.
- Schünemann, Volker (2005). *Biophysik*. Springer-Lehrbuch. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. ISBN: 3-540-21163-2. DOI: 10.1007/b137686. URL: <http://link.springer.com/10.1007/b137686>.
- Sigurdsson, Hakon H., Julian Kirch und Claus Michael Lehr (2013). „Mucus as a barrier to lipophilic drugs“. In: *Int. J. Pharm.* 453.1, S. 56–64. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.05.040. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313004572><http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.040>.
- Simionescu, M, N Simionescu und G E Palade (1974). „Morphometric data on the endothelium of blood capillaries.“ In: *J. Cell Biol.* 60.1, S. 128–52. ISSN: 0021-9525. DOI: 10.1083/jcb.60.1.128. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2109128&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stadnicka, Julita, Kristin Schirmer und Roman Ashauer (2012). „Predicting concentrations of organic chemicals in fish by using toxicokinetic models“. In: *Environ. Sci. Technol.* 46.6, S. 3273–3280. ISSN: 0013936X. DOI: 10.1021/es2043728.
- Stenzel, Angelika, Kai Uwe Goss und Satoshi Endo (2013a). „Determination of polyparameter linear free energy relationship (pp-LFER) substance descriptors for established and alternative flame retardants“. In: *Environ. Sci. Technol.* 47.3, S. 1399–1406. ISSN: 0013936X. DOI: 10.1021/es304780a.
- (2013b). „Experimental determination of polyparameter linear free energy relationship (pp-LFER) substance descriptors for pesticides and other contaminants: New measurements and recommendations“. In: *Environ. Sci. Technol.* 47.24, S. 14204–14214. ISSN: 0013936X. DOI: 10.1021/es404150e.
- Thews, G. (1959). „Die Sauerstoffdiffusion im Gehirn“. In: *Pfluegers Arch. fuer die Gesamte Physiol. des Menschen und der Tiere* 270.1. Hrsg. von Intergovernmental Panel on Climate Change, S. 11–12. ISSN: 0031-6768. DOI: 10.1007/BF00445045. arXiv: [arXiv:1011.1669v3](https://arxiv.org/abs/1011.1669v3). URL: <http://link.springer.com/10.1007/BF00445045>.

- Thews, G. und H. Hutten (1978). *Biophysik Des Atemgastransports*. Springer Netherlands, S. 378–390. ISBN: 0006-3134.
- Tomy, Gregg T. u. a. (2008). „Examination of isomer specific bioaccumulation parameters and potential in vivo hepatic metabolites of syn- and anti-dechlorane plus isomers in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)“. In: *Environ. Sci. Technol.* 42.15, S. 5562–5567. ISSN: 0013936X. DOI: [10.1021/es800220y](https://doi.org/10.1021/es800220y).
- Ulrich S.; Brown, T.N.; Watanabe, N.; Bronner, G.; Abraham, M.H.; Goss, K.-U., N.; Endo (2017). *UFZ-LSER database v 3.2 [Internet]*. Leipzig, Deutschland, Helmholtz Zentrum für Umweltforschung - UFZ. URL: <http://www.ufz.de/lserd>.
- West, Geoffrey B., J H Brown und B J Enquist (1997). „A General Model for the Origin of Allometric Scaling Laws in Biology“. In: *Science (80-.)*. 276.5309, S. 122–126. ISSN: 00368075. DOI: [10.1126/science.276.5309.122](https://doi.org/10.1126/science.276.5309.122). URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.276.5309.122>.
- Westergaard, H und J M Dietschy (1976a). „Mechanism Whereby Bile-Acid Micelles Increase Rate of Fatty-Acid and Cholesterol Uptake Into Intestinal Mucosal Cell“. In: *J. Clin. Invest.* 58.1, S. 97–108. DOI: [10.1172/jci108465](https://doi.org/10.1172/jci108465).
- Westergaard, H. und John M. Dietschy (1976b). „The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell.“ In: *J. Clin. Invest.* 58.1, S. 97–108. ISSN: 0021-9738. DOI: [10.1172/JCI108465](https://doi.org/10.1172/JCI108465). URL: <http://www.jci.org/articles/view/108465>.
- Yamamoto, Takeshi u. a. (2002). „Influence of feeding diets with and without fish meal by hand and by self-feeders on feed intake, growth and nutrient utilization of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)“. In: *Aquaculture* 214.1-4, S. 289–305. ISSN: 00448486. DOI: [10.1016/S0044-8486\(02\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00035-2).
- Zhang, Yanyan u. a. (2015). „Bioaccessibility of PAHs in Fuel Soot Assessed by an in Vitro Digestive Model with Absorptive Sink: Effect of Food Ingestion“. In: *Environ. Sci. Technol.* 49.24, S. 14641–14648. ISSN: 0013-936X. DOI: [10.1021/acs.est.5b04342](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04342). URL: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.5b04342>.